

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

# Auswirkung einer Anämie auf die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt

-

## Studien anhand eines experimentellen Mausmodells

### Dissertation

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

vorgelegt von  
Marvin Leineweber

2021

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Miriam Cortese-Krott

Zweitgutachter: PD Dr. Alexander Assmann

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

-

## Kurzdarstellung

Große randomisierte Studien zeigen, dass Anämien mit einer signifikanten Beeinträchtigung des *Outcomes* von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt assoziiert sind. Dies bestärkt die Definition der Anämie als eigenständigen kardiovaskulären Risikofaktor. Mit Anämien verbundene Konfundierungseffekte limitieren Aussagen über die Relevanz pathophysiologischer Adaptionen der isolierten Anämie und dessen Interaktion mit der Entität Herz im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionseignisses.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der kardialen Funktion in einem tierexperimentellen Anämie-Modell sowie die Darstellung von Effekten und Interaktionen einer isolierten Anämie in einem Ischämie/Reperfusionseignis. Eine Interpretation pathophysiologischer Adaptionen soll Hinweise auf vermittelnde Mechanismen des möglichen nachteiligen *Outcomes* anämischer Patienten formulieren.

Zur Untersuchung der kardialen Funktion wurde ein standardisiertes Anämie-Modell in gesunden Wildtyp-Versuchsmäusen etabliert. Durch repetitive Blutabnahmen unter adäquater Substitution kristalloider Lösung konnte über vier Tage ein akut anämischer Zustand erzeugt werden, verifiziert durch eine Hämoglobinkonzentration von  $7,30 \pm 0,59$  g/dl. Durch *in vivo* und *ex vivo* Studien anämischer Versuchstiere konnten hämodynamische Adaptionen nachgewiesen werden. Anämische Versuchstiere zeigten eine hyperdynamische Kreislaufsituation mit Zunahme von Herzzeitvolumen und der myokardialen Kontraktilität. Während lokaler Okklusion des Ramus interventricularis anterior der Arteria coronaria sinistra über 45 Minuten konnte bei anämischen Versuchstieren eine signifikant stärkere Beeinträchtigung kardialer Funktionsparameter beschrieben werden. Während der Reperusionsphase auf Ischämie folgend, zeigten anämische Versuchstiere eine signifikant höhere Regenerationsfähigkeit ihrer kardialen Funktionen im Vergleich zu nicht-anämischen Kontrollen. Dies begünstigte zum Ende der Reperfusion einen signifikant gesteigerten funktionellen Erhaltungszustand von Anämie unterworfenen Versuchstierherzen. Die Infarktgrößen in Reaktion auf das Ischämie/Reperfusionseignis zeigten sich in anämischen Versuchstiermäusen signifikant reduziert. Als möglicher Mediator wurden Interaktionen mit dem Redoxsystem untersucht. In anämischen Versuchstieren konnte eine signifikant höhere antioxidative Reserve im Vergleich zu nicht-anämischen Versuchstieren dargestellt werden.

Anämien gehen mit Adaptionen der kardialen Funktion und Integrität einher. Diese sind während der Ischämiephase durch höhere Beeinträchtigungen zu charakterisieren. Darüber hinaus besitzen sie das Potenzial protektiv in einem Ischämie/Reperfusionseignis zu wirken. Als möglicher Mediator dieser Effekte könnten protektive Anpassungen des Redoxstatus assoziiert sein.

## **Abstract**

*Large randomized studies defined anemia as independent cardiovascular riskfactor with limitations of outcome in patients with acute myocardial infarction. Evaluations of effects and interactions between pathological adaption resulted from anemia and organ heart were hindered by confounders. The impact of anemia on ischemia/reperfusion events is still unkown.*

*The goal of this study was to determine cardial function and integrity in acute anemic mousemodel. Furthermore experimental studies are aimed at characterization of effects and impact according to anemia induction in setting of ischemia/reperfusion event. Description and interpretation of pathophysiological adaptations will give an indication to mediator of adverse outcome of anemic patients in acute myocardila infarction.*

*In order to evaluate cardial adaption under experimental anemic conditions, standardized anemia modell was established in healthy wildtype mice. Acute anemia was induced within four days by repetitive venepuncture at adequate substitution of crystalloid solution. A manifest anemia, was confirmed by hemogram, verified in hemoglobin levels of  $7.30 \pm 0.59$  g/dl. In in vivo and ex vivo studies anemic subjects showed altered hemodynamic state. This defined hyperdynamic circulation with increased cardial output, induced by accelerated heartrate and enhanced myocardial contractility in anemic conditions. Throughout the local occlusion of left anterior descending artery, part of A. artery coronary sinistra, for 45 minutes, anemic mice showed a significant intensified limitation of cardial function and contractility. During reperfusion of ischemia area, anemic mice demonstrated significant improved recovery of cardiac function. At the end of reperfusion cardiac effectiveness constituted superior state of preservation in comparison with non anemic subjects. Results provided by studies of infarct size encourage observation. In anemic mice the infarct size, measured by triphenyl tetrazolium chloride, was reduced significantly. In order to evaluation redox state in anemic and non anemic organism, glutathione levels were quantified. Antioxidative defence as potential mediator of protection against injury at ischemia/reperfusion events, was increased in anemic subjects, associated to significant raised reserve.*

*The results suggest that anemia caused adaption in cardial function and integrity. During ischemia anemia associates cardial function with increased limitations, but in reperfusion anemia enables enhanced recovery and reduced infarct size. This attributes the potential of protection against ischemia/reperfusion event to anemia, probably mediated by modulation of redox state.*

## Einheitenverzeichnis

| Symbol | Beschreibung | Einheit      |
|--------|--------------|--------------|
| l      | Länge        | Meter (m)    |
| m      | Masse        | Gramm (g)    |
| T      | Temperatur   | Celsius (°C) |
| N      | Stoffmenge   | Mol (mol)    |
| t      | Zeit         | Sekunden (s) |

## Abkürzungsverzeichnis

|                            |  |                      |  |
|----------------------------|--|----------------------|--|
| <b>AAR</b>                 | <i>Area at risk</i>                            | <b>HF</b>            | <i>Herzfrequenz</i>                      |
| <b>ACS</b>                 | Akutes Koronarsyndrom                          | <b>Hkt</b>           | Hämatokrit                               |
| <b>ATP</b>                 | Adenosintriphosphat                            | <b>HZV</b>           | Herzzeitvolumen                          |
| <b>BH<sub>4</sub></b>      | Tetrahydrobiopterin                            | <b>IRS</b>           | Ischämie-Reperfusionsschaden             |
| <b>CorF</b>                | Koronarer Fluss                                | <b>IVCT</b>          | Isovolumetrische Kontraktionszeit        |
| <b>DNS</b>                 | Desoxyribonukleinsäure                         | <b>IVRT</b>          | Isovolumetrische Relaxationszeit         |
| <b>DP</b>                  | Entwickelter Druck                             | <b>MCV</b>           | Mittleres korpuskuläres Volumen          |
| <b>dP/dt<sub>max</sub></b> | Maximale Rate der Druckänderung in Kontraktion | <b>MCH</b>           | Mittlerer korpuskuläres Hämoglobingehalt |
| <b>dP/dt<sub>min</sub></b> | Maximale Rate der Druckänderung in Relaxation  | <b>NSTEMI</b>        | Nicht-ST-Hebungsinfarkt                  |
| <b>EF</b>                  | Ejektionsfraktion                              | <b>NO</b>            | Stickstoffmonoxid                        |
| <b>EKG</b>                 | Elektrokardiogramm                             | <b>O<sub>2</sub></b> | Sauerstoff                               |
| <b>eNOS</b>                | Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase        | <b>RIVA</b>          | Ramus interventricularis anterior        |
| <b>EPO</b>                 | Erythropoetin                                  | <b>ROS</b>           | Reaktive Sauerstoffspezies               |
| <b>ESC</b>                 | <i>European Society of Cardiology</i>          | <b>STEMI</b>         | <i>ST-Hebungsinfarkt</i>                 |
| <b>GSH</b>                 | Reduziertes Glutathion                         | <b>SV</b>            | Schlagvolumen                            |
| <b>GS-SG</b>               | Oxidiertes Glutathion                          | <b>TTC</b>           | Triphenyltetrazoliumchlorid              |
| <b>Hb</b>                  | Hämoglobin                                     |                      |  |

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einteilung</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Anämie</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Ätiologie und Systematisierung der Anämie .....                         | 1         |
| 1.1.2 Epidemiologie der Anämie .....  | 4         |
| 1.1.3 Hämodynamische Auswirkungen und Pathophysiologie der Anämie.....        | 5         |
| 1.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie der Anämie .....                        | 7         |
| <b>1.2 Myokardinfarkt</b> .....   | <b>9</b>  |
| 1.2.1 Klinische Klassifikation des Myokardinfarktes.....                      | 9         |
| 1.2.2 Epidemiologie und Ätiologie des Myokardinfarktes.....                   | 11        |
| 1.2.3 Pathophysiologie und Klinik des Myokardinfarktes .....                  | 12        |
| 1.2.4 Diagnostik und Therapie des Myokardinfarktes .....                      | 13        |
| <b>1.3 Anämie und Herzinfarkt</b> .....                                       | <b>14</b> |
| 1.3.1 Epidemiologie Anämie und Herzinfarkt .....                              | 14        |
| 1.3.2 Pathophysiologische Interaktion zwischen Anämie und Myokardinfarkt..... | 14        |
| 1.3.3 Klinische Darstellung Anämie und Myokardinfarkt.....                    | 17        |
| 1.3.4 Korrektur von Anämien im Myokardinfarkt .....                           | 18        |
| <b>1.4 Zielsetzung der Ausarbeitung</b> .....                                 | <b>19</b> |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....   | <b>20</b> |
| <b>2.1 Materialien</b> .....  | <b>20</b> |
| 2.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....                             | 20        |
| 2.1.2 Verwendete Geräte .....   | 21        |
| <b>2.2 Versuchstiere und Tierhaltung</b> .....                                | <b>23</b> |
| <b>2.3 Tierexperimentelles Anämie-Modell</b> .....                            | <b>23</b> |
| 2.3.1 Anämieinduktion.....  | 24        |
| 2.3.2 Nicht-anämische Kontrollen .....  | 25        |
| <b>2.4 Echokardiografie</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>2.5 Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff</b> .....                 | <b>29</b> |
| 2.5.1 Beschreibung des Langendorff Versuchsaufbau .....                       | 29        |
| 2.5.2 Krebs-Henseleit Lösung .....  | 31        |
| 2.5.3 Herzentnahme und Präparation .....                                      | 32        |
| 2.5.4 Messparameter .....   | 35        |
| 2.5.5 Langendorff Laborstudien - Kalibrierung.....                            | 36        |
| 2.5.6 Langendorff Laborstudien – Substanzapplikation .....                    | 37        |
| 2.5.6.1 Bradykinin.....   | 38        |
| 2.5.6.2 Adenosin .....  | 39        |
| 2.5.6.3 Isoproterenol .....   | 40        |
| 2.5.7 Langendorff Laborstudien – Ischämie/Reperfusionsmodell .....            | 41        |
| <b>2.6 Oxidativer Stress – Glutathion Assay</b> .....                         | <b>44</b> |
| 2.6.1 Probengewinnung und Probenaufbereitung.....                             | 44        |
| 2.6.1.1 Probe „Plasma“ .....  | 45        |
| 2.6.1.2 Probe „Erythrozyten“ .....  | 45        |
| 2.6.1.3 Probe „Herz“.....   | 46        |
| 2.6.2 Glutathione Fluorescent Detection Assay .....                           | 46        |
| 2.6.3 Proteinbestimmung nach Lowry .....                                      | 47        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.7 Datenerfassung und Datenverarbeitung .....</b>                | <b>48</b> |
| 2.7.1 Anämieinduktion.....   | 48        |
| 2.7.2 Echokardiographie .....  | 48        |
| 2.7.3 Langendorff Laborstudien .....                                 | 48        |
| 2.7.4 Glutathion Bestimmung.....                                     | 48        |
| <b>2.8 Statistische Auswertungen der Messergebnisse .....</b>        | <b>49</b> |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>3.1 Anämieinduktion.....</b>                                      | <b>50</b> |
| <b>3.2 Echokardiographie .....</b>                                   | <b>52</b> |
| <b>3.3 Isoliert perfundiertes Herzmodell nach Langendorff .....</b>  | <b>54</b> |
| 3.3.1 Langendorff Laborstudien - Kalibrierung.....                   | 54        |
| 3.3.2 Langendorff Laborstudien - Substanzapplikation .....           | 56        |
| 3.3.2.1 Bradykinin.....  | 57        |
| 3.3.2.2 Adenosin .....   | 58        |
| 3.3.2.3 Isoproterenol .....  | 59        |
| 3.3.3 Langendorff Laborstudien – Ischämie/Reperfusion .....          | 60        |
| <b>3.4 Infarktgrößenbestimmung .....</b>                             | <b>67</b> |
| <b>3.5 Oxidativer Stress - <i>Glutathion Assay</i>.....</b>          | <b>68</b> |
| <b>4. Diskussion .....</b>   | <b>70</b> |
| <b>4.1 Tierexperimentelles Anämiemodell.....</b>                     | <b>70</b> |
| <b>4.2 Basale Charakterisierung kardialer Funktionen .....</b>       | <b>72</b> |
| <b>4.3 Medikamentenstudien .....</b>                                 | <b>76</b> |
| 4.3.1 Charakterisierung aus Bradykinin Applikation.....              | 76        |
| 4.3.2 Charakterisierung aus Adenosin Applikation .....               | 78        |
| 4.3.3 Charakterisierung aus Isoproterenol Applikation .....          | 79        |
| <b>4.4 Charakterisierung aus Ischämie/Reperfusionseignissen.....</b> | <b>81</b> |
| 4.4.1 Charakterisierung aus Lokalischämie .....                      | 82        |
| 4.4.2 Charakterisierung aus Reperfusion und Infarktgrößen .....      | 86        |
| <b>4.4 Charakterisierung des Redoxstatus .....</b>                   | <b>93</b> |
| <b>4.5 Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>                       | <b>96</b> |
| <b>5. Literaturverzeichnis .....</b>                                 | <b>98</b> |



## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Klassifikation von Anämien nach Erythrozytenindizes MCV und MCH..                | 2  |
| <b>Tabelle 2:</b> Klassifikation der Myokardinfarkte durch <i>European Society of Cardiology</i> . | 10 |
| <b>Tabelle 3:</b> Übersicht über verwendete Chemikalien und Reagenzien.                            | 20 |
| <b>Tabelle 4:</b> Übersicht über verwendete Geräte.  | 21 |
| <b>Tabelle 5:</b> Beispielhafte Bestimmung der Blutabnahmemenge zur Anämieinduktion.               | 25 |
| <b>Tabelle 6:</b> Übersicht über zu erhebende Messparameter in der Echokardiographie.              | 27 |
| <b>Tabelle 7:</b> Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit Lösung.                        | 31 |
| <b>Tabelle 8:</b> Übersicht über zu erhebende Messparameter im Rahmen der Langendorff-Apparatur.   | 35 |
| <b>Tabelle 9:</b> Darstellung des Kalibrierungsprotokolls in Langendorff Laborstudien.             | 36 |
| <b>Tabelle 10:</b> Darstellung des Substanzprotokolls in Langendorff Laborstudien.                 | 37 |
| <b>Tabelle 11:</b> Darstellung des Ischämie/Reperusionsprotokolls in Langendorff Laborstudien.     | 41 |
| <b>Tabelle 12:</b> Darstellung der Infarktgrößenbestimmung durch TTC.                              | 42 |
| <b>Tabelle 13:</b> Protokoll zur Bearbeitung der Probe „Plasma“ im <i>Glutathion Assay</i> .       | 45 |
| <b>Tabelle 14:</b> Protokoll zur Bearbeitung der Probe „Erythrozyten“ im <i>Glutathion Assay</i> . | 45 |
| <b>Tabelle 15:</b> Protokoll zur Bearbeitung der Probe „Herz“ im <i>Glutathion Assay</i> .         | 46 |
| <b>Tabelle 16:</b> Protokoll zur Messung von Proben im <i>Glutathion Assay</i> .                   | 46 |
| <b>Tabelle 17:</b> Übersicht über Zielverdünnung der Proben zur Proteinbestimmung.                 | 47 |
| <b>Tabelle 18:</b> Protokoll Durchführung des <i>Protein Assay</i> .                               | 47 |
| <b>Tabelle 19:</b> „Anämische Mäuse“ zeigen eine höhere antioxidative Reserve.                     | 69 |

## Gleichungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Gleichung 1:</b> Berechnung des Sauerstoffangebotes an das Gewebe. | 15 |
| <b>Gleichung 2:</b> Berechnung des Mittelwertes.                      | 49 |
| <b>Gleichung 3:</b> Berechnung der Standardabweichung.                | 49 |

# Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abb. 1:</b> Darstellung hämodynamischer Kompensationsmechanismen in akuter Anämie. ....   | 6  |
| <b>Abb. 2:</b> Diagnostik und Therapie des akuten Myokardinfarktes. ....   | 13 |
| <b>Abb. 3:</b> Darstellung des Verlaufes der V. facialis. ....   | 25 |
| <b>Abb. 4:</b> Echokardiographische Darstellung des langen Achsenschnittes im B-Mode. ....   | 28 |
| <b>Abb. 5:</b> Darstellung echokardiographischer Einstellungen des Untersuchungsprotokolls. ....   | 28 |
| <b>Abb. 6:</b> Darstellung der Präparationsschritte im Rahmen des Langendorff Protokolls. ....   | 34 |
| <b>Abb. 7:</b> Schematische Darstellung des angefertigten Katheters. ....  | 34 |
| <b>Abb. 8:</b> Vasomotorische Auswirkungen von Bradykinin im Herzen. ....  | 38 |
| <b>Abb. 9:</b> Vasomotorische Auswirkung von Adenosin im Herzen. ....  | 39 |
| <b>Abb. 10:</b> Vasomotorische Auswirkung von Isoproterenol im Herzen. ....  | 40 |
| <b>Abb. 11:</b> Darstellung der Ausmessung eines Herzschnittes nach Infarkteinfärbung. ....  | 43 |
| <b>Abb. 12:</b> Darstellung des physiologischen Stoffwechsels von Glutathion. ....   | 44 |
| <b>Abb. 13:</b> Repetitive Blutabnahmen induzierten eine Reduktion der Hämoglobinkonzentration. ....   | 50 |
| <b>Abb. 14:</b> In Anämieinduktion verblieben Erythrozytenindizes in „ <i>anämischen Mäusen</i> “ normwertig. ...  | 51 |
| <b>Abb. 15:</b> Echokardiographische Beschreibung einer Hyperdynamisierung der Kreislauftsituation. ....   | 52 |
| <b>Abb. 16:</b> Echokardiographisch erhobene IVCT und IVRT waren in „ <i>anämischen Mäusen</i> “ verkürzt. ...   | 53 |
| <b>Abb. 17:</b> Anämieinduktion ging mit einer Steigerung myokardialer Funktionsparameter einher. ....   | 54 |
| <b>Abb. 18:</b> Globalischämie induzierte eine vergleichbare Beeinträchtigung kardialer Funktionen. ....   | 55 |
| <b>Abb. 19:</b> „ <i>Kontrollen</i> “ und „ <i>anämische Mäuse</i> “ waren nach Präparation vergleichbar. ....   | 56 |
| <b>Abb. 20:</b> Bradykinin zeigte in „ <i>Kontrollen</i> “ ein höheres Effektmaß. ....   | 57 |
| <b>Abb. 21:</b> Adenosin zeigte vergleichbares Effektmaß in „ <i>Kontrollen</i> “ und „ <i>anämischen Mäusen</i> “. ....   | 58 |
| <b>Abb. 22:</b> Isoproterenol zeigte in „ <i>anämischen Mäusen</i> “ ein höheres Effektmaß. ....   | 60 |
| <b>Abb. 23:</b> „ <i>Anämische Mäuse</i> “ zeigten bei vergleichbarer Präparationszeit eine gesteigerte vasovagale Reagibilität. ....  | 61 |
| <b>Abb. 24:</b> In Ischämie zeigte sich eine gleichwertige Reduktion des koronaren Flusses und in „ <i>anämischen Mäusen</i> “ eine gesteigerte Reperfusion nach Wiedereröffnung der Okklusion. .... | 63 |
| <b>Abb. 25:</b> In Ischämie zeigten „ <i>anämische Mäuse</i> “ eine stärkere Limitierung des entwickelten Druckes und in Reperfusion eine gesteigerte Erholung. ....                                 | 64 |
| <b>Abb. 26:</b> In Ischämie zeigten „ <i>anämische Mäuse</i> “ eine stärkere Limitierung maximaler Rate der Druckänderung in Kontraktion und in Reperfusion eine gesteigerte Erholung. ....          | 65 |
| <b>Abb. 27:</b> In Ischämie zeigten „ <i>anämische Mäuse</i> “ eine stärkere Limitierung der maximalen Rat der Druckänderung in Relaxation und in Reperfusion eine gesteigerte Erholung. ....        | 66 |
| <b>Abb. 28:</b> In Auswertung von Infarktgrößen zeigten „ <i>anämische Mäuse</i> “ kleinere Infarkte. ....   | 67 |

# 1. Einteilung

## 1.1 Anämie

Der Begriff Anämie definiert einen pathologischen Zustand verminderter Sauerstofftransportkapazität, resultierend aus einer Verminderung des sauerstofftragenden Blutfarbstoffes Hämoglobin (Hb) bzw. aus einem verminderten Anteil an Erythrozyten am Blutvolumen [1, 2]. Die weltweite Prävalenz von Anämien wurde von der *World Health Organization* auf 24,8% geschätzt, wobei eine hohe Alters- und Geschlechtsabhängigkeit aufgezeigt werden kann [2]. Über ihren Krankheitswert in Form von Blässe und Abgeschlagenheit hinaus wird die Manifestation der Anämie in großen klinischen, randomisiert kontrollierten Studien als ein unabhängiger Risikofaktor für Hospitalisierung, Invalidität, Komorbidität und Sterblichkeit benannt [3–5].

Das Hb steht in der Funktion des Sauerstofftransportes im Körper, in welcher es durch Interaktion mit Sauerstoffmolekülen dem Sauerstoffbedarf von Zielgewebe entsprechen kann. Nach der *World Health Organisation* ist eine Verminderung der Hämoglobinkonzentration auf  $< 13,0 \text{ g/dl}$  ( $< 8,06 \text{ mmol/l}$ ) bei Männern bzw. auf  $< 12 \text{ g/dl}$  ( $< 7,44 \text{ mmol/l}$ ) bei Frauen als pathologischer Zustand im Sinne einer Anämie zu definieren [2, 6]. Für Kinder gelten Referenzwerte in Abhängigkeit vom Lebensalter. Konkordant kann die Diagnose einer Anämie über eine Bestimmung des Hämatokrits (Hkt) erfolgen, welcher den prozentualen Volumenanteil der im Blut zirkulierenden zellulären Bestandteile ausdrückt. Da der Großteil der zellulären Fraktion im Gesunden durch Erythrozyten gebildet wird, kann der Hkt als indirekter Marker zur Bestimmung der Erythrozytenanteile im Blut herangezogen werden. So gilt ein Hkt von  $< 42\%$  bei Männern und  $< 38\%$  bei Frauen als pathologisch im Sinne einer Anämie [7]. Im Gegensatz zu den Parametern Hb und Hkt, welche mit dem Ausmaß der Anämie korrelieren und daher unentbehrlich für deren Diagnostik sind, korreliert die absolute Erythrozytenzahl nicht zuverlässig mit einem anämischen Zustand und ist demnach kein empfindlicher Parameter um Anämien zu erfassen.

### 1.1.1 Ätiologie und Systematisierung der Anämie

In der Literatur werden viel gerichtete Systematisierungen beschrieben, nach welchen Anämien klassifiziert und charakterisiert werden können. Am häufigsten angewendet sind Einteilungen nach morphologischer Charakterisierung von Erythrozyten (Erythrozytenindizes) und nach Darstellung der Ätiopathogenese [8].

Anhand der Beschreibung von Erythrozytenindizes kann das vorherrschende Erscheinungsbild der Erythrozyten beschrieben und mögliche Ätiopathogenesen assoziiert werden. Abgeleitet aus hämatologischen Messgrößen kann die Morphologie der Erythrozyten durch

ihre Größe, dem mittlerem korpuskulären Volumen (MCV) und ihrem Hämoglobingehalt, dem mittlerem korpuskulären Hämoglobingehalt (MCH) beschrieben werden.

Dabei definiert das MCV das durchschnittliche Volumen eines Erythrozyten, welches unter physiologischen Bedingungen mit einem Normbereich von 85 - 98 [fl] angegeben werden kann [7]. Dies erlaubt eine Charakterisierung der Erythrozyten als mikrozytär (MCV < Norm), normozytär (MCV = Norm) oder makrozytär (MCV > Norm). Weiterführend kann durch den MCH die absolute Menge an Hb pro Erythrozyt beschrieben werden, welche unter physiologischen Bedingungen mit einem Normbereich von 28 - 34 [pg] angegeben werden kann [7]. Dies erlaubt eine Charakterisierung der Erythrozyten als hypochrom (MCH < Norm), normochrom (MCH = Norm) oder hyperchrom (MCH > Norm). Ergänzend zu diesen Parametern ist als dritter Erythrozytenindex die mittlere korpuskuläre Hb-Konzentration zu nennen, welche die Konzentration des Hb innerhalb der Erythrozyten ausdrückt. Aufgrund der meist gleichgerichteten Veränderung von MCV und MCH verbleibt dieser Parameter häufig unverändert.

Nach MCV und MCH können Anämien als hypochrom mikrozytär, normochrom normozytär oder hyperchrom makrozytär charakterisiert werden. Diese Erscheinungsformen sind charakteristisch für die jeweilige Anämieformen und können im Rahmen der Diagnostik, Ätiologie begrenzen und Therapien spezifizieren (Tabelle 1).

| <b>Hypochrome mikrozytäre Anämie</b>   | <b>Normochrome normozytäre Anämie</b>  | <b>Hyperchrome makrozytäre Anämie</b>   |
|--|--|---|
| <i>Erythrozytenindizes:</i><br><b>MCH ↓, MCV ↓</b>   | <i>Erythrozytenindizes:</i><br><b>MCH norm., MCV. norm</b>   | <i>Erythrozytenindizes:</i><br><b>MCH ↑, MCV ↑</b>  |
| <i>Eisenmangelanämie</i><br><br><i>Anemia of chronic disease</i><br><br><i>Thalassämie</i> | <i>Hämolytische Anämie</i><br><br><i>Aplastische Anämie</i><br><br><i>Renale Anämie</i><br><br><i>Blutungsanämie</i> | <i>Megaloblastischer Anämie</i><br><br><i>Medikamentös-toxische Induktion</i><br><br><i>Anämie im Rahmen eines myelodysplastischen Syndroms (MDS)</i> |

**Tabelle 1: Klassifikation von Anämien nach Erythrozytenindizes MCV und MCH.** Einordnung von Anämien nach ihren morphologischen Erscheinungsformen beschrieben durch die hämatologischen Messparameter des durchschnittlichen Volumens eines Erythrozyten (MCV) und der absoluten Menge an Hämoglobin pro Erythrozyten (MCH). Dies erlaubt im Rahmen der Diagnostik mögliche Zuordnungen zu bedingenden Pathogenesen.

Für die Einteilung nach Ätiopathologien können vier unterschiedliche Entstehungsmechanismen beschrieben werden, welche in ihren Auswirkungen anämische Zustände induzieren können [7, 8]:

(1) Eine Störung der physiologischen Erythropoese führt zu einer verminderten Produktion von funktionsfähigen Erythrozyten und kann als Anämie bedingt durch Bildungsstörungen aufgefasst werden. Ursächlich kann ein Fehlen von Stimulationsfaktoren (Mangel an Erythropoetin), eine Störung in der Bildung und Ausreifung von erythropoetischen Stammzellen, eine Bildungsstörung bei Substratmangel (Desoxyribonukleinsäure- oder Hämoglobinbildungsstörungen) oder eine multifaktorielle Genese (Anämie bei chronischen Erkrankungen) zugrunde liegen.

(2) Gleichgerichtet wie eine verminderte Bildung von Erythrozyten kann ein gesteigerter Erythrozytenabbau zu einem quantitativen bzw. qualitativen Defizit führen. Korpuskuläre hämolytische (intraerythrozytäre) Anämien beschreiben Beeinträchtigungen der erythrozytären Integrität durch Membran-, Enzym- oder Hämoglobineffekte. Demgegenüber fassen extrakorpuskuläre hämolytische (extraerythrozytäre) Anämien Kausalitäten zusammen, welche durch externe Faktoren wie Allo- oder Autoantikörper, Arzneimittel, Infektionskrankheiten oder Stoffwechselstörungen eine Hämolyse bewirken.

(3) Eine Anämie kann durch eine akute oder chronische Blutung ausgelöst werden, welche mit einem Verlust von Erythrozyten einhergeht. Reduktionen der Erythrozytenverfügbarkeiten limitieren Sauerstofftransportkapazitäten.

(4) Der Pathologie der Anämie durch Verteilungsstörung liegt ein „*Pooling*“ von Blutzellen in der Milz zu Grunde, welches eine Umverteilung von Erythrozyten beschreibt. Dabei stehen umverteilte Erythrozyten nicht mehr dem Körperkreislauf zur Verfügung.

Über ätiopathologische Darstellungen von Anämien hinaus können Anämien auch nach ihrer Etablierungsgeschwindigkeit und dem Vorhandensein kompensatorischer Regulationen definiert werden. So können Anämien entweder als akut oder chronisch klassifiziert werden. Dazu können aus der Literatur keine genauen Definitionskriterien angeführt werden, sondern nur unscharfe Assoziationen von Anämien mit Etablierungszeiten und Ätiopathogenesen hergestellt werden [9, 10]. Demnach ist eine akute Anämie als ein plötzlicher Abfall der Hb-Konzentration zu definieren, welcher regelhaft durch Hämolyse oder akute Hämorrhagien hervorgerufen wird [9]. Eine chronische Anämie beschreibt demgegenüber eine sukzessive Abnahme der Hb-Konzentration, welche regelhaft durch Substratdefizite, chronische Erkrankungen oder vergleichbare Ätiologie begründet wird [9]. Nach einer weiteren Definition entwickle sich eine akute Blutungsanämie nach einem plötzlichen Blutverlust von mehr als 20% der Gesamtblutmenge, während chronische Blutungsanämien erst bestünden, wenn Defizite durch gesteigerte Erythropoese nicht mehr ausgeglichen werden könnten [10].

### 1.1.2 Epidemiologie der Anämie

Den Anämien wurde weltweit eine Prävalenz von rund 25% zugeschrieben, welche schätzungsweise 1,6 Milliarden Menschen mit einem anämischen Zustand assoziierte [2]. Dabei können Alter, Geschlecht und Lebensumstände als bedeutende Risikofaktoren benannt werden. In Darstellungen von Anämien in Industrienationen konnte die Prävalenz unabhängig der Ätiopathogenese auf ca. 10% geschätzt werden [11, 12].

Insbesondere Anämien induziert durch Bildungsstörungen von Erythrozyten und Hb zeigen eine hohe klinische Relevanz [13]. Bildungsstörungen sind häufig durch Nährstoffmangel bedingt, welcher als Resultat eines erhöhten Umsatzes oder unzureichender Aufnahme aufgefasst werden kann. Als bedeutendste Entität ist die Anämie im Zuge eines chronischen Eisenmangels zu nennen, welche ätiologisch 80% aller Anämien verantwortet [7]. Dabei sind besonders Säuglinge und im Wachstum befindliche Kinder durch einen gesteigerten Eisenbedarf gefährdet [2]. Frauen im gebärfähigem Alter sind als Risikopopulation aufgrund der Ausschöpfung von Eisenreserven durch Menstruation, Gravidität und Laktation zu umschreiben [2, 14, 15]. Dementsprechend konnte die höchste Prävalenz von Anämien in der Population der Kleinkinder (47,4 %) und der Schwangeren (41,8 %) beschrieben werden [2].

Als zweithäufigste Anämieform ist die Anämie bei chronischen Erkrankungen anzuführen, welche im Verlauf von Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Diabetes mellitus und malignen Erkrankungen möglicherweise durch Inhibition der Erythropoese induziert wird [7]. Studien konnten aufzeigen, dass insbesondere in Patientengruppen mit chronischen Nierenerkrankungen (33,5%), Krebserkrankungen (21,4%), chronischen Herzerkrankungen (17,8%), chronischen Darmerkrankungen (13,2%), rheumatoider Arthritis (11,9%) und Infektionen mit dem humanen Immundefizient Virus (10,2%) hohe Prävalenzen einer Anämie zu erwarten sind [16].

In Industrienationen gewinnen Anämien mit fortschreitendem Lebensalter (> 50 Lebensjahre) an Prävalenz, wobei eine Zunahme der Inzidenz mit jeder Lebensdekade beschrieben werden kann [11]. Dies konnte in Metaanalysen durch steigende Prävalenzen bei Männern (9,2% auf 23,9%) und Frauen (8,1% auf 24,7%) bestärkt werden [4, 5, 11]. Als zu hervorhebende Risikogruppe stellen sich Patienten von Pflegeheimen dar, bei welchen die Prävalenz eines anämischen Zustandes unabhängig der Ätiologie auf 48 - 60% bestimmt wurde [17, 18]. Diese Umstände sind im Zuge der gesellschaftlichen Altersentwicklung kritisch zu betrachten und steigern die Relevanz des Krankheitsbildes in der medizinischen Versorgung [19].

Global betrachtet, kann die ethnische Herkunft als weiterer unabhängiger Prädiktor definiert werden [5, 20]. Verschärft werden regionale Prävalenzen durch ungleiche Lebensumstände und ernährungsbezogene sowie medizinische Versorgungslagen und zeigen sich beispielhaft in Darstellung der Prävalenz von Anämien bei Frauen in Afrika (47,5%) und in Europa (19%) [2].

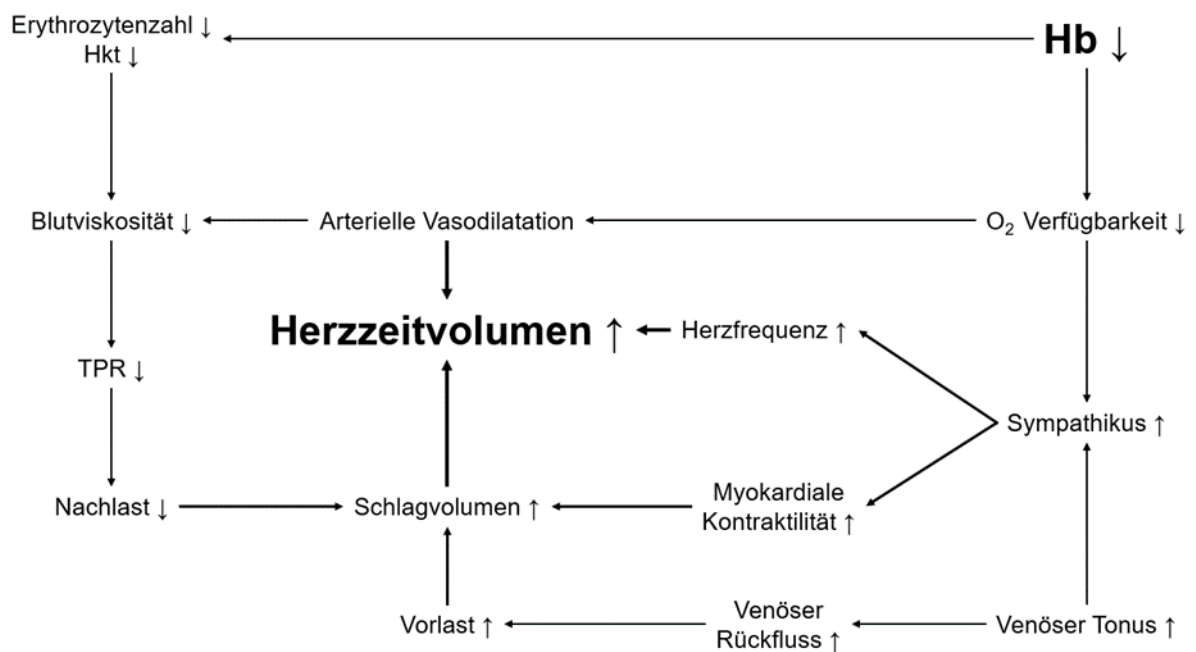
### 1.1.3 Hämodynamische Auswirkungen und Pathophysiologie der Anämie

Die Bereitstellung von Sauerstoff ( $O_2$ ) an Organe und Gewebe unterliegt vielfältigen Einflussgrößen wie Blutfluss und Verteilung (Hämodynamik), Sauerstofftransportkapazität des Blutes und Sauerstoffextraktion im Zielgewebe. Eine Anämie beeinflusst Sauerstoffverfügbarkeiten primär durch eine verminderte Sauerstofftransportkapazität des Blutes. Dies ist zu assoziieren mit möglichen konsekutiven Limitationen und einer Abnahme der arteriellen  $O_2$ -Konzentration, welche als anämische Hypoxie definiert wird [21]. Um einen hinreichenden Zustand der Sauerstoffversorgung zu erhalten und resultierende Dysfunktionen zu kompensieren, reagiert der anämische Organismus mit hämodynamischen Mechanismen und Steigerung der  $O_2$  Ausschöpfung (Utilisation).

Eine hämodynamische Kompensation verminderter Sauerstofftransportkapazitäten wird in erster Linie durch eine Steigerung des Herzzeitvolumens (HZV) vermittelt. Adaptionen beschreiben eine Verringerung der Nachlast, Erhöhung der Vorlast und positiv inotrope und chronotrope Anpassungen (Abb. 1). Eine Reduktion der Nachlast wird in der Pathophysiologie der Anämie durch verschiedene Mechanismen induziert, welche in ihrer Gesamtheit zu einem höherem kardialen Schlagvolumen führen [22]. Vasodilatation und Reduktion des totalen peripheren Widerstandes werden in Anämien vermittelt durch Hypoxie, verringerte Blutviskosität und eine vermehrte Stickstoffmonoxid (NO) Bereitstellung. Die Reduktion der Blutviskosität wird in diesem Zusammenhang durch die abnehmende Anzahl der Erythrozyten und Reduktion des Hkt bewirkt. Nach dem Frank-Starling-Mechanismus wird durch den verringerten systemisch-arteriellen Blutdruck (Nachlast), einhergehend mit gesteigerter Auswurfraction bei verringertem endsystolischem Füllungsvolumen sowie einem gesteigerten venösem Rückstrom (Vorlast) und einer gesteigerten linksventrikulären Füllung, ein erhöhtes Schlagvolumen begünstigt [22]. So kann unter anämischen Bedingungen das Mehrwirken des Herzens voranging durch gesteigerte Volumina erklärt werden [22]. Dazu konnte gezeigt werden, dass die kardiale Auswurfleistung bei anämischen Patienten bereits in Ruhe erhöht ist [23]. Ergänzend kann ein Zusammenhang zwischen erniedrigter Hb-Konzentration und erhöhtem Herzindex (Herzindex = Herzminutenvolumen/Körperoberfläche) beschrieben werden [23, 24]. Einhergehend mit der Steigerung der kardialen Auswurfleistung kann eine Steigerung des koronaren Fluss beschrieben werden [25], welche, durch physiologische Koronarreserven von 400 - 500% des koronaren Flusses in Ruhe, im gesunden Myokard keine Limitierung der hämodynamischen Kompensation darstellt [26].

Der hohe Wirkungsgrad wird zusätzlich durch gesteigerte Kontraktilität des Myokards, vermittelt durch inotrope Faktoren, gefördert. Eine Steigerung der Chronotropie wird durch eine Hypoxie bedingte Stimulation von Chemorezeptoren und einer Aktivierung sympathiko-adrenerger hormoneller Regulationen induziert [27–29]. In chronischen Anämien konnte eine

Steigerung der Chronotropie als relevanter Faktor entkräftet werden [22]. Gestützt wird dies durch klinische Beobachtungen, welche zeigten, dass ein intaktes Myokard eine Senkung der Hb-Konzentration auf 7,5 g/dl durch Steigerung des Schlagvolumens bei konstanter Herzfrequenz kompensieren kann [21, 26]. In experimentellen Studien konnte dargestellt werden, dass eine isovolumetrische Hämodilution erst ab einem Hkt von 15% nachteilige Effekte vermittelt [30]. Die Reduktion des Sauerstoffgehaltes, resultierend aus erniedrigter Hb-Konzentration, würde durch erhöhten koronaren Fluss und reduzierte Viskosität kompensiert werden [30]. Einhergehend mit diesen hämodynamischen Adaptionen kann im Rahmen einer Dauerbelastung eine linksventrikuläre Hypertrophie beschrieben werden, welche zu kongestiver Herzinsuffizienz führen kann [31].



**Abb. 1: Darstellung hämodynamischer Kompensationsmechanismen in akuter Anämie [22, 30].** Ausgehend von einer Abnahme der Verfügbarkeit des Hämoglobins (Hb) bzw. des Hämatokrit (Hkt) werden in anämischen Organismen Adaptionen angestoßen, um limitierende Zustände zu begrenzen. Unter anderem durch Reduktion des total peripheren Widerstandes (TPR) zeigt sich im Resultat eine Steigerung des Herzzeitvolumens mit dem Ziel, verringerte Transportfähigkeiten durch gesteigerte Zirkulation zu kompensieren.

Unter akut einsetzenden anämischen Bedingungen z.B. hervorgerufen durch Hämolyse oder Blutungen, hat der Organismus unzureichend Zeit, Funktionsverluste durch weitreichendere Kompensationsmechanismen auszugleichen [9]. Erst unter chronischen Bedingungen greifen weiterführende Kompensationsmechanismen wie vermehrte Bereitstellung von 2,3-Bisphosphoglycerat und eine Rechtsverschiebung der Sauerstoff-Bindungskurve in die Kompensation anämischer Zustände ein [21]. Im Rahmen der utilisatorischen Kompensation



wird die Sauerstoffextraktion im Zielgewebe begünstigt durch eine Reduktion der Bindungsstärke zwischen Hb und Sauerstoff. Durch Modulationen von Temperatur, Kohlenstoffdioxid-Partialdruck, pH-Wert und 2,3-Bisphosphoglycerat kann die Ausschöpfung des mit dem arteriellem Blut angebotenen Sauerstoffes optimiert werden [32]. Als weiterführender Kompensationsmechanismus kann eine Erhöhung der Verfügbarkeit von Erythropoetin (EPO) durch verstärkte Stimulation des „Hypoxie induzierter Faktor 1“ mit konsekutiver forcierter Ausreifung funktioneller Erythrozyten beschrieben werden.

#### **1.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie der Anämie**

Das klinische Erscheinungsbild der Anämie ist geprägt durch das Leitsymptom Blässe, welches jedoch nach Ätiologie klinisch sehr variabel erscheinen kann. Besonders im Rahmen chronischer Verläufe führen Adaptionsprozesse zu hinreichender Kompensation von Dysfunktionen, sodass die Diagnose einer Anämie häufig erst als Zufallsbefund nach einer laborchemischen Untersuchung auffällig wird.

Allgemeine Symptome der Anämie beruhen auf einer veränderten hämatologischen Funktion und pathophysiologischen Adaptionen. Diese treten in Abhängigkeit vom Manifestationsgrad der Dysfunktionen und der folgenden reduzierten Sauerstofftransportkapazität des Blutes auf [33]. Weitere Faktoren, welche die Krankheitschwere beeinflussen, sind die Etablierungsgeschwindigkeit der Anämie und die Koexistenz von kardiovaskulären Erkrankungen. Im Zuge einer peripheren Vasokonstriktion und Zentralisation im Sinne einer Umverteilung des Blutvolumens, tritt bei Patienten das Leitsymptom Blässe der Haut bzw. der Schleimhäute auf. Die verminderte Sauerstofftransportkapazität und das daraus resultierende Sauerstoffdefizit im Zielgewebe induziert Schwäche und evtl. Belastungsdyspnoe [7, 34]. Ebenfalls können Müdigkeit, Konzentrationsschwäche und Kopfschmerzen assoziiert sein, welche insgesamt unter verminderter Leistungsfähigkeit zusammengefasst werden können [7, 34]. Mit dem Ziel der Kompensation des Sauerstoffmangels reagiert der Organismus mit einer Steigerung des HZV, welches sich in der Symptomatik einer Tachykardie darstellen kann und vorrangig akuten Anämien zuzuordnen ist [7]. Einhergehend mit einem Anstieg der Herzleistung können bestehende kardiovaskuläre Vorerkrankungen, wie stabile Angina pectoris oder eine bestehende Herzinsuffizienz, in ihrer Pathologie verstärkt werden [7, 33]. Dazu zeigten klinische Untersuchungen jedoch auf, dass Anämie in Patienten mit Herzinsuffizienz nicht als unabhängiger Prädiktor für Gesamt-Mortalität und Gesamt-Hospitalisierung definieren werden kann [35].

Unter Etablierung eines akut anämischen Zustandes, voranging im Rahmen einer akuten Blutung, sind Kompensationsmechanismen limitiert, sodass gesteigerte Reduktionen der Hb-Konzentration mit Symptomen einer Hypovolämie einhergehen können [9]. Bei hochakutem Blutverlust sind Hb, Hkt und Erythrozytenzahlen häufig zunächst normwertig, da die

Konzentrationen im Blutvolumen initial gleichbleibend sind. Dadurch kann sich eine akute Blutungsanämie laborchemisch maskieren. Kompensationsversuche durch Umverteilung von Blutvolumen, Verdünnungseffekten und Steigerung des HZV haben eine begrenzte Wirksamkeit, sodass bei einem manifesten Blutverlust klinisch Symptome wie posturale Hypotension, veränderter Vigilanzstatus, kalte und blasse Haut, Tachykardie und Hyperventilation auftreten können [9].

Über die dargestellte Klinik hinaus konnte in klinischen Studien das Bestehen einer Anämie als ein unabhängiger Risikofaktor für generelle Hospitalisierung, Invalidität, Komorbidität und Sterblichkeit beschrieben werden [3–5]. Ergänzend konnte dargestellt werden, dass Anämien ungeachtet der Pathogenese mit einer gesteigerten Klinik und einer Steigerung der Hospitalisierungsdauer gegenüber nicht-anämischen Patienten einhergehen, wobei die Assoziation inverse mit der Hb-Konzentration bei Aufnahme korreliert werden konnte [36].

Ausgehend von Anamnese und klinischer Präsentation kann die Verdachtsdiagnose einer Anämie gestellt werden. Nach Verifizierung eines anämischen Zustandes richtet sich die weiterführende Diagnostik nach hämatologischen Ergebnissen und anamnestischen Indizien, ohne dass in aktueller Literatur ein evidenzbasiertes Vorgehen empfohlen werden kann. Als Leitbefunde zur Klärung der Ätiopathogenese dienen die erhobenen Erythrozytenindizes, welche weitere Diagnostik definieren.

Die jeweilige Therapie ist an der Grunderkrankung auszurichten, was die Relevanz differentialdiagnostischer Untersuchungen untermauert. So ist z.B. in Situationen von Mangelzuständen eine effektive Substitution physiologischer Speicher (z.B. bei Eisenmangel) oder bei akuten Blutungen eine interventionelle oder operative Blutstillung zu erwägen. Hervorzuheben sind Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten als Mittel der Wahl in Notfallsituationen, welche jedoch insbesondere bei chronischen Anämien aufgrund von Adaptionsprozessen zunehmend restriktive Anwendung erfahren [33, 37]. Eine individuelle physiologische Kompensationsfähigkeit und eine variable Dynamik der Anämien drückt aus, dass klinische Ausprägungen unzureichend mit bestimmten Hb-Konzentrationen korrelieren, was diese als alleinigen Trigger zur Transfusion entwertet [38].

## 1.2 Myokardinfarkt

Als Myokardinfarkt wird eine irreversible Schädigung des Myokards definiert, welche durch ein Missverhältnis aus Sauerstoffangebot und –bedarf induziert wird [39]. Im Zuge einer absoluten Koronarinsuffizienz entstehen Myokardnekrosen [7].

### 1.2.1 Klinische Klassifikation des Myokardinfarktes

Zur Diagnosestellung der durch typische, anhaltende Infarktsymptomatik gestellten Verdachtsdiagnose eines akuten Koronarsyndroms (ACS), müssen laborchemische und klinische Kriterien erfüllt sein [7]:

(1) Das Hauptkriterium muss erfüllt werden. Dies beschreibt die Dynamik eines kardialen Biomarkers. Die höchste Relevanz besitzt Troponin I/T mit mindestens einem erhobenen Messwert über der 99. Perzentile des oberen Referenzbereiches.

(2) Ein Nebenkriterium muss erfüllt werden. Dazu zählen ischämische Beschwerden, Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG), Bildgebung mit Verlust vitalem Myokards, Nachweis neuer regionaler Wandbewegungsstörungen, Nachweis eines intrakoronaren Thrombus durch Angiographie oder Nachweis myokardialer Schädigung im Rahmen einer Autopsie.

Unter Achtung diagnostischer Ergebnisse kann das ACS nach Dynamik kardialer Biomarker und EKG-Befunden differenziert werden. In Beschreibung der Ausdehnung des Infarktareales können transmurale Myokardinfarkte als ST-Streckenhebungs-Infarkt (STEMI) und Myokardinfarkte der Innenschicht als Nicht-ST-Streckenhebungs-Infarkt (NSTEMI) beschrieben werden. Direkte und indirekte Infarktzeichen in benachbarten EKG-Ableitungen erlauben Hinweise auf Lokalisationsmanifestationen. So präsentiert sich ein Vorderwandinfarkt regelrecht mit Auffälligkeiten in den Ableitungen I, aVL, V<sub>2-5</sub> und ein Hinterwandinfarkt überwiegend mit Auffälligkeiten in den Ableitungen II, III, aVF. Daraus ergibt sich eine Zuordnung beeinträchtigter Areale zu Versorgungsgebieten der Koronararterien unter Achtung interindividueller Versorgungstypen [7]. Demnach werden Myokardinfarkte als Vorderwandinfarkt bezeichnet, wenn eine Pathologie des Ramus interventricularis anterior der A. coronaria sinistra (RIVA) vorliegt. Hinterwandinfarkte zeichnen sich durch eine Pathologie der Arteria coronaria dextra (RCA) oder des Ramus interventricularis posterior der A. coronaria dextra (RIVP) aus.

Die *European Society of Cardiology (ESC)* klassifiziert Myokardinfarkte basierend auf Pathogenesen sowie klinischen und prognostischen Charakteristika (Tabelle 2) [39]. Dabei sind nicht imitierte (Typ 1, 2, 3) von durch Interventionen induzierten (Typ 4a, 4b, 5) Infarktsubtypen zu unterscheiden. Aus der pathophysiologischen Einteilung resultieren angepasste Therapiestrategien, welche jeweilige Charakteristiken aufgreifen und spezifisch interpretieren.

|  |
|--|
| <b>Typ 1: Spontaner Myokardinfarkt</b>   |
| <i>Spontaner Myokardinfarkt bedingt durch atherosklerotische Plaque-Ruptur, Ulzerationen, Erosionen oder Dissektion mit folgender intraluminaler Thrombusbildung in Koronararterie/n. Als Folge dessen ist eine durch direkte Reduktion des myokardialen Blutflusses oder durch Bildung eines Thrombozytenthrombus induzierte Myokardischämie mit einhergehender Nekrose zu umschreiben. Häufig besteht eine Assoziation zu koronaren Herzerkrankungen.</i>  |
| <b>Typ 2: Myokardinfarkt sekundär nach Ischämie</b>  |
| <i>Ischämie bedingte Myokardnekrose unabhängig von koronarer Plaqueinstabilität hervorgerufen durch unzureichendes Sauerstoffangebot z.B. im Rahmen von koronarer Endotheldysfunktion, Koronarspasmen, Koronarembolie, tachykarder bzw. brachykarder Herzrhythmusstörungen, Anämie, Hypotension/Hypertension oder respiratorischer Insuffizienz.</i>   |
| <b>Typ 3: Plötzlicher Herztod nach Infarktgeschehen</b>  |
| <i>Plötzlicher Herztod, welcher klinische Zeichen einer Myokardischämie andeutet wobei die Diagnose nicht vor Todeseintritt durch Biomarker Bestimmung verifiziert werden kann (autoptischer Hinweis)</i>  |
| <b>Typ 4a: Myokardinfarkt im Zusammenhang mit perkutaner kardialer Intervention</b>  |
| <i>Myokardinfarkt assoziiert mit perkutaner Koronarintervention zeichnet sich durch einen Anstieg des cTn Wertes über &gt; 5 x 99. Perzentil bei Patienten mit normwertigen Basalwerten oder einen Anstieg des cTn Wertes über 20% bei erhöhten Basalwerten im Rahmen einer perkutanen Intervention aus. Darüber hinaus ist diese Dynamik assoziiert mit infarkttypischer Symptomatik, neu auftretenden EKG Veränderungen, angiographisch darstellbarer Flussabnahme in Koronargefäßen bzw. Embolien, in Bildgebung darstellbarer neu auftretendem Verlust von vitalem Myokard oder neuen regionalen Wandbewegungsstörungen.</i> |
| <b>Typ 4b: Myokardinfarkt im Zusammenhang mit Stent-Thrombose</b>  |
| <i>Myokardischämie vermittelte Nekrose assoziiert mit Stent-Thrombose, welche durch Angiographie oder Autopsie verifiziert wird und mit erhöhten oder erniedrigten kardialen Biomarkern einhergeht.</i>  |
| <b>Typ 5: Myokardinfarkt im Zusammenhang mit koronarer Bypassoperation</b>   |
| <i>Myokardinfarkt assoziiert mit koronarer Bypassoperation wird definiert durch Erhöhung von kardialen Biomarkern über &gt; 10 x 99. Perzentil bei Patienten mit normwertigen cTn Basalwerten im Rahmen einer koronaren Bypassoperation. Zusätzlich sind neu auftretende pathologische Q-Wellen oder Linksschenkelblock, angiographisch darstellbare neue Okklusionen in nativen Gefäßen oder dem Transplantat, in der Bildgebung darstellbaren Verlust von vitalem Myokard oder neue regionale Wandbewegungsstörungen als Kriterien heranzuziehen.</i>  |

**Tabelle 2: Klassifikation der Myokardinfarkte durch European Society of Cardiology, modifiziert nach [39].** Nach Pathogenese, klinischen und prognostischen Charakteristika sind fünf Typen des Myokardinfarktes zu unterscheiden.

## 1.2.2 Epidemiologie und Ätiologie des Myokardinfarktes

Die Prävalenz des akuten Myokardinfarktes konnte mit 272 pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland beziffert werden und definierte sich als zweithäufigste Todesursache nach chronisch ischämischen Herzkrankheiten [40]. Über das Akutereignis hinaus sind Assoziationen zu Sekundärkomplikationen zu beschreiben, welche die epidemiologische Tragweite steigern.

Als relevanteste Pathogenese des akuten Myokardinfarktes ist die koronare Herzerkrankung zu beschreiben, welche in Industrienationen in ihrer Konsequenz zu den häufigsten Todesursachen zählt und 20% aller Todesfälle in Deutschland verursacht [7]. Die stationäre Morbiditätsziffer der ischämischen Herzkrankheiten betrug im Jahre 2013 bei Männern 1.108 und bei Frauen 519 pro 100.000 Einwohnern [40]. Die für die Pathogenese der koronaren Herzerkrankung elementare Atherosklerose der Herzkranzarterien stellt eine chronisch entzündliche Erkrankung der Intima von multifaktorieller Genese dar, welche sich an Prädilektionsstellen mit forcierter hämodynamischer Belastung manifestiert. Als Risikofaktoren können Tabakkonsum, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, positive Familienanamnese, männliches Geschlecht und fortschreitendes Lebensalter bedingend wirken. Progressive Stenosierung und Plaqueinstabilität mit konsekutiver Koronarembolie induzieren eine absolute Koronarinsuffizienz. Die Assoziation von Myokardinfarkten zur koronaren Herzerkrankung beschreibt nach ESC Klassifikation einen Typ 1 Myokardinfarkt [39].

Myokardinfarkte im Zuge eines unzureichenden O<sub>2</sub>-Angebot, unabhängig atherosklerotischer Genese, können als Myokardinfarkte ohne obstruktive koronare Atherosklerose (MINOCA) ätiologisch beschrieben werden. Definiert werden diese Infarktformen durch klinische Evidenz eines Myokardinfarktes bei angiographisch dargestelltem normwertigen Koronarstatus bzw. ein umschriebenes Ausmaß der Stenosierung von unter 50 %. Deren Prävalenz wurde in Studien mit 8,8 - 9,1 % [41, 42] bzw. bei Frauen mit 15,1% und bei Männern mit 6,8% [43] beschrieben. Zu nennen sind als Typ 2 Myokardinfarkte nach ESC Klassifikation Myokardinfarkte im Zuge von endothelialen Dysfunktionen, Koronarspasmen, Arrhythmien, Anämien, Hypertonie/Hypotonie oder respiratorischer Insuffizienz [7, 39].

Über diese relevanten, nicht imitierenden Pathogenesen hinaus sind auch Myokardinfarkte nach Interventionen zu umschreiben, welche durch Manipulation an Koronargefäßen induziert werden und im Zuge notwendiger Therapie kardiovaskulärer Grunderkrankungen auftreten. Diese sind als Myokardinfarkte Typ 4 und 5 nach ESC Klassifikation zu umschreiben. [39]

### 1.2.3 Pathophysiologie und Klinik des Myokardinfarktes

Die Pathologie des Myokardinfarktes bzw. der Myokardnekrose ist das Resultat einer relevanten Beeinträchtigung der koronaren Blutversorgung und einhergehenden pathophysiologischen Adaptionen.

Unter Minderversorgung mit O<sub>2</sub> im Rahmen relativer oder absoluter Koronarinsuffizienzen wird die mitochondriale oxidative Phosphorylierung limitiert, welche als biologischer Prozess die Grundlage der aeroben Energiegewinnung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bildet. Eine kompensatorische Steigerung der anaeroben Glykolyse zur Bereitstellung von ATP führt zu einer Akkumulation von Wasserstoffionen und Laktat. Dies induziert intrazelluläre Azidose und eine Reduktion der Energiebereitstellung. Beeinträchtigungen des Energiemetabolismus werden verschärft durch Ionenverschiebungen, welche Herzrhythmusstörungen begünstigen, Zellschwellung induzieren und die Kontraktilität nachhaltig beeinträchtigen. [44–46] In diesem Zusammenhang können zwei Mechanismen skizziert werden, welche einen Zelltod induzieren können. Oncosis bezeichnet eine Form des akzidentellen Zelltodes, welche getriggert durch exogene Faktoren durch eine Zellschwellung charakterisiert wird. Apoptose hingegen ist eine Form des programmierten Zelltodes, welche sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Situationen als Reaktion auf exogene und zellinterne Prozesse einen Zelluntergang durch Schrumpfen herbeiführt. Durch Abhängigkeit apoptotischer Prozesse von der Verfügbarkeit des Energieträgers ATP scheint deren Ausmaß begrenzt und auf die Frühphase bzw. Reperfusionphase limitiert zu sein. [47–49]

Infarktgrößen unterliegen Dauer und Relevanz der Minderperfusion, Größe der Ischämie unterworfenen Myokardarealen und der Versorgung durch Kollaterale [44]. In experimentellen Studien kann darüber hinaus der sogenannte Reperfusionsschaden („*Reperfusion injury*“) dargestellt werden [50, 51]. Dieser beschreibt scheinbar paradoxe Mechanismen, durch welche die Reperfusion von zuvor Ischämie unterworfenem Myokard irreversible Schäden am Myokard induziert, vermittelt durch Arrhythmien, kontraktile Dysfunktionen, mikrovaskuläre Beeinträchtigung und Induktion von Apoptose und Nekrose [52]. Limitierungen der Myokardfunktion durch Zelltod werden durch Adaptionen des Restmyokards kompensiert, mit dem Ziel kardiale Leistung zu erhalten und ventrikuläre Belastung zu reduzieren. Als möglicher Mechanismus kann der Umbau („*Remodeling*“) des Myokards beschrieben werden, welcher Hypertrophie, Apoptose von Myozyten, Etablierung neuer Myozyten aus Stammzellen und Gewebeanpassungen umfasst [48]. Bei Fortbestehen von Leistungslimitierungen kann dies linksventrikuläre Dilatation und Herzversagen induzieren.

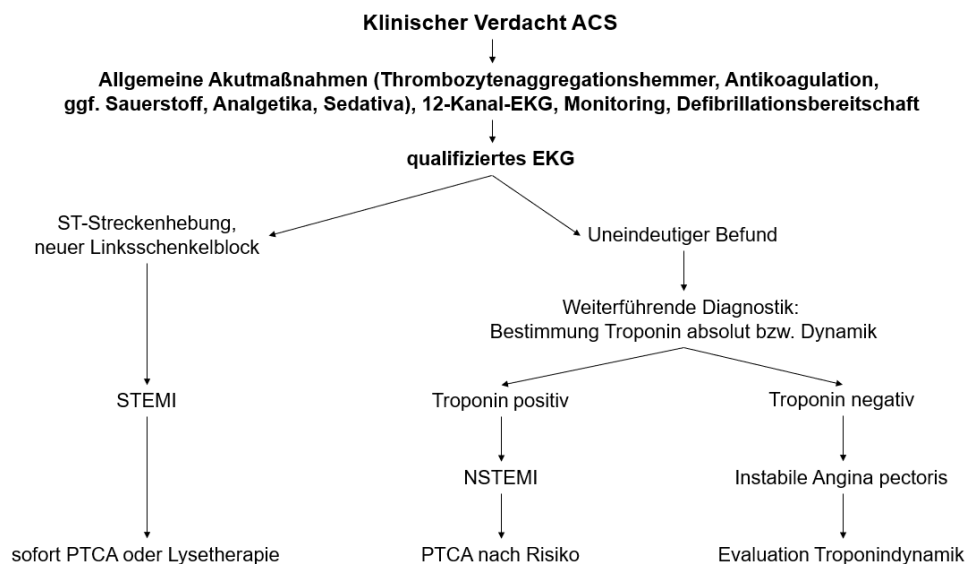
Der klinischen Darstellung des Myokardinfarktes lassen sich typische Symptome zuschreiben, welche sich beim individuellen Infarktpatienten jedoch als heterogen präsentieren

können. Intensive, anhaltende präkordiale Schmerzen mit stechenden, brennenden Schmerzausstrahlungen nach z.B. linksthorakal, in den linken Arm, in die linke Schulter, in Hals- oder Kieferregion bzw. ins Epigastrium stehen dabei Myokardinfarkten ohne Schmerzsymptomatik, sogenannten „stummen“ Infarkten, gegenüber. In rund 60% der Fälle wird ein retrosternales Druckgefühl beschrieben. Symptomen ist gemein, dass sie anhaltend bestehen und sich nicht durch körperliche Entlastung oder der Applikation von Nitroglyzerin modulieren lassen. Zusätzlich zum Leitsymptom können vegetative Symptome wie Schwitzen, Übelkeit, Erbrechen, Schwächegefühl oder Angst bestehen. [7]

Einhergehend mit Symptomen und patho-morphologischen Anpassungen sind Komplikationen zu erwarten. Zu den Frühkomplikationen (innerhalb 48 Stunden) zählen der plötzliche Herztod, Herzrhythmusstörungen, akute Linksherzinsuffizienz, Rupturen im Zuge von Myokardnekrosen oder der kardiogenen Schock. Als Spätkomplikationen (mittel- und langfristige Folgeerkrankungen) können Ventrikelseptumaneurysmen, Reinfarkte, Perikarditis, Herzinsuffizienz und arterielle Embolien mit Risiko für Schlaganfälle beschrieben werden. [7]

### 1.2.4 Diagnostik und Therapie des Myokardinfarktes

In der Therapie des Myokardinfarktes bzw. dessen klinischer Manifestation in Form des ACS ist zwischen allgemeinen Akutmaßnahmen und befundabhängigen Therapien zu differenzieren (Abb.2).



**Abb. 2: Diagnostik und Therapie des akuten Myokardinfarktes, modifiziert nach [53].** Ausgehend von infarkttypischer Symptomatik eines akuten Koronar Syndroms (ACS) wird unter Akutmaßnahmen eine Evaluation begonnen. Eine qualifiziertes Elektrokardiogramm (EKG) bestimmt die weiteren Abläufe. Ausgehend von EKG-Befunden kann ein ST-Streckenhebungs-Infarkt (STEMI) diagnostiziert werden, welcher eine sofortige Intervention fordert. Bei unklaren EKG-Befunden ist eine Troponindynamik zu bestimmen, welche zwischen Nicht-ST-Streckenhebungs-Infarkt (NSTEMI) und instabiler Angina pectoris unterscheiden lässt.

## 1.3 Anämie und Herzinfarkt

Anämien können als häufige Komorbidität bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt diagnostiziert werden, woraus sich eine hohe klinische Relevanz und eine Notwendigkeit zur Evaluation von Therapien und Interaktionen ergibt [54, 55]. Dabei kann das Risiko für Mortalität, Morbidität und Hospitalisierung kardiovaskulärer Erkrankungen vermittelt durch Anämien als gleichwertig zu den vier etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren Nikotinkonsum, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus und Hypercholesterinämie beschrieben werden [56].

### 1.3.1 Epidemiologie Anämie und Herzinfarkt

Konkordant zur gesamtgesellschaftlichen Prävalenz der Anämie lässt sich eine weite Verbreitung der Anämie bei Patienten umschreiben, welche einen akuten Myokardinfarkt erleiden. Dabei sind Anämien, welche zum Zeitpunkt der Manifestation eines akuten Myokardinfarktes Bestand haben, von im Rahmen der Pathologie des Myokardinfarktes und konsekutiver Therapie erworbenen Anämien („*hospital-acquired anemia*“) zu differenzieren.

Bezogen auf die allgemeine Patientenpopulation konnte die Prävalenz von Anämien bei Aufnahme von Patienten mit akutem Myokardinfarkt auf 14% - 17,8% beziffert werden [54, 55]. Im Rahmen von Studien konnte eine erhöhte epidemiologische Relevanz der Komorbidität Anämie in Patienten mit fortschreitendem Lebensalter (> 65 Jahre) beschrieben werden. So konnte in klinischen Untersuchungen bei 43% der im Rahmen eines bestätigten akuten Myokardinfarktes hospitalisierten älteren Patienten eine Anämie nachgewiesen werden [57]. Gleichgerichtet konnte in einem Studienkollektiv dargestellt werden, dass rund 31% der Patienten mit NSTEMI bei Aufnahme einen anämischen Zustand aufwiesen [58].

Mit der Diagnose der chronischen Anämie gehen weitere Charakteristika einher, welche in Evaluationen von Effekten der Pathophysiologie der Anämie zu differenzieren sind. So zeichnete sich die anämische Patientenpopulation durch ein höheres Lebensalter, einen höheren prozentualen Anteil von Frauen und höhere Prävalenz für Komorbiditäten wie eingeschränkte Nierenfunktion, chronische Herzinsuffizienz und Blutungen aus [59–62].

Gegenüber bei Aufnahme bestehenden Anämien sind „*hospital-acquired anemia*“ als Ergebnisse von Pathologien und Therapien zu interpretieren. Patienten mit normwertiger Hb-Konzentration bei Aufnahme mit der Diagnose Myokardinfarkt entwickelten Untersuchungen zufolge zu 45,4% eine Anämie im Rahmen ihrer Hospitalisierung [63].

### 1.3.2 Pathophysiologische Interaktion zwischen Anämie und Myokardinfarkt

Anämien wird das Potential zugeschrieben, im Rahmen eines Myokardinfarktes mit pathologischen Prozessen zu interagieren und adverse Effekte zu induzieren. Dabei scheint es



pathophysiologisch und klinisch plausibel, dass Anämien eine Beeinträchtigung des *Outcomes* für Patienten mit Myokardinfarkt darstellen und myokardialer Ischämien verstärken.

Im Rahmen der Hämodynamik kann das Sauerstoffangebot an das Myokard als Zusammenhang von HZV und Hb umschrieben werden (Gleichung 1) [64]:

$$DO_2 = HZV \times (Hb \times 1,34 \times S_aO_2 + p_aO_2 \times 0,0031)$$

**Gleichung 1: Berechnung des Sauerstoffangebots an Gewebe [64].** Darstellung des Sauerstoffangebotes ( $DO_2$ ) in Abhängigkeit von Herzzeitvolumen (HZV), Hämoglobinkonzentration (Hb), maximaler Sauerstoffbindungskapazität (Hüfner-Zahl: 1,34 ml O<sub>2</sub>/g Hämoglobin), arterieller Sauerstoffsättigung ( $S_aO_2$ ), Sauerstoffpartialdruck ( $p_aO_2$ ) und dem Löslichkeitskoeffizienten von O<sub>2</sub> im menschlichen Plasma (0,0031/mmHg).

Myokardinfarkte sind unabhängig ihrer Ätiologie mit Hypoperfusion in Form von lokaler Flusslimitierung und systemischer Perfusionsreduktion assoziiert [62]. Um Defizite auszugleichen und das HZV zu steigern, erfolgen kardiovaskuläre Adaptionen, welche mit einer Mehrbelastung des Myokards und einem Angebot-Bedarf Mismatch einhergehen [62, 65]. Dies unterliegt in der Anämie gesteigerter Relevanz durch Limitierungen des Sauerstofftransportes, welcher sich in reduziertem Sauerstoffangebot an das gefährdete Myokard präsentiert [66]. Im anämischen Zustand besteht bereits in Ruhe hohe myokardiale Sauerstoffextraktion und eine limitierte Leistungsreserve. Besonders im Rahmen von Koronararterienstenosen bzw. -Okklusionen führt das damit einhergehende reduzierte Reservevermögen zu einer Reduktion der myokardialen O<sub>2</sub> Versorgung, wodurch potentielle myokardiale Ischämien funktionell und hämodynamisch relevant werden können. Durch Erhöhung des adrenergen Tonus im Rahmen einer Anämie wird der Sauerstoffbedarf weiter gesteigert und Ischämien gefördert [67].

Untersuchungen zeigten, dass experimentell induzierte, manifeste normovolämische Anämien in ansonsten gesunden Probanden mit einer adäquaten und hinreichenden Oxygenierung einhergehen, was eine erhebliche physiologische Toleranz darstellt [68]. Demgegenüber konnten in Evaluation von tierexperimentellen Studien Anzeichen einer beeinträchtigten kardialen Kompensation niedriger Hb-Konzentrationen im Rahmen von ischämischen Herzerkrankungen gefunden werden [69], welche Hinweise auf Dysfunktionen in Belastung und eine Verschärfung myokardialer Beeinträchtigung im Myokardinfarkt erbringen. Kausal limitieren koronarer Herzerkrankungen die Kompensationsfähigkeit gegenüber verminderter Sauerstoffversorgung und reduzieren die Toleranz gegenüber abnehmenden Sauerstoffverfügbarkeiten [70]. In experimentellen Studien konnten chronisch induzierte Eisenmangelanämien als Entität beschrieben werden, welche die myokardiale Infarktgröße steigern und die kardiale Funktion sowie das Überleben nach induziertem Myokardinfarkt verringern [71].

Im Rahmen von chronischen Anämien führen Adaptionen, welche initial eine Steigerung des HZV induzieren, zu einer myokardialen Remodellierung im Sinne linksventrikulärer Dilatation und exzentrischer linksventrikulärer Hypertrophie [72, 73]. Hypertrophien wird zugeschrieben, Herzversagen zu prädisponieren und ischämische Herzerkrankungen zu eskalieren, wobei eine Zuordnung der Schwere und Dauer einer Anämie zum Ausmaß der Remodellierungseffekte unklar scheint [74].

Weiterführend kann ein Zusammenhang zwischen Anämie und erhöhter Blutungskomplikationen aufgezeigt werden. Bei anämischen Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigte sich ein gesteigertes Risiko für hämorrhagische adverse Effekte im Vergleich zu Patienten mit normwertiger Hb-Konzentration. [75]

Über die Funktion des Gastransportes hinaus kann den Erythrozyten weiterführende Funktionen zugesprochen werden, welche im Rahmen der Pathophysiologie des Myokardinfarktes relevant sind und im Zuge eines anämischen Zustandes modifiziert werden. Im Vergleich zu anderen Zelltypen sind insbesondere Erythrozyten mit potenten und hoch aktiven antioxidativen Enzymen wie Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase ausgestattet [76]. Studien konnten Annahmen formulieren, dass die Reperfusion von ischämischem Myokard myokardiale Schäden induziert und linksventrikuläres Remodelling fördert. Oxidativer Stress steht im Verdacht myokardiale Schäden im Rahmen von post-ischämischen Reperfusionphase hervorzurufen [77]. Störungen der Integrität von Erythrozyten im Rahmen anämischer Zustände könnten Effekte beeinflussen.

Über mögliche direkte Einflüsse von Anämien auf die Pathologie des Myokardinfarktes konnte die Anämie als „fünfter kardiovaskulärer Risikofaktor“ neben etablierten Prädiktoren definiert werden [56]. Diesem kann die Definition eines Risikofaktors als biologische Bedingung, Substanz oder Verhalten zu Grunde gelegt werden, welcher mit einer Pathologie assoziiert wird, aber nicht nachweislich einen kausalen Auslöser darstellt. Dem folgend sind Anämien assoziiert mit erhöhter Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen, ausgedrückt in Mortalität, Morbidität und Hospitalisierung.

In Beschreibung von Assoziationen von Anämien und kardialem *Outcome* ist die Evaluation von *Confoundern* mit einzubeziehen. So können Anämien mit bestimmbar Faktoren wie beispielsweise höherem Lebensalter oder Geschlecht verknüpft, aber auch mit nicht greifbaren Faktoren wie inflammatorischem Status oder kardiovaskulären Komorbiditäten verbunden sein [74]. Dies erschwert Interpretationen und Darstellungen pathophysiologischer Effekte von Anämien und limitiert Aussagen über klinische Relevanz.

### 1.3.3 Klinische Darstellung Anämie und Myokardinfarkt

In adjustierten und bereinigten Analysen kann für Patienten mit einer manifesten Anämie bei Aufnahme im Vergleich zur Referenzpopulation eine höhere Mortalität im Rahmen der Pathologie Myokardinfarkt aufgezeigt werden [57–59, 62, 63, 78, 79], wobei auch gegensätzliche Studienergebnisse formuliert werden können [60, 61, 80].

Das Vorliegen reduzierter Hb-Konzentrationen konnte als ein unabhängiger Indikator für nachteiliges kardiovaskuläres *Outcome* und Sterblichkeit in der Frühphase nach Myokardinfarkt definiert werden. In Differenzierung nach Hb-Konzentration konnte für anämische Patienten eine Zunahme der kardiovaskulären Mortalität pro 1 g/dl Abnahme des Hb-Wertes beschrieben werden, welche diese Reduktion als „*dose-dependent*“ Effekt charakterisierte. [59] Bestärkt werden konnte dies durch Beschreibung langfristiger Beobachtungen, indem eine Assoziation von chronischen Anämien mit erhöhter 1-Jahres-Mortalität nach Myokardinfarkt aufgezeigt werden konnte [63]. Metaanalysen konnten in Evaluation von Nachbeobachtungen anämischer Patienten mit Myokardinfarkt bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 18 Monaten eine signifikant erhöhte Mortalität beschreiben [62]. Über Ergebnisse hinaus, welche darstellen, dass eine Anämie mit einer höheren 30-Tage-Mortalität als auch einer höheren Langzeit-Mortalität zu assoziieren sei, konnte Frauen insgesamt eine bessere Prognose zugeschrieben werden [79]. Dies impliziert auch geschlechtsabhängige Differenzen in Anämie in Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Dabei konnte Anämie nicht nur mit erhöhter Mortalität assoziiert werden, sondern ihr konnte auch eine höhere Komplikationsrate zugeschrieben werden, welche sich z.B. in höheren Blutungsraten, höherer Rate der Entwicklung von Herzversagen, höheren Raten des Auftretens eines Schocks oder eines Herzstillstandes ausdrückte [59, 80]. Folgend könnte durch die Evaluation der Hb-Konzentration neben weiteren Parametern wie Alter, Puls, Blutdruck, Herzenzyme und EKG-Veränderungen, definiert durch den *Global Registry of Acute Coronary Event (GRACE)* – Risikoscore, die Prognose von Patienten mit ACS spezifiziert werden [81].

Demgegenüber stehen Studien, welche keine Assoziation von Anämien bei Aufnahme und nachteiligem *Outcome* auffassen können. So konnte in Nachbeobachtungen von anämischen Patienten mit ACS über eine Beobachtungszeit von sechs Monaten keine Erhöhung der Mortalität beschrieben werden [61]. Auch in klinischer Evaluation des direkten Effektes einer Anämie bei Entlassung aus dem Krankenhaus auf die 1-Jahres-Mortalität nach akutem Myokardinfarkt konnte keine signifikant erhöhte Letalität aufgezeigt werden [60]. Ergänzend konnte auch während des Krankenhausaufenthalt von anämischen Patienten mit Myokardinfarkt keine höhere Gesamtmortalität beschrieben werden [80]. Assoziationen seien möglicherweise als Resultat von Demographie, Komplikationen, Revaskularisation und höheren Komorbiditätsraten im Sinne von Störgrößen zu interpretieren [60, 61].

### 1.3.4 Korrektur von Anämien im Myokardinfarkt

Studien diskutieren eine mögliche klinische Assoziation von Anämie mit Steigerung der Mortalität nach Myokardinfarkt. Zur Kompensation möglicher adverser Effekte einer Anämie wurde der Einsatz von Erythrozytenkonzentraten evaluiert. Die Notwendigkeit von Erythrozytentransfusionen während der Hospitalisierung konnte bei anämischen Patienten mit Myokardinfarkt als signifikant höher im Vergleich zum Kontrollkollektiv beschrieben werden [61]. Weiterhin konnte eine Steigerung des Mortalitätsrisikos besonders in der Frühphase nach Myokardinfarkt charakterisiert werden, welche die Bedeutsamkeit von frühen Interventionen zur Korrektur von Anämien und somit Verbesserung von Kurz- und Langzeitüberleben zu stärken scheint [62]. Der Benefit von Erythrozytentransfusionen, um Anämien im Rahmen von ACS zu korrigieren, wird kontrovers diskutiert.

In tierexperimentellen Studien wurde, um den Effekt von Erythrozytentransfusion auf das *Outcome* nach Myokardinfarkt zu untersuchen, die Hb-Konzentration anämischer Versuchstiere unmittelbar nach der Etablierung eines Myokardinfarktes durch Transfusion auf einen Normwert korrigiert. Obwohl keine signifikanten Verbesserungen des Überlebens beschrieben werden konnten, reduzierte eine moderate Korrektur des Hb-Wertes die Infarktgröße und verbesserte die kardiale Funktion. Demgegenüber zeigten weiterführende Ergebnisse dieser Studie auf, dass bei einer vollständigen Korrektur kein Benefit, sondern signifikant gesteigerte Infarktgrößen darzustellen waren. [71]

In klinischen Studien konnte durch die Anwendung von Erythrozytenkonzentraten nur bei Patienten mit Hb-Konzentrationen  $< 8$  g/dl oder Hkt  $< 33\%$  ein prognostisch günstiger Effekt beschrieben werden. Bei Patienten mit einer Hb-Konzentration  $> 10 - 11$  g/dl oder Hkt  $> 36,1\%$  waren Transfusionen hingegen mit Beeinträchtigungen bzw. höherer Mortalität im Rahmen des Myokardinfarktes assoziiert [55, 57, 62]. Dabei sind über die totale Hämoglobinbeeinträchtigungen hinaus auch Patientenspezifitäten zu achten, welche aufgrund von Komorbiditäten und altersabhängiger Abnahme der funktionellen Reserven mögliche kompensatorische Mechanismen limitieren und höherer Vulnerabilität für Anämie assoziierte Ereignisse forcieren [82, 83]. Besonders nach akuten Blutverlusten konnte aufgezeigt werden, dass eine liberale Transfusionsstrategie das Auftreten von ischämischen Ereignissen und Gesamtmortalität reduzieren könnte [83].

Diese Studienergebnisse aus experimenteller und klinischer Forschung legen nahe, dass der Benefit aus einer Erythrozytentransfusion an gesteigerte Reduktion der Hb-Konzentration gebunden sind und moderate Hb-Limitierungen nicht im Sinne einer Besserung des *Outcome* nach Myokardinfarkt von einer Transfusion profitieren.

## 1.4 Zielsetzung der Ausarbeitung

Große randomisierte Studien assoziieren eine Anämie mit einer Verschlechterung des *Outcome* nach akutem Myokardinfarkt [57, 59, 62, 63]. Aus Achtung hoher Prävalenzen bzw. Inzidenzen von Anämien und akuten Myokardinfarkten ergibt sich eine hohe klinische Relevanz [40, 54, 55, 57]. Damit verbundene pathophysiologische Mechanismen sind bisher unvollständig verstanden und durch Limitierungen erschwert. Diese Arbeit setzt sich die Arbeitshypothese, dass eine isoliert bestehende Anämie zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion nach Myokardinfarkt führt, assoziiert mit oxidativem Stress. Zielsetzung der Untersuchungen ist eine Charakterisierung der kardiovaskulären Adaptionen in einem anämischen Mausmodell basal und während eines Ischämie/Reperfusionseignisses. Ergänzend soll der Redoxstatus anämischer Versuchstiere untersucht werden.

Zur Untersuchung der Pathophysiologie von Anämien soll an gesunden Wildtyp-Mäusen durch repetitive Punktion eine akute Blutungsanämie induziert werden. Dies erlaubt die Untersuchung einer isoliert bestehenden Anämie in ansonsten nicht beeinträchtigten Versuchstieren unter Reduktion von Störgrößen.

Zur basalen Charakterisierung einer akuten Anämie werden *in vivo* und *ex vivo* Methoden in Vergleich gesetzt. Vervollständigt werden soll die Abbildung kardialer Adaptionen durch eine Beschreibung der Reagibilität auf Applikation von vaso- und myokardialwirksamen Substanzen. Ziel ist es, hämodynamische und kardiale Eigenschaften anämischer Versuchstiere darzustellen und in Vergleich zu nicht-anämischen Kontrollen zu setzen.

Zur Ermöglichung eines besseren Verständnisses von Interaktionen der Anämie und Myokardinfarkten, deren Auswirkungen in klinischen Studien erhoben aber nicht kausal dargestellt wurden, wird mittels *ex vivo* Modell ein Ischämie/Reperfusionseignis simuliert. Um Myokardschäden detektieren zu können, wird eine Infarktgrößenbestimmung angeschlossen. Ziel ist es, isolierte Einflüsse einer akuten Anämie auf die Pathophysiologie des Myokardinfarktes darzustellen.

Zur Evaluation möglicher Anpassungen des Redoxstatus in anämischen Versuchstieren wird repräsentativ das Glutathionsystem in anämischen Versuchstieren und Kontrollen untersucht. Ziel ist es, die möglichen Veränderungen der oxidativen und antioxidativen Mechanismen zu definieren, um dessen Mediatorfunktion in Rahmen eines Ischämie/Reperfusionseignisses zu beschreiben.

In der Zusammenschau der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen soll abschließend die pathophysiologische Relevanz einer Anämie für einen eintretenden Myokardinfarkt dargestellt werden. Dabei soll durch experimentelle Darstellung von Interaktionen zwischen isoliert bestehender Anämie und Myokardinfarkt die klinische Assoziation von Anämie mit nachteiligem *Outcome* nach Myokardinfarkt experimentell überprüft werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Im Rahmen der Charakterisierung von Versuchstieren im akuten Anämie-Modell wurden Chemikalien und Geräte verwendet, welche im Folgenden dargestellt werden.

#### 2.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Verwendete Chemikalien und Reagenzien wurden von namenhaften Lieferanten bezogen und nach Nutzungsempfehlungen gehandhabt (Tabelle 3).

| <b>Produkt</b>  | <b>Hersteller</b>   |
|---|---|
| <b>Anämieinduktion</b><br>Isofluran<br>Isotonische Natriumchlorid Lösung<br>OctaniSept  | Piramal Critical Care GmbH, Hallbergmoos, Deutschland<br>Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland<br>Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland  |
| <b>Echokardiographie</b><br>Ultraschallgel (Aquasonic 100)<br>Isofluran<br>Enthaarungscreme (Veet)  | Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA<br>Piramal Critical Care GmbH, Hallbergmoos, Deutschland<br>Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland  |
| <b>Langendorff-Studien</b><br>Isotonische Natriumchlorid Lösung<br>Natriumchlorid<br>Kaliumchlorid<br>Magnesiumsulfat<br>Natriumhydrogencarbonat<br>Kaliumdihydrogenphosphat<br>Glucose<br>Natrium-Pyruvat<br>Calciumchlorid<br>Triphenyltetrazolium-Chlorid<br>Carbogen<br>Heparin-Natrium<br>Ketanest<br>Destilliertes H <sub>2</sub> O (Millipore-Q)<br>Adenosin<br>Bradykinin<br>N-Isopropyl-DL-Noradrenaline<br>Evans Blue | Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland<br>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland<br>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland<br>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland<br>KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Linde AG, Pullach, Deutschland<br>B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland<br>B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland<br>Merck Millipore, Burlington, USA<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Fluka/Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Fluka/Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| <b>Glutathion Bestimmung</b><br>DetectX® Glutathione Fluorescent Kit (K006)<br>Stickstoff<br>5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat<br>Bovines Serumalbumin   | Arbor Assays, Michigan, USA<br>Linde AG, Pullach, Deutschland<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA<br>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA   |

**Tabelle 3: Übersicht über verwendete Chemikalien und Reagenzien.**

## 2.1.2 Verwendete Geräte

Verwendete Geräte wurden von namenhaften Lieferanten bezogen und nach Nutzungsempfehlungen gehandhabt (Tabelle 4).

| <b>Produkt</b>   | <b>Hersteller</b>  |
|--|--|
| <b>Mäusehaltung</b><br>Klimaschrank (Uni Protect, THF 3378)<br>Präzisionswaage   | Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen, Deutschland<br>Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland   |
| <b>Anämie Induktion</b><br>Wärmepad<br>Lanzette (Goldenrod 5mm)<br>EDTA Röhrchen (MiniCollector)<br>1ml Einweg-Spritze (Omnifix-F)<br>Kanüle 27G x 1/2 (Eclipse Needle)<br>BGA Einweg-Spritze (Pico50)<br>Anästhesie System<br>Blutbildanalysegerät (scil Vet ABC)   | FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanada<br>MEDipoint Inc., Mineola, USA<br>Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich<br>B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland<br>Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Deutschland<br>Radiometer Medical ApS, Bronshoj, Dänemark<br>VetEquip Inc., Livermore, USA<br>Scil Animal Care Company, Gurnee, USA  |
| <b>Echokardiographie</b><br>Ultraschallgerät (Vevo 2100)<br>Ultraschallkopf (MS 700)<br>Ultraschallkopf (MS 400)<br>Ultraschallgel-Wärmestation<br>Wärmepad<br>Anästhesie System<br>Langhaarschneider<br>Kosmetiktücher (Tapira plus)<br>Fixierungsband (Durapore)<br>Temperatursonde<br>Langhaarschneider (Favorita II)   | FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanada<br>FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanada<br>FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanada<br>Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA<br>FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanada<br>VetEquip Inc., Livermore, USA<br>Wahl GmbH, Unterkirnach, Deutschland<br>Großverbraucherspezialisten, Friedewald, Deutschland<br>3M, Maplewood, USA<br>FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanada<br>Aesculap Suhl GmbH, Suhl, Deutschland  |
| <b>Langendorff Studien</b><br>Präparationstisch<br>Langendorff Apparatur (Isolated Heart)<br>Wärmebad (Lauda E100)<br>Rollpumpe (Ismatec)<br>Verstärker (Plugsys Basic, Typ 603)<br>Datenerhebung (PowerLab 8/30)<br>Schrittmacher (HSE Stimulator P)<br>Laborglasflaschen 500ml (Duran)<br>Laborglasflaschen 1000ml (Duran)<br>Kochgläser 2000ml (Duran Becher)<br>Erlenmeyerkolben 2000ml (Duran)<br>Glasfiltergerät (Duran Filtriergerät)<br>Magnet-/Heizrührer (IKAMAG RET)<br>Mikropinzette gerade (BD 331 R) | Hama GmbH, Monheim, Deutschland<br>Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland<br>Lauda Dr. Wobser GmbH, Königshofen, Deutschland<br>Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland<br>Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland<br>ADInstruments (Europe), Oxford, Vereinigtes Königreich<br>Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland<br>DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland<br>DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland<br>DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland<br>DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland<br>DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland<br>IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland<br>Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland |

| <b>Produkt</b>                            | <b>Hersteller</b>  |
|---|--|
| Mikropinzette gebogen (BD 333 R)          | Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland                     |
| Mikropinzette (FST 11051-10)              | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland              |
| Gewebeschere (FST 14075-11)               | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland              |
| Feine Hautschere (FST 14088-10)           | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland              |
| Mikroschere (FST 15001-08)                | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland              |
| Sprungschere gebogen (FST 15004-8)        | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland              |
| Infusionspumpe (Precidor)                 | Infors AG, Bottmingen, Schweiz                           |
| Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD)             | Leica, Wetzlar, Deutschland                              |
| Lichtmikroskop (SMZ645)                   | Nikon, Tokio, Japan                                      |
| Feinwaage (BP 210 D)                      | Sartorius Lab Instruments Gmbh, Göttingen, Deutschland   |
| Präzisionswaage (L2200 P-D)               | Sartorius Lab Instruments Gmbh, Göttingen, Deutschland   |
| 1ml Einweg-Spritze (Omnifix-F)            | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland            |
| 1ml Einweg-Spritze (Injekt Solo)          | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland            |
| 5ml Einweg-Spritze (Injekt Solo)          | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland            |
| 10ml Einweg-Spritze (Injekt Solo)         | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland            |
| 20ml Einweg-Spritze (Injekt Solo)         | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland            |
| Kanüle 20G (Microlance 3)                 | Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Deutschland           |
| Kanüle 27G x 1/2 (Eclipse Needle)         | Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Deutschland           |
| Kanüle 25G x 5/8 (Eclipse Needle)         | Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Deutschland           |
| Prolenefaden (Ethicon 5-0)                | Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland |
| Seidenfaden (Ethicon 5-0)                 | Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland |
| Flockeneisbereiter (SPR-80)               | NordCap GmbH, Bremen, Deutschland                        |
| Vortexmischer (Vortex Genie)              | Scientific Industries Inc., New York, USA                |
| Thermomixer (ThermoMixer 5436)            | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                       |
| <b>Glutathion Bestimmung</b>              |  |
| Mikroreaktionsgefäße                      | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                       |
| Photometer (FLUOstar Omega)               | BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland                 |
| Pipette (5µl)                             | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                       |
| Pipette (20µl)                            | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                       |
| Pipette (50µl)                            | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                       |
| Pipette (200µl)                           | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                       |
| Pipette (1000µl)                          | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                       |
| Pipettenspitze (5µl; Tip One)             | Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland         |
| Pipettenspitze (50µl; Tip One)            | Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland         |
| Pipettenspitze (100µl; Tip One)           | Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland         |
| Pipettenspitze (10/20µl, Filter; Tip One) | Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland         |
| Pipettenspitze (200 µl, Filter; Tip One)  | Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland         |
| Li-Heparin Röhrchen (MiniCollector)       | Greiner Bio-One, Kremismünster, Österreich               |
| Kryoröhrchen (Nunc)                       | Thermo Fisher Scientific, Hennef, Düsseldorf             |
| Mikrozentrifuge (Mikro 200R)              | Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland           |
| Mikrozentrifuge (Centrifuge 5417 R)       | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                       |
| Vortexmischer (Vortec Genie)              | Scientific Industries Inc., New York, USA                |

**Tabelle 4: Übersicht über verwendete Geräte.**



## 2.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Für *in vivo* als auch *ex vivo* Studien wurden männliche C57BL/6J Versuchsmäuse im Alter zwischen 11 und 12 Wochen und einem Körpergewicht zwischen 24 und 32g verwendet, welche kommerziell von der Firma *Janvier (Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich)* erworben wurden. Unterbringung, Haltung und Versuchsdurchführung erfolgte unter der fachkundigen Aufsicht und Pflege des Personals der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftlichen Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, sowie den geschulten Mitarbeitern des kardiovaskulären Forschungslabors der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Die Versuchstiere wurden in Kleingruppen, in nach der EU-Richtlinie 2010/63/EU hinreichend bemessenen Käfigen, gehalten [84]. Zur Minimierung von Einflüssen durch externe und haltungsbedingte Faktoren wurden umfassende Standardisierungen vorgenommen: Die Versuchstierhaltung erfolgte durchgehend in einen Klimaschrank, welcher Luftfeuchtigkeit (55% r.F.), Luftdruck (20 Pa) und Temperatur (23,0°C) regulierte. Durch einen Lichtwechsel wurde circadiane Tag-Nacht-Rhythmik simuliert. Zu jedem Zeitpunkt bestand Zugang zu ausreichendem Futter und frischem Trinkwasser. Bei der Kleingruppenbildung wurde, unter den Vorgaben der Randomisierung, auf ein harmonisches Miteinander geachtet, um Stressmomente zu reduzieren und eine stabile Homöostase zu ermöglichen.

Alle Versuche wurden unter Achtung des Tierwohles und Minimierung von Leid und Beeinträchtigungen durchgeführt. In der Handhabung wurden zuvor etablierte Protokolle eingesetzt, um eine Vereinheitlichung zu erzielen und Vergleichbarkeit zu ermöglichen. So wurde in Kontakt mit den Versuchstieren auf regulierte Abläufe und eine stressreduzierte Umgebung geachtet, um externe Beeinflussung zu minimieren.

Die für tierexperimentelle Untersuchungen notwendige Tierversuchsgenehmigung wurde mit der Referenznummer 84-02.04.2015.A498 erteilt. Als Bestandteil des Genehmigungsbescheides wurde mit absolviertem Versuchstierkudkurs (*FELASA accredited Course F048/16*) eine Mitarbeit am Versuchsvorhaben genehmigt.

## 2.3 Tierexperimentelles Anämie-Modell

Um die Auswirkungen einer akuten, durch repetitive Blutabnahmen induzierte Anämie auf die kardiale Funktion zu untersuchen, wurde ein tierexperimentelles Anämie-Modell in ansonsten gesunden Wildtyp-Mäusen etabliert. Als Vergleichsgruppe wurden nichtanämische Kontrollen definiert, welche äquivalenten Protokollen unterworfen wurden, ohne dass ein Blutverlust induziert wurde. Um eine Vergleichbarkeit der Kohorten zu erzielen, wurden die vorhandenen Versuchstiere zu Studienbeginn randomisiert. Dies gewährleistete, dass beide Gruppen im Ausmaß interindividueller Spezifitäten einander entsprachen.

### 2.3.1 Anämieinduktion

Ziel der Anämieinduktion war die Manifestierung einer akuten und möglichst isoliert bestehenden Anämie, welche definiert wurde durch eine venöse Vollblutprobe mit einem Hb-Wert  $< 9$  g/dl, herbeigeführt innerhalb weniger Tage. Versuchstiere, welche dieser Anämieinduktion unterworfen wurden, werden im Weiteren als „*anämische Mäuse*“ bezeichnet.

Zur Blutentnahme bei kleinen Versuchstieren stehen verschiedene Entnahmemöglichkeiten, entsprechend den Vorgaben der Gesellschaft für Versuchstierkunde, zur Verfügung [85]. Bei der Auswahl des Entnahmeverfahrens sind verschiedene Faktoren zu beachten, welche die Praktik der Blutabnahme bestimmen [85]. In Abhängigkeit von der gewünschten Qualität des Blutes, welche Faktoren wie Sterilität, die Differenzierung zwischen arteriellem, venösem oder Mischblut, Verunreinigungen der Blutproben und Hämolyse einschließt, können verschiedene Abnahme-Techniken Anwendung finden. Diese werden weiter charakterisiert durch den Aspekt der Entnahmefrequenz (einmalig - mehrmalig) und der gewünschten Blutmenge. Unter Achtung der Charakteristika und Zielen des zu etablierenden Anämie-Modells wurden repetitive Blutentnahme über eine Punktion der V. facialis als zielführende Methode ausgewählt. Mit dem Ziel den Hämoglobinverlust in Versuchstieren ausgeglichen zu induzieren, wurde die Blutabnahmemenge auf 15% des Blutvolumens standardisiert, wobei angenommen wurde, dass das Blutvolumen 60 ml pro kg Körpergewicht betrug (Tabelle 5) [86].

Zur Punktion wurde ein hypnotischer Zustand mittels volatilen Anästhetikums Isofluran initiiert. Als mögliche Komplikation war eine Hypothermie sowie eine Atem- und Herzkreislaufdepression zu beachten [87]. Zur Verhinderung einer Infektion wurde die Punktionsstelle im Sinne einer antiseptischen Prophylaxe vor der Punktion desinfiziert. Bei dem im Nackengriff fixierten Versuchstieren wurde die Konfluenz der orbitalen und submandibularen venösen Äste in die V. facialis aufgesucht und punktiert. Zum Aufsuchen der dorso-kaudalen Punktionsstelle im Unterkiefer wurde, ausgehend von der Landmarke der mandibulären Talgdrüse, eine mögliche Lokalisation durch Aufsuchen des Punktes, welcher eine Augenlänge kaudal und eine Augenbreite dorsal von dieser gelegen ist bestimmt und eine Punktion mit einer 5,00 mm Lanzette durchgeführt (Abb. 3). Dabei konnten spezifische Komplikationen auftreten, wie eine durch zu tiefe Punktion verursachte Verletzung von Arterien und Schädelstrukturen. Nach Abnahme des definierten Blutvolumens wurde die Punktionsstelle abgedrückt, um eine Hämatombildung zu verhindern. Um den entstandenen Volumenverlust auszugleichen, wurde eine kristalloide, isotonische 0,9 % Natriumchlorid Lösung als Substitutionsmittel verwendet. Die zu applizierende Menge entsprach dabei dem Doppelten der abgenommenen Menge Blut und wurde zu einer Hälfte intraperitoneal und zu anderen Hälfte subkutan verabreicht, um Volumenverluste hinreichend zu kompensieren. Zur Bestätigung der Initiation eines anämischen Zustandes wurden venöse Blutproben mittels Blutbildanalysegerät gemessen.

| <b>Mausgewicht</b> | <b>Blutvolumen des Versuchstieres</b> | <b>15% des Blutvolumens</b> |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 26 g               | 1,56 ml                               | 234 $\mu$ l                 |
| 27 g               | 1,62 ml                               | 243 $\mu$ l                 |
| 28 g               | 1,68 ml                               | 252 $\mu$ l                 |
| 29 g               | 1,74 ml                               | 261 $\mu$ l                 |
| 30 g               | 1,80 ml                               | 270 $\mu$ l                 |

**Tabelle 5: Beispielhafte Bestimmung der Blutabnahmemenge zur Anämieinduktion.** Die Blutabnahmemenge berechnet sich aus der Annahme, dass Versuchstiere ein Blutvolumen von 60 ml/kg Körpergewicht besitzen. Eine definierte Blutmenge [ $\mu$ l] wurde den Versuchsmäusen, welche als „anämische Mäuse“ bezeichnet werden, an aufeinander folgenden Tagen bis zur Verifizierung einer manifesten akuten Anämie abgenommen.



**Abb. 3: Darstellung des Verlaufes der V. facialis.** V. facialis, welche die tiefer gelegene A. facialis begleitet, dargestellt in einer Präparation einer postmortalen Versuchsmaus. Die Punktionsstellen (Pfeil) variierte dabei interindividuell, konnten jedoch ausgehend von Landmarken abgeschätzt werden.

### 2.3.2 Nicht-anämische Kontrollen

Als Referenzgruppe dienten Versuchsmäuse, welche vergleichbaren Protokollspezifitäten unterworfen wurden ohne Punktion der V. facialis. Am Untersuchungstag wurde die Normwertigkeit der Hb-Konzentration mittels Blutprobe bestätigt, definiert durch einen erhobenen Messwert innerhalb der Referenz zwischen 14 und 15 g/dl. Diese Versuchsmäuse werden im weiteren Verlauf als „Kontrollen“ bezeichnet.

## 2.4 Echokardiografie

Zur initialen Beurteilung der kardialen Funktion der Versuchstiere *in vivo* wurden im Rahmen echokardiografischer Untersuchungen kardiale Funktionsparameter erhoben und in Vergleich gesetzt.

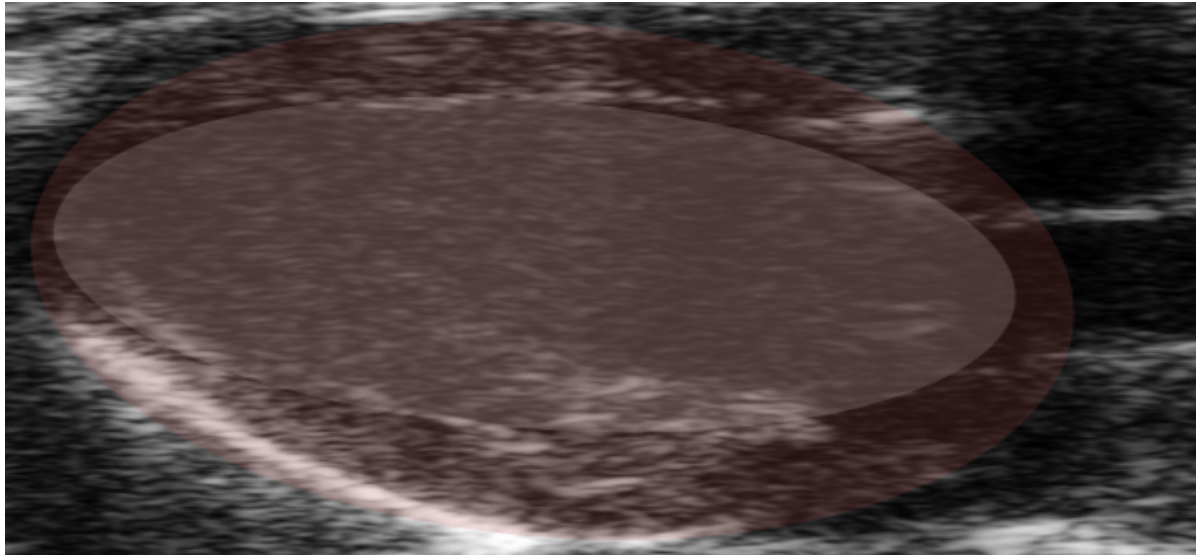
In Vorbereitung auf die echokardiographische Untersuchung wurden die Versuchstiere nach Narkoseinitiation mittels volatilem Anästhetikums Isofluran mithilfe von Klebestreifen über die Extremitäten auf einem mobilen und beheizten Untersuchungstisch fixiert. Zur Überwachung atem- und kreislaufdepressiven Wirkungen des Anästhetikums Isoflurans erfolgte über Elektroden ein kontinuierliches Monitoring der Atem- und Herzfrequenz via EKG [88]. Die Herzfrequenz war oberhalb von 400 Herzschlägen pro Minute zu erhalten, um physiologisch adäquate Messparameter zu generieren. Dabei unterlag diese zum einen der kreislaufdepressiven Wirkung des Anästhetikums Isoflurans und zum anderen der reduzierenden Wirkung der herabgesetzten Körperkerntemperatur [88, 89]. Eine hinreichende Herzfrequenz konnte durch Minimierung der Applikationsmenge des Isoflurans auf ein notwendiges Minimum unterstützt werden. Zur Verhinderung einer Auskühlung wurde auf eine Abdeckung mit Aluminiumfolie, erhöhte Raumtemperatur und die Verwendung eines auf 41°C erwärmten Wärmepads geachtet. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Körperkerntemperatur eine rektal eingeführte Temperatursonde verwendet, um den Erhalt einer Körpertemperatur von 37°C zu kontrollieren. Unter Zuhilfenahme eines Langhaarschneiders und einer Enthaarungscreme war es möglich den ventralen Thoraxbereich von Haaren zu bereinigen, um die Qualität des Echokardiogramms zu steigern.

Zur Bemessung der kardialen Funktion wurden sechs Einstellungen mit spezifischen Messparametern abgebildet (Tabelle 6). Zur Darstellung des linken Ventrikels wurde ein langer Achsenschnitt im *B-Mode* („*brightness*“- *Mode*) aufgezeichnet, welcher zur Evaluation der wichtigsten Parameter der linksventrikulären Funktion diente (Abb. 4). In der angefügten *M-Mode* („*motion*“ – *Mode*) Darstellungen, welche sich durch hohe zeitliche Auflösung auszeichneten, fand die Ausmessung der Wanddicken und der Diameter des linksventrikulären Lumens statt (Abb. 5a). Diese wurden über die lange Achse und die kurze Achse des linken Ventrikels aufgezeichnet. Ergänzt wurde die Aufzeichnung der systolischen und diastolischen Herzfunktion durch die Darstellung des Blutflusses über die Mitralklappe zwischen linkem Vorhof und linkem Ventrikel mittels Puls-Wellen-Doppler („*pulse-wave doppler*“) (Abb. 5b). In derselben Einstellung wurde zusätzlich mittels Gewebs-Doppler („*tissue doppler*“) die Ventrikelmotilität bemessen (Abb. 5c). Zur Vervollständigung wurde der Blutfluss über die Aortenklappe zwischen linkem Ventrikel und Aorta ascendens mittels Puls-Wellen-Doppler („*pulse-wave doppler*“) aufgezeichnet, um die Auswurfgeschwindigkeit des Blutes zu untersuchen.

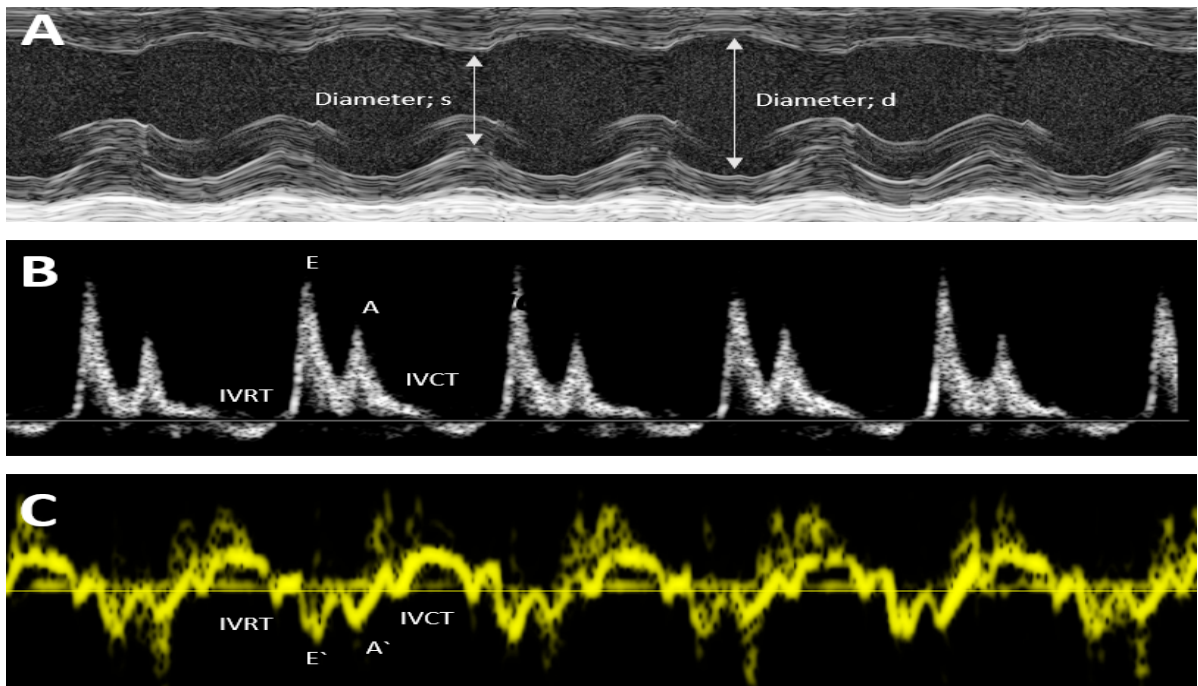
| <b>Schnittbild</b>                              | <b>Messparameter</b> | <b>Einheit</b>     | <b>Erläuterung</b>  |
|---|----------------------|--------------------|---|
| <b>PSLAX B-Mode<br/>(lange Achse)</b>           | Herzfrequenz         | Herzschläge/Minute | Herzschlagfrequenz  |
|   | Volumen; sys.        | $\mu$ l            | Volumen des linken Ventrikels in Systole  |
|   | Volumen; dia.        | $\mu$ l            | Volumen des linken Ventrikels in Diastole   |
|   | Schlagvolumen        | $\mu$ l            | Auswurfmenge des linken Ventrikels pro Kontraktion                                  |
|   | Ejektionsfraktion    | %                  | Anteil des end-diastolischen Volumen welches pro Kontraktion ausgeworfen wird       |
|   | Herzeitvolumen       | ml/min             | Blutvolumen welches pro Minute vom linken Ventrikel ausgeworfen wird                |
| <b>PSLAX M-Mode<br/>(lange und kurze Achse)</b> | Durchmesser; sys.    | mm                 | Durchmesser des linken Ventrikels während Systole                                   |
|   | Durchmesser; dia.    | mm                 | Durchmesser des linken Ventrikels während Diastole                                  |
|   | Verkürzungsfraktion  | %                  | teilweise Verkürzung des linken Ventrikels von Systole zu Diastole                  |
|   | LV Masse             | mg                 | Geschätztes absolutes Gewicht des linken Ventrikels                                 |
| <b>MV Flow<br/>(Mitral valve)</b>               | IVCT                 | ms                 | Isovolumetrische Kontraktionszeit des linken Ventrikels                             |
|   | IVRT                 | ms                 | Isovolumetrische Relaxationszeit des linken Ventrikels                              |
|   | MV Decel             | ms                 | Zeit der frühen Füllungsphase   |
|   | MV ET                | ms                 | Gesamtzeit der Füllung des linken Ventrikels  |
| <b>MV Tissue<br/>(Mitral valve)</b>             | A'                   | mm/s               | Spätes Mitralklappen-Flussignal, Ausmaß der aktiven Füllung durch Vorhofkontraktion |
|   | E'                   | mm/s               | Frühes Mitralklappen-Flussignal, Ausmaß der passiven Füllung des linken Ventrikels  |
| <b>AoV Flow<br/>(Aortic valve)</b>              | Geschwindigkeit      | mm/s               | Geschwindigkeit über die Aortenklappe   |

**Tabelle 6: Übersicht über zu erhebende Messparameter in der Echokardiographie.** Übersicht über die erhobenen Messparameter im Rahmen des Protokolls der Echokardiographie an Versuchsmäusen.

Um mögliche Anpassungen der kardialen Funktion durch Anämieinduktion darstellen zu können, wurden die Versuchstiere initial vor der ersten Blutabnahme und nach erfolgreicher Anämieinduktion untersucht.



**Abb. 4: Echokardiographische Darstellung des langen Achsenschnittes im B-Mode.** In diesem Schnittbild wurden die Herzfrequenz und Volumina des linken Ventrikels sowie die abgeleiteten Messparameter Ejektionsfraktion und Herzzeitvolumen bestimmt. Rötlich dargestellt das Myokard mit zentral dargestelltem Lumen des linken Ventrikels (heller Bereich).



**Abb. 5: Darstellung echokardiographischer Einstellungen des Untersuchungsprotokolls.** **A:** M-Mode-Tracing zur Ausmessung der Wanddicken und der Durchmesser des linksventrikulären Lumens mit Diameter; s (systolisch) und Diameter; d (diastolisch) **B:** Puls-Wellen-Doppler zur Aufzeichnung der mitralen Flussgeschwindigkeit mit E (Anfang der diastolischen Kontraktion) und A (spät-diastolische Kontraktion). Die IVRT (isovolumetrische Relaxationszeit) beschreibt die diastolische Funktion und die IVCT (isovolumetrische Kontraktionszeit) die systolische Funktion des linken Ventrikels. **C:** Darstellung des Gewebs-Dopplers mit IVRT, IVCT, E' Welle (entspricht Bewegung des Mitralannulus während der frühen diastolischen Füllung des LV) und A' Welle (Vorhofsystole während der späten Füllung des LV).

## 2.5 Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff

Bei dem Modell des isoliert perfundierten Herzens nach Langendorff handelt es sich um eine *ex vivo* Methode, welche durch Explantation eines Säugetierherzens, dessen kardiale und hämodynamische Charakterisierung erlaubt, ohne modulierenden systemischen Einflüssen unterworfen zu sein. Dabei kann das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff als ein zielgerichtetes, reproduzierbares und sensitives Modell dargestellt werden, um kardiale Funktion und Schäden zu erfassen [90].

Der in diesem Studiendesign verwendete Versuchsaufbau geht auf das von Oscar Langendorff entwickelte *ex vivo* Modell zurück. Kennzeichnend für sein Modell ist die retrograde Perfusion der Aorta mittels einer nährstoffreichen und oxygenierten Substitutionslösung, welche es dem explantierten Herzen ermöglicht, in einem thermostabilen Milieu über Stunden weiter zu wirken [90, 91]. Die isolierte Betrachtung des Herzens erlaubt eine Beschreibung im Zustand der Unabhängigkeit von neuronalen und hormonellen Einflüssen, wie sie in einem *in vivo* Experiment nicht möglich wäre. Dies bietet die Möglichkeit reelle Kontraktilität (Inotropie), koronarmuskulotrope Effekte (koronare Blutflussregulierung) sowie bioelektrische Parameter von Herzen unabhängig systemischer Beeinflussung zu detektieren und zu vergleichen.

Über basale Charakterisierung hinaus, können weiterführende Untersuchungen im Rahmen von biochemischen, physiologischen und morphologischen Studien angeschlossen werden. So können Einflüsse von Medikamentenapplikationen auf die koronare Funktion und Gewebeataptionen unter Hypoxie detailliert dargestellt werden.

### 2.5.1 Beschreibung des Langendorff Versuchsaufbau

Bei den *ex vivo* Versuchen des isoliert perfundierten Herzens nach Langendorff wurde das zu untersuchende Versuchstierherz nach Explantation über eine Stahlkanüle in ein Perfusionssystem integriert, welches dieses retrograde mit einer Substitutionslösung versorgte [92]. Mittels einem in den linken Ventrikel eingeführten Ballonkatheter konnten mechanische Parameter erhoben werden. Protokollen folgend wurden die isoliert perfundierten Versuchstierherzen verschiedenen Untersuchungssituationen unterworfen.

Um einen physiologischen Stoffwechsel des Myokards mit hinreichender Nährstoff- und Elektrolytversorgung sicherzustellen, wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit Lösung als Perfusat eingesetzt. Die Perfusat-Versorgung erfolgte aus einem Reservoir, welches mittels eines Wasserbades erwärmt und durch konstante Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) über eine Gasfritte oxygeniert wurde. Über einen Zulaufschlauch war das Reservoir mit der Herzkammer verbunden, wobei eine zwischengeschaltete Rollerpumpe den Perfusat-Zufluss standardisierte. Innerhalb der Herzkammer wurde ein thermostabiles Milieu generiert, welches den Erhalt der kardialen Funktion des Versuchstierherzens sicherte.

Eine gleichbleibende Perfusion des Myokards konnte gewährleistet werden, indem beständig mehr Substitutionslösung von der Rollerpumpe gefördert wurde als das Herz benötigte. Dieser Überschuss konnte durch einen Überlaufschlauch abgeleitet werden, in welchem über eine eingefügte Membran ein Widerstand generiert wurde. Über einen konnektierten Druckregler konnte der Druck über diese Membran variiert und somit der Perfusionsdruck auf das Versuchsherz angepasst werden. Über ein analoges Druckmanometer konnte der aktuelle Aorten-Perfusionsdruck detektiert werden. Für eine Vergleichbarkeit von erhobenen Messparametern war es notwendig einen standardisierten Perfusionsdruck zu etablieren und diesen über die gesamte Dauer des Experimentes zu erhalten.

Das Perfusat, welches über die retrograd perfundierte Aorta dem Herzen zugeleitet wurde, überstieg mit seinem generierten Perfusionsdruck den vom linken Ventrikel aufgebauten Druck, sodass die Aortenklappe sich schloss und eine Perfusion der Koronaren forcierte. Resultierend aus dem Perfusionsdruck konnte durch einen in den Aortenblock integrierten Durchflussmesser der Perfusatfluss über die Kanüle aufgezeichnet werden, welcher bei Verschluss der Aortenklappe dem koronaren Fluss entsprach. Zur Verhinderung von Luftembolien war eine *Compliance* Kammer in den Aortenblock integriert, um als Abfangmöglichkeit für Luftblasen zu fungieren. Die Perfusatmenge, welche die Koronarien durchsetzte, wurde über das venöse System des Herzens in den präparatorisch eröffneten rechten Vorhof abgeleitet.

Zusätzlich zum Perfusionsdruck und dem resultierenden koronaren Fluss wurde die mechanische Funktion des Versuchsherzens als isovolumetrische Kontraktion des linken Ventrikels durch einen Ballonkatheter gemessen. Durch das Flüssigkeitsvolumen im Ballon konnte innerhalb des linken Ventrikels Vorlast simuliert werden. Unter Zuhilfenahme eines Druckwandlers konnte die mechanische Aktion des linken Ventrikels abgebildet werden.

Durch einen externen Schrittmacher wurden die Versuchsherzen auf 600 Herzschläge pro Minute rhythmisiert. Die Platzierung des externen Schrittmachers erfolgte am Kammermyokard zwischen den beiden Herzöhrchen. Um eine erfolgreiche Rhythmisierung zu gewährleisten, betrug die Stimulationsamplitude mit rund 2 Volt das Doppelte der Reizfrequenz. So konnten interindividuelle Herzfrequenzadaptionen angepasst und Vergleichbarkeit ermöglicht werden.

Weiterführend eignet sich die Langendorff-Apparatur neben der basalen Untersuchung physiologischer Parameter des Herzens, auch zur experimentellen Applikation von verschiedenen Substanzen. Im Rahmen dessen wurden positiv inotrope und vasodilatierende Medikamente flussadaptiert appliziert, indem sie über einen separaten Zulaufschlauch seitlich in die *Compliance* Kammer eingeleitet wurden. Um ein möglichst zuverlässiges Beifügen der Medikamente zu erreichen und eine Kontamination des gesamten Systems zu verhindern, endete der Zulauf unmittelbar oberhalb der Aortenkanüle. Die vorbereiteten und standardisierten Medikamentenlösungen wurden über eine Spritzenpumpe appliziert und standardisiert.



## 2.5.2 Krebs-Henseleit Lösung

Zur Aufrechterhaltung der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung bzw. der Ionen- und pH-Homöostase während der Präparation und in der Langendorff-Apparatur wurde eine modifizierte saline Lösung nach Krebs und Henseleit eingesetzt [93]. Die angepasste zellfreie, isotonische Elektrolytlösung, welche die in der extrazellulären Flüssigkeit vorhandenen Elektrolyte und Puffersubstanzen enthält, basiert auf einer von Krebs und Henseleit entwickelten „physiologischen“ Lösung [94].

Um ein möglichst physiologisches Milieu zu schaffen, werden einer entionisierten Grundlösung verschiedene Elektrolyte zugesetzt (Tabelle 7). Nach Ansetzung der Lösung wurde durch eine 15-minütige Begasung mit Carbogen der pH-Wert auf den physiologischen Wert von 7,4 eingestellt. Im Anschluss wurde Calciumchlorid als letzte Komponente beigefügt, um vorzubeugen, dass sich die in der Lösung befindlichen Calcium- und Phosphationen zu einer Komplexbildung verbinden. Das hergestellte Perfusat wurde unter Verwendung eines Mikrofilters mit einer Porengröße von 0,45 µm in einer Unterdruck-Apparatur gefiltert, um zu verhindern, dass verbliebende Mikropartikel im Versuchsverlauf eine Embolie der Herzgefäße verursachen.

Um eine adäquate Sauerstoffversorgung und somit natürlichen Metabolismus des Herzens zu sichern, war eine kontinuierliche Begasung des Perfusats mit Carbogen notwendig. Um möglichst physiologische und konstante Bedingungen zu schaffen, wurde das Perfusat mit Beginn der Begasung in einem Wasserbad auf 38,5 °C erwärmt, um sicherzustellen, dass die Temperatur des Perfusats bei Erreichen des Versuchsherzen einem physiologischen Niveau von 37°C entsprach.

| <b>Substanz</b>                     | <b>Konzentration [mmol/l]</b> |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| <i>NaCl</i>                         | 116                           |
| <i>KCl</i>                          | 4,6                           |
| <i>MgSO<sub>4</sub></i>             | 1,1                           |
| <i>NaHCO<sub>3</sub></i>            | 24,9                          |
| <i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i> | 1,2                           |
| <i>Glucose</i>                      | 8,3                           |
| <i>Pyruvat</i>                      | 2                             |
| <i>CaCl<sub>2</sub></i>             | 2,5                           |

**Tabelle 7: Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit Lösung.** Substrate wurden in ihrer jeweiligen Konzentration einer entionisierten Grundlösung zugesetzt.

### 2.5.3 Herzentnahme und Präparation

Nach Vorbereitungen der Langendorff-Apparatur für die angestrebte experimentelle Untersuchungssituation wurde mit der Präparation und der Darstellung des isoliert perfundierten Mäuseherzens begonnen.

Durch eine körperrgewichtsadaptierte, intraperitoneale Anästhesie mittels Ketanest (0,2 mg/g) und Xylacin (0,02 mg/g) wurde in Vorbereitung auf die Herzentnahme ein Zustand der Relaxation und Hypnose für den Zeitpunkt der Thoraxeröffnung induziert. Um eine hohe Sicherheit in der Narkoseeinleitung zu gewährleisten, wurden Voraussetzungen wie sicheres Handling, stressfreier Transport und allgemeine Stressreduktion erfüllt. Nach erfolgreicher Narkoseeinleitung wurde das Versuchstier mit Heparin körperrgewichtsadaptiert (5 IU/g Körpergewicht) effektiv antikoaguliert, um eine Thrombenbildung im Herzen zu verhindern. Mittels Langhaarschneider wurde die Fellbehaarung im ventralen Thoraxbereich entfernt. Nach abgelaufener Anflutungszeit des Heparins wurde das Versuchstier auf einen Präparationstisch platziert und an Extremitäten und Schwanz fixiert (Abb. 6A).

Mit Hilfe einer chirurgischen Gewebeschere und unter Fixierung mittels einer Pinzette erfolgte eine antero-laterale Thorakotomie, um einen Zugangsweg zum Herzen zu schaffen. Dazu wurde medial, unterhalb des Xiphoids ansetzend, eine ca. 1,5 cm lange vertikale Hautinzision nach kranial gesetzt. Das Xiphoid wurde im Folgenden mit einer Pinzette leicht abgehoben und durch eine Inzision die thorakale Faszie durchtrennt. Unter kontinuierlicher Fixierung des Xiphoids erfolgten, ausgehend von dieser Inzision, bilateral Schnitte in die Achselhöhlen unter Durchtrennung der Rippenbögen. So war es möglich den ventralen Thoraxabschnitt zu mobilisieren und zu deflektieren, wodurch sich freier Zugang zum Herzen und den beiden Lungenflügel präsentierte (Abb. 6B).

Um eine Entnahme des Herz-Lungen-Paketes zu ermöglichen, wurde die V. cava inferior und die distale Aorta descendens an der Stelle ihres Übertritts in den Thoraxraum durchtrennt. Unter ständiger Fixierung und Deflexion wurde der Gefäßstamm nach kranial fortlaufend durch kleine Schnitte entlang der Wirbelsäule freigesetzt. Folgend wurden die kranial gelegenen Gefäße Aorta ascendens und V. cava superior durchtrennt, sodass das Herz-Lungen-Paket an V. cava inferior bzw. Aorta descendens aus dem Thorax extrahiert werden konnte (Abb. 6C).

Unmittelbar nach der erfolgreichen Mobilisation des Herz-Lungen-Paket wurde dies in eine Präparationsschale übertragen, welche durch den kontinuierlichen Durchfluss von Kühlflüssigkeit auf 3°C gekühlt wurde und mit eiskaltem, durch Carbogen oxygeniertem Perfusat aufgefüllt war. Um Thrombenbildung während der Präparation vorzubeugen, wurden dem Perfusat 0,8 ml Heparin (5 IU Heparin/ml) in der Präparationsschale beigefügt. Durch die Kühlung sollte eine Reduktion des Herzmetabolismus erzielt werden, um einen Zustand im Sinne einer kalten

Ischämie zu genieren. Das Präparieren innerhalb eines sauerstoff- und nährstoffreichen Milieus sollte die mit der Präparation einhergehenden ischämischen Schäden reduzieren.

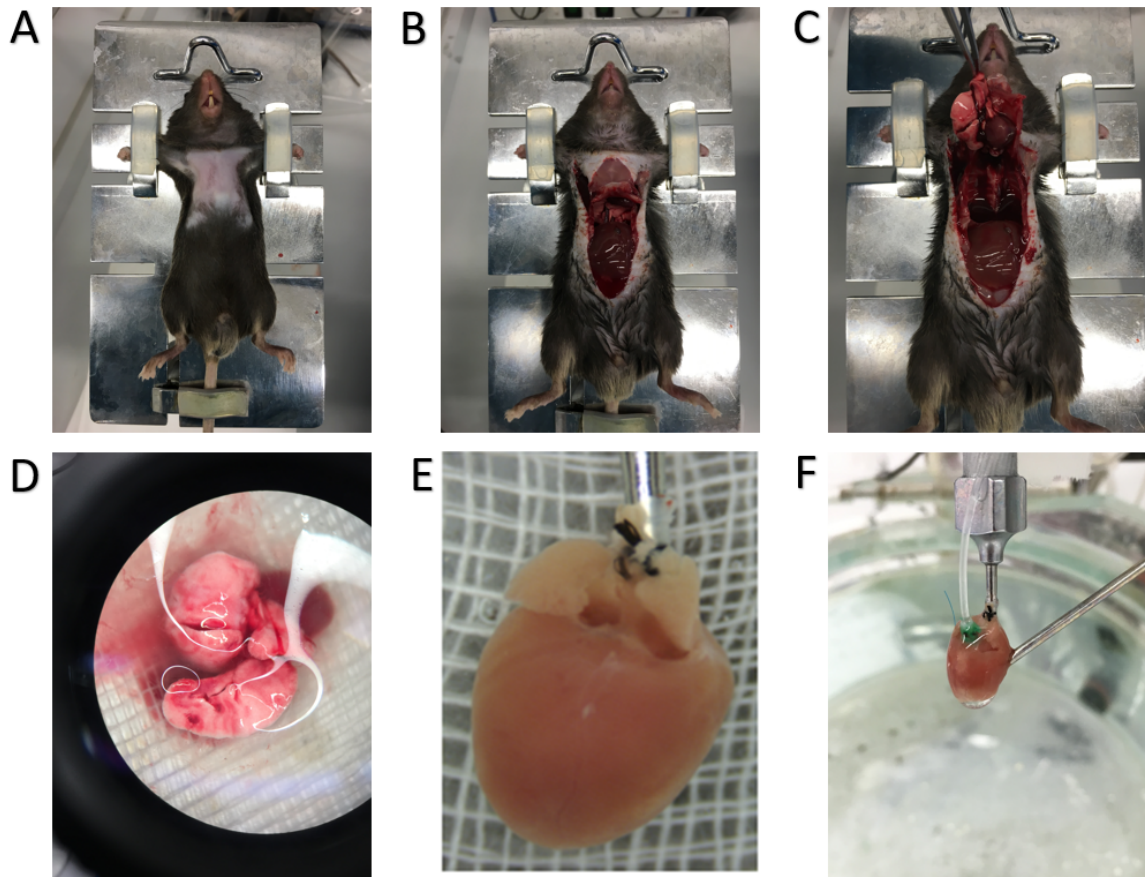
Unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops wurden darauffolgende Präparationsschritte unter mikroskopischer Kontrolle fortgeführt. Mit einer Mikroschere und Uhrmacherpinzetten wurden Lungenflügel, Ösophagus und Thymus entfernt. Dabei wurde die Aorta ascendens freigelegt und über eine Länge von ca. 1 cm dargestellt. Unmittelbar unterhalb des Abganges des Truncus brachiocephalicus wurde die Aorta abgetrennt und verbliebende Gewebereste entfernt. Um einen freien Zugang für den Ballonkatheter zum linken Ventrikel zu schaffen, wurde im Bereich der Vv. pulmonales die Vorhofwand des linken Ventrikels eröffnet. Dabei war eine möglichst restlose Entfernung der Vorhofwand anzustreben, ohne die Mitralklappe oder das Septum zu verletzen. Weiterführend wurde durch Inzision der A. pulmonalis ein Zugang zum rechten Vorhof geschaffen, über welchen der Perfusatabfluss aus dem Herz geleitet wurde (Abb. 6D).

Mit Hilfe zweier feiner Uhrmacherpinzetten wurde die Aorta über das Ende der Stahlkanüle gestülpt. Aufgrund der Elastizität der Aorta war dies möglich, obwohl der äußere Durchmesser der Kanüle wesentlich größer war als der Innendurchmesser der Aorta. Bei der Positionierung der Kanüle war sicherzustellen, dass die Kanüle oberhalb der Aortenklappe endete, um eine Perfusion über die Koronararterien und nicht des linken Ventrikels zu erzielen. Nach mikroskopischer Kontrolle einer hinreichenden Lage der Kanüle innerhalb der Aorta wurde diese mittels Ligatur fixiert (Abb. 6E).

Das isolierte Versuchstierherz wurde über die Kanüle in die Langendorff-Apparatur integriert. Bei Konnektion war zu beachten, dass die Kanüle frei von Luftblasen war und durch kontinuierlichen Perfusatfluss und schräges Heranführen der Kanüle an den Perfusattropf das Risiko einer Verschleppung von Luftblasen in das Herz minimiert wurde.

Während der Präparation war das Herz einer unzureichenden Versorgungslage ausgesetzt, welche einer Ischämiephase entsprach. Um daraus resultierende negative Effekte zu minimieren, musste die Präparationsdauer von der Eröffnung des Thorax bis zum Anschluss des isoliert perfundierten Herzens in der Langendorff-Apparatur gering gehalten werden [95]. Zur Erhaltung der Vergleichbarkeit wurde eine tolerierbare Präparationsdauer definiert.

Um standardisierte Messparameter zu erheben, wurde ein angepasster Ballonkatheter im linken Ventrikel platziert, die Herzfrequenz durch einen externen Schrittmacher normiert und der Perfusionsdruck reguliert (Abb. 6F). Zur Messung der isovolumetrischen Kontraktion des linken Ventrikels wurde ein eigens für die Versuchsherzen hergestellter Polyvinylchlorid Ballonkatheter verwendet. Dieser zeichnete sich durch seine, dem Innenraum des linken Ventrikels angepasste, optimierte Größe und Volumen aus (Abb. 7).



**Abb. 6: Darstellung der Präparationsschritte im Rahmen des Langendorff Protokolls.** **A:** Angesichts eines möglichst sauberen und somit genauen Arbeitens wurde die Fellbehaarung der Maus im ventralen Thoraxbereich entfernt. Nach Anflutung von Anästhetikum und Heparin wurde das Versuchstier auf einem Präparationstisch platziert. **B:** Um einen Zugangsweg zum Herzen zu schaffen wurde eine antero-laterale Thorakotomie durchgeführt, wofür eine vertikale Hautinzision und laterale Entlastungsschnitte unter Durchtrennung der Rippenbögen vorgenommen wurde. **C:** Das Herz-Lungen-Paket konnte nach Durchtrennung der Gefäßversorgung mobilisiert und extrahiert werden. **D:** Unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops wurde das Herz präpariert. Dabei wurden Lungenflügel, Ösophagus und Thymus entfernt und die Aorta ascendens über eine Länge von ca. 1cm dargestellt. Um im Verlauf den Ballonkatheter vorschieben zu können war die Eröffnung des linken Vorhofes notwendig. **E:** Aufgrund der Elastizität der Aorta könnte diese über eine Stahlkanüle gestülpt und mittels Ligatur fixiert werden. **F:** Durch den platzierten Ballonkatheter konnten unter standardisierten Bedingungen repräsentative Messparameter des Versuchstieres erhoben werden.



**Abb. 7: Schematische Darstellung des angefertigten Katheters.** Der Katheter setzt sich zusammen aus einem angepassten Ballon, welcher über einen Tubus mit einer abgestumpften 26G Kanüle verbunden ist.

## 2.5.4 Messparameter

Im Rahmen von Untersuchungssituationen können mit dem isoliert perfundierten Herz nach Langendorff verschiedene Messparameter erhoben werden. Zu diesen zählen koronarmuskulotrope Messparameter und kardiovaskuläre Funktionsparameter (Tabelle 8).

| <b>Messparameter</b>       | <b>Einheit</b>          | <b>Erläuterung</b>   |
|----------------------------|-------------------------|--|
| <i>HF</i>                  | <i>Herzschläge/min</i>  | <i>Herzfrequenz; Anzahl der Herzschläge pro Minute</i>   |
| <i>P<sub>max</sub></i>     | <i>mmHg</i>             | <i>Maximal erreichter Druck während eines Herzschlages</i>   |
| <i>P<sub>min</sub></i>     | <i>mmHg</i>             | <i>Minimal bestehender Druck während eines Herzschlages</i>  |
| <i>P<sub>bd</sub></i>      | <i>mmHg</i>             | <i>Bestehender Druck zu Beginn der Diastole</i>  |
| <i>P<sub>ed</sub></i>      | <i>mmHg</i>             | <i>Bestehender Druck am Ende der Diastole</i>  |
| <i>P<sub>es</sub></i>      | <i>mmHg</i>             | <i>Bestehender Druck am Ende der Systole</i>   |
| <i>DP</i>                  | <i>mmHg</i>             | <i>Differenz aus maximal erreichtem und bestehendem minimalem Druck</i>  |
| <i>LVDP</i>                | <i>mmHg</i>             | <i>Maximaler entwickelter Druck des linken Ventrikels</i>  |
| <i>LVEDP</i>               | <i>mmHg</i>             | <i>Maximaler entwickelter enddiastolischer Druck des linken Ventrikels</i>   |
| <i>dP/dt<sub>max</sub></i> | <i>mmHg</i>             | <i>Maximale Rate des Druckanstieges während der Kontraktion (positive slope)</i>                                   |
| <i>dP/dt<sub>min</sub></i> | <i>mmHg</i>             | <i>Maximale Rate der Druckabnahme während der Relaxation (negative slope)</i>                                      |
| <i>CI</i>                  | <i>sec<sup>-1</sup></i> | <i>Cardiac Index: Quotient aus dP/dT<sub>max</sub> und dem Druck zu diesem Zeitpunkt (dP/dT<sub>max</sub> / P)</i> |
| <i>MaxF</i>                | <i>ml/min</i>           | <i>Höchster erreichter Fluss innerhalb eines Herzschlags</i>   |
| <i>MinF</i>                | <i>ml/min</i>           | <i>Minimaler bestehender Fluss innerhalb eines Herzschlages</i>  |
| <i>MBF</i>                 | <i>ml/min</i>           | <i>Mittlerer bestehender Fluss innerhalb eines Herzschlages</i>  |
| <i>CorF</i>                | <i>ml/min/g</i>         | <i>Koronarer Fluss pro Minute pro Gramm Herzgewicht</i>  |

**Tabelle 8: Übersicht über zu erhebende Messparameter im Rahmen des Langendorff Versuchsaufbau.** Repräsentative Messparameter von Versuchsmäusen können die Myokardfunktionalität während unterschiedlichen Untersuchungssituationen beschreiben.

### 2.5.5 Langendorff Laborstudien - Kalibrierung

Im Rahmen von Langendorff Laborstudien wurden zwei Versuchstiergruppen im Hinblick auf ihre kardiale Funktion basal, in Reaktionen auf flussadaptierte Applikationen von vasoaktiven und kardiowirksamen Substanzen und während eines Ischämie/Reperfusionereignisses charakterisiert. Standardisierte Protokolle wurden etabliert und in Abläufen und Zeitintervallen durch das verwendete Datenerhebungsprogramm ausgeführt.

Jeder definierten Untersuchungssituation war eine allgemeine Kalibrierungsphase (Tabelle 9) voranzustellen, in welcher bestehende Gegebenheiten von den Versuchstierherzen adaptiert wurden. Nach Anpassungsprozessen konnten individuell repräsentative Funktionalitäten erhoben werden. Darüber hinaus konnte als Auswertung der Reagibilität auf eine globale Kurzischämie ein hinreichender Erhaltungszustand der Versuchstierherzen dargestellt werden.

| <b>Protokollabschnitt</b>                   | <b>Beschreibung</b>  |
|---|--|
| <i>Versuchsbeginn</i>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Einsetzen des präparierten und kanülierten Herzens in die Langendorff-Apparatur</i></li> <li>- <i>Standardisierung des Perfusionsdruckes</i></li> <li>- <i>Einführen des Ballonkatheters in den linken Ventrikel</i></li> <li>- <i>Rhythmisierung der Herzfrequenz</i></li> <li>- <i>Starten des Versuchsprotokolls</i></li> </ul> |
| <i>Initiationsphase (1)</i>                 | - <i>Aufzeichnung einer 1-minütigen Initialphase</i>   |
| <i>Adaptionsphase</i>                       | - <i>Einschlagsphase über 20 Minuten mit Ausbildung eines Plateaus unter standardisierten Bedingungen</i>  |
| <i>Ischämie- und Reperusionsphase (2-3)</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aufzeichnung einer 1-minütigen repräsentativen Baseline</i></li> <li>- <i>Globale Ischämiephase über 20 Sekunden</i></li> <li>- <i>Reperusionsphase mit reaktiver Hyperämie</i></li> </ul>   |
| <i>Recovery (4)</i>                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>5-minütige Erholungsphase</i></li> <li>- <i>Aufzeichnung einer 1-minütigen „Recovery“ Phase</i></li> </ul>   |

**Tabelle 9: Darstellung des Kalibrierungsprotokolls in Langendorff Laborstudien.** Vor jeder Untersuchungssituation durchgeführt, erlaubt das Protokoll individuell repräsentative Messwerte und den Erhaltungszustand der Versuchstierherzen nach Präparation zu beschreiben. In Klammern dargestellte Zahlen benennen dabei definierte Messpunkte.

Unter Voraussetzung einer adäquaten Kalibrierungsphase, welche einen hinreichenden Zustand der Versuchstierherzen belegte, konnten diese im Rahmen weiterführender Studien untersucht und dargestellt werden.

## 2.5.6 Langendorff Laborstudien – Substanzapplikation

Über basale Charakterisierung im Rahmen der Kalibrierungsphase hinaus sollte durch Applikation von vasoaktiven und kardiowirksamen Substanzen weiterführende Darstellung pathophysiologischer Adaptionen anämischer Versuchstiere erlaubt werden. Dazu wurden einem Protokoll folgend, die kardiovaskulär wirksamen Substanzen Bradykinin, Adenosin und Isoproterenol standardisiert appliziert und in ihrer Wirkung ausgewertet (Tabelle 10).

Die Applikation erfolgte flussadaptiert durch eine Spritzenpumpe, um konstante und einheitliche Substanzkonzentrationen im Perfusat zu erzielen. Dem durch Substanzen induzierten Effekt auf den koronaren Fluss folgend, durfte die Laufrate der Spritzenpumpe zweimal korrigiert werden. Diese Limitierung beugte einer Überdosierung vor. Zwischen den Applikationen wurden Spülphasen definiert, um Substanzeffekte unverfälscht beschreiben zu können. Im Rahmen einer Anschwemmungsphase wurde sichergestellt, dass die zu applizierende Substanz bis zum Versuchstierherzen vorgespült wurde. Für eine standardisierte Applikation und Beobachtung von Effekten wurden sämtliche Substanzreste in einer Spülphase aus dem System und dem Versuchstierherzen herausgewaschen.

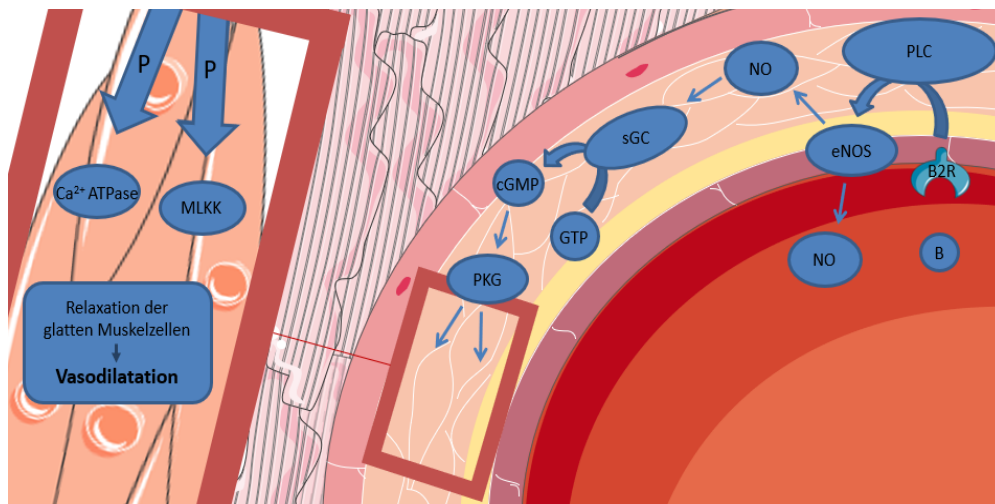
| <b>Protokollabschnitt</b>               | <b>Beschreibung</b>  |
|---|--|
| <i>Bradykinin Applikation (5-6)</i>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aufzeichnung einer 1-minütigen „Bradykinin Baseline“ Phase</li> <li>- Flussadaptierte Applikation von Bradykinin über 5 Minuten</li> <li>- Aufzeichnung einer 1-minütigen „Bradykinin Effekt“ Phase</li> </ul>          |
| <i>Spülphase</i>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anschwemmung des Adenosins bis zur ersten Reaktion</li> <li>- 10-minütige „Spülphase“ mit Perfusat</li> </ul>   |
| <i>Adenosin Applikation (7-8)</i>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aufzeichnung einer 1-minütigen „Adenosin Baseline“ Phase</li> <li>- Flussadaptierte Applikation von Adenosin über 5 Minuten</li> <li>- Aufzeichnung einer 1-minütigen „Adenosin Effekt“ Phase</li> </ul>                |
| <i>Spülphase</i>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anschwemmung des Isoproterenol bis zur ersten Reaktion</li> <li>- 10 minütige Spülphase mit Perfusat</li> </ul>   |
| <i>Isoproterenol Applikation (9-10)</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aufzeichnung einer 1-minütigen „Isoproterenol Baseline“ Phase</li> <li>- Flussadaptierte Applikation von Isoproterenol über 5 Minuten</li> <li>- Aufzeichnung einer 1-minütigen „Isoproterenol Effekt“ Phase</li> </ul> |
| <i>Versuchsende</i>                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Beendigung des Studieprotokoll</li> <li>- Entfernung des Herzens aus dem Langendorff-Modell</li> </ul>  |

**Tabelle 10: Darstellung des Substanzprotokolls in Langendorff Laborstudien.** Für spezifische Substanzeffekte wurden Applikations- und Spülphasen definiert. In Klammern dargestellte Zahlen bezeichnen dabei definierte Messpunkte.

### 2.5.6.1 Bradykinin

Das Peptid- und Gewebshormon Bradykinin fungiert sowohl als physiologischer als auch pathophysiologischer Mediator, welchem neben seiner Interaktion mit den Endothelzellen des Gefäßsystems auch Beteiligungen an Schmerzerzeugung [96], Mediation von Entzündungen und kardioprotektive Effekte [97] zugesprochen werden können. Bradykinin wird durch eine reversible Vasodilatation mit einer Regulation des kardiovaskulären Systems assoziiert, indem es in Abhängigkeit von Endothelzellen via Stickstoffmonoxid (NO) Freisetzung zu einer Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen führt [98].

Die durch die kurze Halbwertszeit stark limitierte Kininwirkung [99] verfügt, via konstitutiv exprimierten B<sub>2</sub>-Rezeptoren, über gefäßregulierende Effekte durch endotheliale NO-Synthase (eNOS) (Abb. 8) [100]. Obwohl die Regulation der Bradykininrezeptoren bisher nicht vollständig erfasst ist, konnten Hinweise auf eine Hochregulierung durch Zytokine und oxidativen Stress beschrieben werden [101, 102]. Sowohl B<sub>2</sub>-Rezeptoren als auch Aktivität der eNOS konnten in kardialen Myozyten nachgewiesen werden, welche auf einem intakten Kallikrenin-Kinin-System im Herzen beruhen [103].



**Abb. 8: Vasomotorische Auswirkungen von Bradykinin im Herzen.** Bradykinin (B) induziert durch Interaktion mit konstitutiv exprimierten Bradykinin Rezeptor B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) via Phospholipase C (PLC) eine Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS). Das kurzlebige Stickstoffmonoxid (NO) diffundiert zu seinem Zielort und bewirkt dort durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) eine Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieses ruft durch die Proteinkinase G (PKG) eine Phosphorylierung (P) der Myosin-Leichtenketten-Kinase (MLKK) und der Ca<sup>2+</sup>-ATPase in der Membran des endoplasmatischen Retikulums eine Relaxation der glatten Muskelzellen hervor.

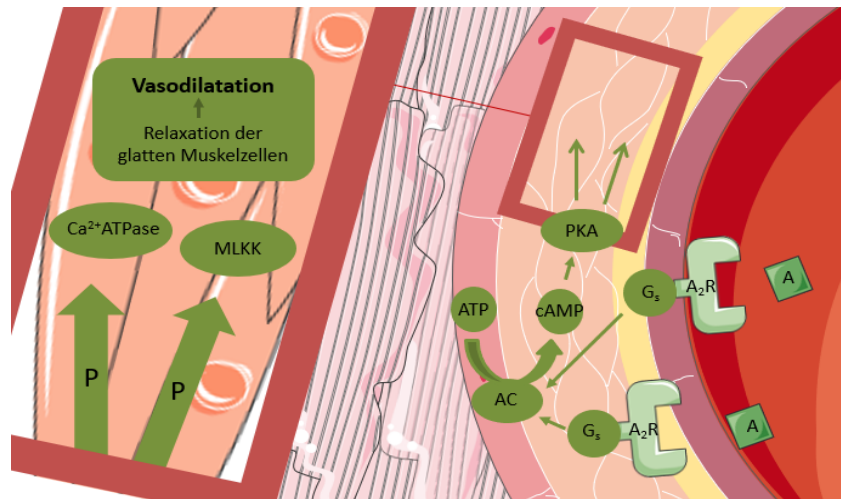
Im Rahmen des Medikamentenprotokolls wurde die Bradykinin-Applikation auf eine Stoffkonzentration von 5 µmolar standardisiert. Durch Verwendung einer Spritzenpumpe konnte eine konstante und einheitliche Substanzkonzentration im Perfusat erzielt werden.



### 2.5.6.2 Adenosin

Über vielfältige Funktionen des Nucleoside Adenosin im Nervensystem [104, 105], im respiratorischen System [106], in der Skelettmuskulatur [107] und in der Niere [108, 109] können, bezogen auf das kardiovaskuläre System, Reduktion der Zellfunktion und Energieverbrauch durch Induktion von Bradykardie, Hypotension und koronarer Vasodilatation beschrieben werden [110–112]. Dabei scheint die myokardiale Adenosin-Freisetzung einen entscheidenden Beitrag zur metabolischen Regulation des koronaren Blutflusses zu leisten [113].

Die Nomenklatur der Purinozeptoren umfasst zwei Gruppen, von denen sich die P<sub>1</sub>-Purinozeptoren durch eine hohe Affinität zu Adenosin auszeichnen. Dabei werden die Rezeptoren A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R und A<sub>3</sub>R unterschieden, welche durch Kopplung mit G-Proteinen die Aktivität der Adenylatzyklase modifizieren. Aufgrund der Abschwächung stimulatorisch wirkender Katecholamineffekten vermittelt der A<sub>1</sub>R dabei kardiale Funktionsreduktion durch negative chronotrope, dromotrope und inotrope Effekte [110–112]. In Blutgefäßen konnten A<sub>2A</sub>R sowohl in glatten Muskelzellen als auch Endotheliumszellen nachgewiesen werden, welche mit einer Vasodilatation und positiver Inotropie assoziiert sind [114, 115] (Abb. 9). Diese Funktion wird auch den A<sub>2B</sub>R zugeschrieben [116, 117]. Via A<sub>3</sub>R scheint Adenosin kardioprotektive Effekte in ischämischen Zuständen und eine Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschaden zu induzieren [118].



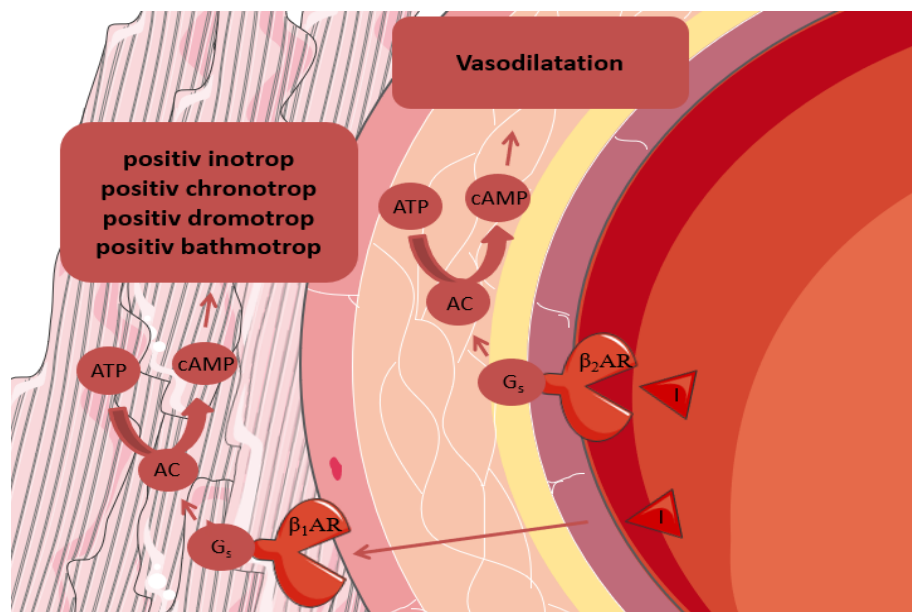
**Abb. 9: Vasomotorische Auswirkung von Adenosin im Herzen.** Auf endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen lokalisiert, vermitteln die A<sub>2</sub>R über ein stimulatorisches G-Protein (G<sub>s</sub>) eine Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) mit Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) in cAMP. Durch dieses wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, welche zur Phosphorylierung (P) von Ca<sup>2+</sup>-ATPase und Myosin-Leichtketten-Kinase (MLKK) und somit eine Vasodilatation der Koronargefäße induziert.

Im Rahmen des Medikamentenprotokolls wurde die Adenosin-Applikation auf eine Stoffkonzentration von 1 µmolar standardisiert. Durch Verwendung einer Spritzenpumpe konnte eine konstante und einheitliche Substanzkonzentration im Perfusat erzielt werden.

### 2.5.6.3 Isoproterenol

Isoproterenol, auch unter dem Freinamen Isoprenalin bekannt, ist ein synthetisch hergestelltes Noradrenalin-Derivat, welches als nicht-selektives Betasympathomimetikum Verwendung findet [119]. Im Gegensatz zu Noradrenalin, welches eine hohe Affinität gegenüber  $\alpha$ -Adrenozeptoren aufweist, ist Isoproterenol durch eine  $\beta$ -Adrenozeptoren Spezifität gekennzeichnet, vermittelt durch den Substituenten N-Isopropyl.

Im Herzen besteht eine Koexistenz von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren (Abb. 10). Dabei kann die Stimulation der  $\beta$ -Adrenozeptoren als ein physiologischer Mechanismus zur akuten Steigerung der kardialen *Performance* beschrieben werden [120]. Stimulationen der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren wirken positiv inotrop (Steigerung der Kontraktionskraft), positiv chronotrop (Erhöhung der Herzfrequenz), positiv dromotrop (Beschleunigung der Erregungsleitung) und positiv bathmotrop (Senkung der Reizschwelle) im Sinne einer Leistungssteigerung [121–123]. Eine Stimulation der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren induziert, durch Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, eine Vasodilatation. Diese Effekte werden durch Aktivierung der Adenylatzyklase vermittelt, welche mit einem Anstieg der cyclischen Adenosinmonophosphat Konzentration einhergeht [124].



**Abb. 10: Vasomotorische Auswirkung von Isoproterenol im Herzen.** Exprimierte  $\beta_1$ -Adrenozeptoren ( $\beta_1$ AR) des Myokards und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren ( $\beta_2$ AR) der Gefäßmuskulatur werden durch Isoproterenol stimuliert. Vermittelt über ein stimulatorisches G-Protein ( $G_s$ ) wird die Adenylatzyklase (AC) mit Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert.  $\beta_1$ AR induziert dabei eine akute kardiale Leistungssteigerung und  $\beta_2$ AR eine Vasodilatation

Im Rahmen des Medikamentenprotokolls wurde die Isoproterenol-Applikation auf eine Stoffkonzentration von 12 nmolar standardisiert. Durch Verwendung einer Spritzenpumpe konnte eine konstante und einheitliche Substanzkonzentration im Perfusat erzielt werden.

## 2.5.7 Langendorff Laborstudien – Ischämie/Reperfusionmodell

Über basale Charakterisierung hinaus sollten, durch Initiierung einer reversiblen Lokalischämie und folgender Reperfusion, weiterführende Darstellungen pathophysiologischer Adaptionen anämischer Versuchstiere erlaubt werden. Dazu wurde einem Protokoll folgend, für ein definiertes Zeitintervall der RIVA der Arteria coronaria sinistra durch eine reversible Ligatur okkludiert (Tabelle 11).

Im Rahmen der Präparation der Versuchstierherzen für die Langendorff Laborstudien wurde eine offene Ligatur um den RIVA vorgelegt. Dabei wurde eine proximale Lokalisation innerhalb des Verlaufes der Arterie angestrebt, um eine relevante Beeinträchtigung zu erzielen.

Nach adäquater Kalibrierung konnte eine Lokalischämie induziert werden, indem innerhalb der vorgezogenen Schlinge ein angepasstes PVC Stück auf dem RIVA platziert und mittels Ligatur fixiert wurde. Der konstant generierte Druck initiierte eine relevante Okklusion des RIVA. Eine hinreichende Beeinträchtigung wurde durch Reduktion des koronaren Flusses um mindestens 30% und dem Einsetzen von Blässe im RIVA Versorgungsgebiet bestätigt. Diese Okklusion wurde für 45 Minuten aufrecht gehalten.

Nach definierter Lokalischämie konnte, durch Entfernung des PVC Stück, die Reperfusion eingeleitet werden. Um sicher das Ausmaß der Infarzierung durch die temporäre Lokalischämie auswerten zu können, wurde eine Reperusionsphase über 60 Minuten definiert.

| <b>Protokollabschnitt</b>                        | <b>Beschreibung</b>   |
|--|---|
| <i>Lokalischämie durch RIVA Okklusion (5-11)</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aufzeichnung einer 1-minütigen „Baseline“ Phase</i></li> <li>- <i>Induktion der Lokalischämie durch Einsetzen des PVC Schlaustück unter Ligatur</i></li> <li>- <i>Verifizierung einer hinreichenden Beeinträchtigung durch Abfall des koronaren Flusses und durch Sichtkontrolle (distale Blässe)</i></li> <li>- <i>Aufzeichnung einer 1-minütigen „Ischämie“ Phase zu den Messpunkten 5., 10., 20., 30., 40. und 45. Minute</i></li> </ul> |
| <i>Reperfusion (12 -18)</i>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Reperfusion durch Entfernung des PVC Schlauchstückes</i></li> <li>- <i>Aufzeichnung einer 1-minütigen „Reperfusion“ Phase zu den Messpunkten 5., 10., 20., 30., 40., 50., und 60. Minute</i></li> <li>- <i>Reperfusion bis 120. Minuten fortführen</i></li> </ul>   |
| <i>Versuchsende</i>                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Beendigung des Studie Protokoll</i></li> <li>- <i>Entfernung des Herzens aus dem Langendorff-Modell</i></li> </ul>  |

**Tabelle 11: Darstellung des Ischämie/Reperfusionereignis in Langendorff Laborstudien.** Zur Induktion standardisierter Ischämie/Reperfusionsschäden wurden Ischämie- und Reperusionsintervalle definiert. In Klammern dargestellten Zahlen benennen dabei definierte Messpunkte.

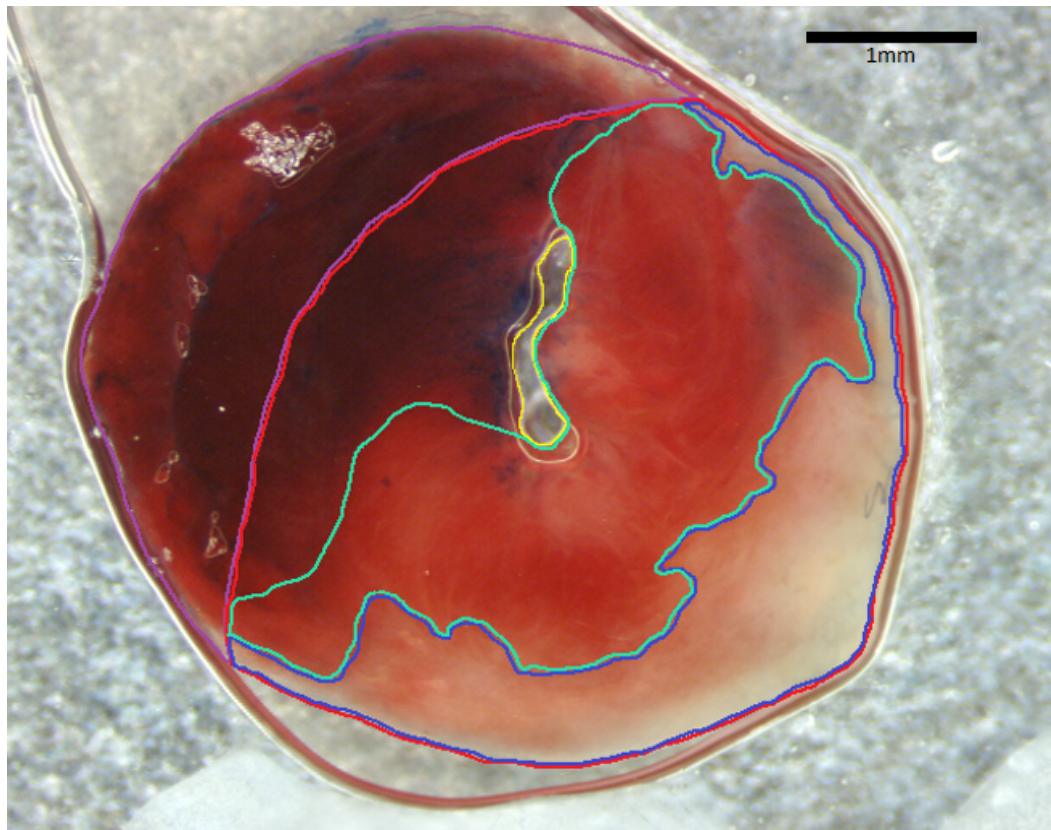
Im Rahmen einer Infarktgrößenbestimmung wurden die pathophysiologischen Adaptationen auf eine definierte Lokalischemie in Anämie unterworfenen Versuchstieren und Kontrollen gegenübergestellt. Eine Differenzierung des Myokards erfolgte durch zwei Färbeschritte (Tabelle 12) und wurde durch ein Lichtmikroskop detektiert (Abb. 11).

Durch Einfärbung der Versuchstierherzen mithilfe des Farbstoffs Evans Blau erfolgte eine Unterscheidung zwischen Myokard, welches einem ischämischen Zustand unterworfen war, definiert als „Area at risk“ (AAR) und unbeeinträchtigtem Myokard. Dazu wurde an der ehemaligen Ligaturposition eine irreversible Okklusion gesetzt. Der über die Stahlkanüle applizierte blaue Farbstoff breitete sich, dem Gefäßbaum folgend, in alle nicht okkludierten Bereiche des Myokards aus.

Der Redoxfarbstoff Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) erlaubt als histochemisches Verfahren eine Abgrenzung des Infarktareals vom umliegenden Gewebe. Dabei fungierte TTC als Nachweis intakter mitochondrialer Funktion, welche in einer enzymatischen Reaktion den Farbstoff Triphenyltetrazoliumchlorid zu dem roten Farbstoff Formazan reduziert. Bei Schädigung der Mitochondrien und einhergehendem Funktionsverlust konnte diese Reaktion nicht ablaufen und die Areale verblieben ungefärbt bzw. erschienen im Präparat blass [125].

| <b>Protokollabschnitt</b> | <b>Beschreibung</b>   |
|---------------------------|---|
| <i>Evans Blau Färbung</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Seidenligatur an ehemaliger Ligaturposition setzen</i></li> <li>- <i>Evans Blau über Stahlkanüle applizieren</i></li> <li>- <i>Farbreste mittels NaCl entfernen</i></li> </ul>  |
| <i>Herzaufbereitung</i>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Leicht abgetupftes Herz auswiegen</i></li> <li>- <i>Unter Kennzeichnung in Tiefkühlschrank bei -20°C für 1 Stunde tief-frieren</i></li> <li>- <i>Gefrorenes Herz in 1mm dicke Scheiben schneiden</i></li> <li>- <i>Einzelne Herzschnitte auswiegen</i></li> </ul> |
| <i>TTC Färbung</i>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Einzelne Herzschnitte jeweils in Mikroreaktionsgefäß mit 500µL TTC Farblösung geben</i></li> <li>- <i>Im Mikroreaktionsgefäß für 5 Minuten bei 38°C inkubieren</i></li> <li>- <i>Herzscheiben auf Objektträger übertragen</i></li> </ul>                          |
| <i>Detektion</i>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Unter Lichtmikroskop werden die einzelnen Herzscheiben abgebildet</i></li> </ul>  |

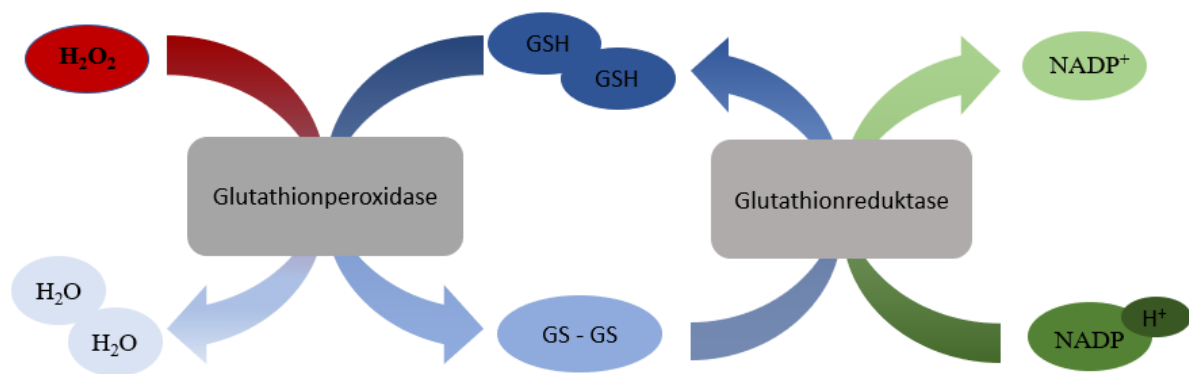
**Tabelle 12: Darstellung der Infarktgrößenbestimmung durch Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC).** Durch zwei Färbeschritten erfolgte eine Differenzierung des Myokards. Bei der Herzaufbereitung war darauf zu achten, dass die Summe der Herzschnitte-Gewichte mehr als 50% des Gewichtes des leicht abgetupften Herzens darstellen, um eine repräsentative Auswertung zu erlauben.



**Abb. 11: Darstellung der Ausmessung eines Herzschnittes nach Infarkteinfärbung.** Um Aussagen über Infarktgrößen treffen zu können, waren in Herzschnitten Flächen (mm\*mm) zu definieren und zu bemessen. **Rot:** Gesamtfläche linker Ventrikel. **Gelb:** Lumen linker Ventrikel. **Blau:** Infarktareal. **Violett:** Gesamtfläche rechter Ventrikel. **Grün:** unter Risiko stehendes aber intaktes Myokard. Daraus lassen sich Flächen sowohl direkt (Infarktareal = Blau) als auch durch Berechnung (Area at risk = Grün und Blau) darstellen.

## 2.6 Oxidativer Stress – Glutathion Assay

Zur Evaluation des Redoxstatus der Versuchstiergruppen wurden der Gehalt von reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GS-SG) in Versuchsproben bestimmt. Diese unterlagen dem physiologischen Glutathion Stoffwechsel (Abb. 12). Hierfür wurden Proben aus Plasma, Erythrozyten und Herz aufbereitet und untersucht. Die Messungen erfolgten mittels *Glutathione Fluorescent Detection Kit* (K006-F5). Das Messprinzip des *Kits* beruht auf der kovalenten Bindung eines *Tracers* an die Thiolgruppe des GSH, durch welche hochfluoreszierenden Produkte erzeugt wurden, welche mit Hilfe eines Photometers bei einer Extinktion von 510 nm und Erregung von 410 nm gemessen wurden.



**Abb. 12: Darstellung des physiologischen Stoffwechsels von Glutathion.** Glutathion liegt im Organismus in reduzierter (GSH) oder oxidiertem (GS-SG) Form vor. Dabei können zwei GSH durch die Glutathionperoxidase ein Radikal Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in Wasser (H<sub>2</sub>O) antioxidieren. Dabei werden sie in ihre oxidierte Form überführt. Diese kann durch die Glutathionreduktase unter Verwendung von NADPH in seine reduzierte Form zurückgeführt werden.

### 2.6.1 Probengewinnung und Probenaufbereitung

Die Proben „Plasma“, „Erythrozyten“ und „Herz“ wurden nach standardisierten Angaben den *Glutathione Fluorescent Detection Kit* Protokollen aufbereitet. Zur weiteren Differenzierung wurden basal gewonnene Proben und Proben, welche 24 Stunden post *in vivo* Ischämie/Reperfusionereignis erhoben wurden, verglichen. Die erhobenen Proben wurden nach ihrer Gewinnung in Stickstoff schockgefrostet und über einen Zeitraum von maximal drei Monaten in einem -80°C Kälteschrank aufbewahrt. Im Rahmen einer Proteinfällung wurden Proteinpellets aus den Proben gewonnen, um Ergebnisse in Hinblick auf ihren Proteingehalt normieren zu können. Für eine exakte Bestimmung des Glutathiongehalts einer Probe war eine Anpassung der Zielverdünnung erforderlich, um dem Messbereich des Assays zu entsprechen.

### 2.6.1.1 Probe „Plasma“

In Etablierung des Protokolls zur Probengewinnung und Aufbereitung der Probe „Plasma“ wurden spezifische Eigenschaften und Gegebenheiten geachtet (Tabelle 13).

| <b>Protokollabschnitt</b> | <b>Beschreibung</b>   |
|---------------------------|---|
| Probenaufbereitung        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Retrobulbär bezogene Vollblutprobe zentrifugieren (3 min, 5670 rpm, 4°C)</li> <li>- Überstehendes Blutplasma gewinnen</li> <li>- Probe „Plasma“ in Mikroreaktionsgefäß wegfrieren</li> <li>- Zum Studienzeitpunkt Probe schonend auf Eis auftauen</li> </ul>   |
| Proteinfällung            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1:2 Verdünnung der Probe mit 5% Sulfosalicylsäure Lösung</li> <li>- Inkubation: 10 Minuten, 4°C</li> <li>- Zentrifugation: 10 Minuten, 14000 rpm, 4°C</li> <li>- Suspensionsüberstand in frisches Mikroreaktionsgefäß übertragen<br/>→ Probe „Plasma_neu“</li> <li>- Proteinpellet bis zur Proteinbestimmung kühlen</li> </ul> |
| Zielverdünnung            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1:2,5 Verdünnung der Probe „Plasma_neu“ mit Assay Buffer</li> </ul>  |

**Tabelle 13: Protokoll zur Bearbeitung der Probe „Plasma“ im Glutathion Assay.** Um die Probe „Plasma“ mit dem Assay zu messen, war eine Zielverdünnung auf 1:5 zu etablieren.

### 2.6.1.2 Probe „Erythrozyten“

In Etablierung des Protokolls zur Probengewinnung und Aufbereitung der Probe „Erythrozyten“ wurden spezifische Eigenschaften und Gegebenheiten geachtet (Tabelle 14).

| <b>Protokollabschnitt</b> | <b>Beschreibung</b>   |
|---------------------------|---|
| Probenaufbereitung        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Retrobulbär bezogene Vollblutprobe zentrifugieren (3 min, 5670 rpm, 4°C)</li> <li>- Probe mit 1000µL NaCL waschen; dabei Plasma und Buffy Coat abtragen</li> <li>- Probe „Erythrozyten“ in Mikroreaktionsgefäß wegfrieren</li> <li>- Zum Studienzeitpunkt Probe schonend auf Eis auftauen</li> </ul>                                 |
| Proteinfällung            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1:5 Verdünnung der Probe mit 5% Sulfosalicylsäure Lösung</li> <li>- Inkubation: 10 Minuten, 4°C</li> <li>- Zentrifugation: 10 Minuten, 14000 rpm, 4°C</li> <li>- Suspensionsüberstand in frisches Mikroreaktionsgefäß übertragen<br/>→ Probe „Erythrozyten_neu“</li> <li>- Proteinpellet bis zur Proteinbestimmung kühlen</li> </ul> |
| Zielverdünnung            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1:4 Verdünnung der Probe „Erythrozyten_neu“ mit Assay Buffer</li> <li>- 1:5 Verdünnung der Probe mit Sample Diluent</li> </ul>   |

**Tabelle 14: Protokoll zur Bearbeitung der Probe „Erythrozyten“ im Glutathion Assay.** Um die Probe „Erythrozyten“ mit dem Assay zu messen, war eine Zielverdünnung auf 1:100 zu etablieren.

### 2.6.1.3 Probe „Herz“

In Etablierung des Protokolls zur Probengewinnung und Aufbereitung der Probe „Herz“ wurden spezifische Eigenschaften und Gegebenheiten geachtet (Tabelle 15).

| <b>Protokollabschnitt</b> | <b>Beschreibung</b>  |
|---------------------------|--|
| Probenaufbereitung        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Explantation, Probe „Herz“ in Mikroreaktionsgefäß wegfrieren</li> <li>- Homogenisierung der Herzen in 250µL Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pro 10 mg Herzgewicht</li> <li>- Zentrifugation: 10 Minuten, 14000 rpm, 4°C</li> <li>- Suspensionsüberstand in frisches Mikroreaktionsgefäß übertragen<br/>→ Probe „Herz_lysiert“</li> </ul> |
| Proteinfällung            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1:2 Verdünnung der Probe „Herz_lysiert“ mit 5% Sulfosalicylsäure Lösung</li> <li>- Inkubation: 10 Minuten, 4°C</li> <li>- Zentrifugation: 10 Minuten, 14000 rpm, 4°C</li> <li>- Suspensionsüberstand in frisches Mikroreaktionsgefäß übertragen<br/>→ Probe „Herz_neu“</li> <li>- Proteinpellet bis zur Proteinbestimmung kühlen</li> </ul>   |
| Zielverdünnung            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1:2.5 Verdünnung der Probe „Herz_neu“ mit Sample Diluent</li> </ul>   |

**Tabelle 15: Protokoll zur Bearbeitung der Probe „Herz“ im Glutathion Assay.** Um die Probe „Herz“ mit dem Assay zu messen, war eine Zielverdünnung auf 1:5 zu etablieren.

### 2.6.2 Glutathione Fluorescent Detection Assay

Die Messungen der jeweiligen Proben wurden nach Angaben des *Glutathione Fluorescent Detection Kit* Protokolls durchgeführt (Tabelle 16). Zur Quantifizierung des Fluoreszenzsignals wurden Konzentrationsreihen durch Glutathion Standards gegenübergestellt, welche den Detektionsbereich definierten.

| <b>Protokollabschnitt</b> | <b>Beschreibung</b>  |
|---------------------------|--|
| Auftragen Proben          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 µL aufbereitete Probe, Standard oder Kontrolle in Well übertragen</li> <li>- 25 µL ThioStar Reagenz (Tracer) in jedes Well</li> </ul>                        |
| Messung<br>freies GSH     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inkubation: 15 Minuten, Raumtemperatur, lichtgeschützt</li> <li>- Auswertung des Fluoreszenzsignales: Extinktion bei 510 nm mit Erregung bei 410 nm)</li> </ul> |
| Messung<br>totales GSH    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 25 µL Reaktionsmischung in jedes Well</li> <li>- Auswertung des Fluoreszenzsignales: Extinktion bei 510 nm mit Erregung bei 410 nm)</li> </ul>                  |

**Tabelle 16: Protokoll zur Messung von Proben im Glutathion Assay.** Mittels photometrischer Messung konnten Proben auf Glutathion (GSH) bemessen und durch Standardreihen quantifiziert werden.



### 2.6.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Um eine Normierung der erhobenen Glutathiongehalte durchführen zu können, wurden die gewonnenen Proben auf ihren quantitativen Proteingehalt hin bemessen. Dazu wurde ein Protokoll etabliert, welches die Grundzüge der Proteinbestimmung nach Lowry berücksichtigte und als Kit den *Bio-Rad DC Protein Assay* verwendete.

Die separierten Proteinpellets wurden, um wieder in Lösung gebracht zu werden, in 0,1% Natriumdodecylsulfat Lösung, welche mit 0,1 molar NaOH versetzt wurden, gelöst. Die aufbereiteten Proteinproben wurden durch Zugabe von Millipore auf die jeweilige Zielkonzentration verdünnt (Tabelle 17).

| <b>Probenart</b> | <b>Zielkonzentration</b> | <b>Probenvolumen</b> | <b>Volumen zur Verdünnung</b> | <b>Gesamtvolumen nach Verdünnung</b> |
|------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| „Herz“           | 1:75                     | 5 µL                 | 370 µL                        | 375 µL                               |
| „Erythrozyten“   | 1:200                    | 5 µL                 | 995 µL                        | 1000 µL                              |
| „Plasma“         | 1:4                      | 5 µL                 | 15µL                          | 20 µL                                |

**Tabelle 17: Übersicht über Zielverdünnung der Proben zur Proteinbestimmung.** Proben wurden in 1mL Lösung gelöst und die Suspension wurde durch einen Probenschüttler in drei Stunden bei 60°C und 800 rpm homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Verdünnung auf die Zielkonzentration.

Die aufbereiteten Proben wurden nach dem Protokoll mit Reagenzien versetzt und nach Inkubation durch ein Photometer gemessen (Tabelle 18). Als Standard fungierte eine Konzentrationsreihe, welche auf einer Lösung von bovinem Serumalbumin und Millipore beruhte.

| <b>Protokollschritt</b> | <b>Beschreibung</b>  |
|-------------------------|--|
| Auftragen Probe         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 µL verdünnte Probe in Well übertragen</li> <li>- 25 µL Reagenz A` in Well beifügen</li> <li>- 200µL Reagenz B in Well beifügen</li> </ul> |
| Messung Protein         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inkubation: 15 Minuten, Raumtemperatur, lichtgeschützt</li> <li>- Auswertung des Absorptionsvermögens bei 750 nm</li> </ul>                 |

**Tabelle 18: Protokoll Durchführung des Protein Assay.** Mittels photometrischer Messung konnte Proben in ihrem Signal bemessen und durch parallel geführte Standardreihen quantifiziert werden.

## **2.7 Datenerfassung und Datenverarbeitung**

Für die Datenerfassung und Verarbeitung der verschiedenen Untersuchungsformen wurden spezifische Messinstrumente und Softwares verwendet.

### **2.7.1 Anämieinduktion**

Im Rahmen der Etablierung und Durchführung des Anämieinduktion-Protokolls wurden Blutproben durch das Blutbildanalysegerät *Scil Vet ABC™ Hematology Analyzer* erfasst und verarbeitet und als Resultate analog dargestellt.

### **2.7.2 Echokardiographie**

Zur Erhebung von Messparametern der *in vivo* Untersuchung der Echokardiographie wurde das Ultraschallgerät *Vevo 2100* unter Nutzung der Schallköpfe *MS 400/700* verwendet. Messergebnisse und Aufnahmen konnten durch die Software *VevoLAB 1.7.1* verarbeitet und dargestellt werden.

### **2.7.3 Langendorff Laborstudien**

In Langendorff Laborstudien wurden durch verschiedene Messgeräte erhobene Ergebnisse mittels eines Verstärkermoduls und der Hardware *PowerLab 8/30* ermittelt und durch die Software *IOX 2.4.5.6* verarbeitet und dargestellt.

### **2.7.4 Glutathion Bestimmung**

Aufbereitete Proben des Glutathion- und Protein-Assays wurden durch den *Microplate Reader FLUOstar Omega, S/N 415-1204* erfasst und durch Gegenüberstellung mit Standards quantifiziert. Zur Verarbeitung und Darstellung der Ergebnisse wurde die zugehörige *Reader Control Software* verwendet.

## 2.8 Statistische Auswertungen der Messergebnisse

Die Ergebnisse werden jeweils als Mittelwert ( $\bar{X}$ )  $\pm$  Standardabweichung (s) unter Angabe der Anzahl der Proben (n) dargestellt:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n x_i$$

**Gleichung 2: Berechnung des Mittelwertes.** Der Mittelwert ( $\bar{X}$ ) wird gebildet aus der Anzahl der Proben (n) und der Summe der Messwerte ( $\Sigma$ ) unter Achtung des Laufindex (i).

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

**Gleichung 3: Berechnung der Standardabweichung.** Die Standardabweichung (s) wird gebildet aus der Wurzel der Summe ( $\Sigma$ ) vom Quadrat über der Differenz aller Messergebnisse unter Einbezug des Mittelwertes ( $\bar{x}$ ) und unter Achtung des Laufindex (i). Da es sich um eine Stichprobe handelt wird der Divisor n-1 eingesetzt.

Zur Testung, ob zwei unabhängigen Stichproben sich in ihren zentralen Tendenzen unterscheiden, wurde der ungepaarte Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Um intraindividuelle Effekte beurteilen zu können, wurde ein gepaarter Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Sie durften angewendet werden, da die Variablen ordinalskaliert waren und somit dem Prinzip der Rangierung entsprochen werden konnte. Ein parametrisches Verfahren durfte nicht Anwendung finden, da die Voraussetzung der Normalverteilung der Daten, bei den erhobenen Stichprobengrößen nicht erfüllt war.

Unterschiede wurden nach Signifikanzniveaus bewertet. Ein p-Wert von  $\leq 0,1$  wurde dabei als Trend, ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als signifikant (\*), ein p-Wert von  $\leq 0,01$  als sehr signifikant (\*\*), ein p-Wert von  $\leq 0,001$  als hoch signifikant (\*\*\*) und ein p-Wert von  $\leq 0,0001$  als höchst signifikant (\*\*\*\*) bezeichnet. Für die statistischen Analysen wurde die Software *Graph-Pad Prism 6* verwendet.

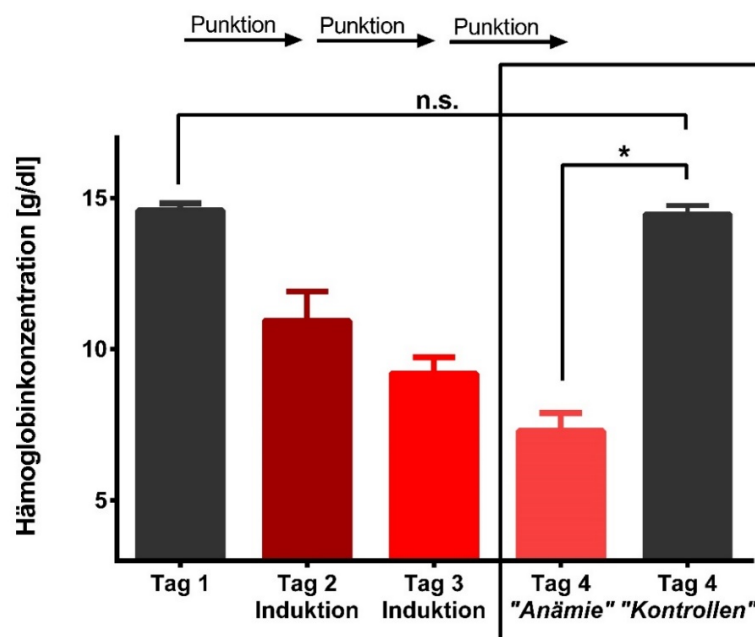
### 3. Ergebnisse

Nach Erhebung der Daten für „anämische Mäuse“ und „Kontrollen“ wurden diese im Rahmen statistischer Auswertung gegenübergestellt, um mögliche Effekte einer Anämieinduktion auf die kardiale Funktion und Integrität darzustellen.

#### 3.1 Anämieinduktion

Repetitive Punktionen nach dem etablierten Protokoll der Anämieinduktion erzielten in randomisierten Versuchsmäusen die Initiation eines akut anämischen Zustandes, definiert durch eine venöse Vollblutprobe mit einer Hb-Konzentration  $< 9$  g/dl.

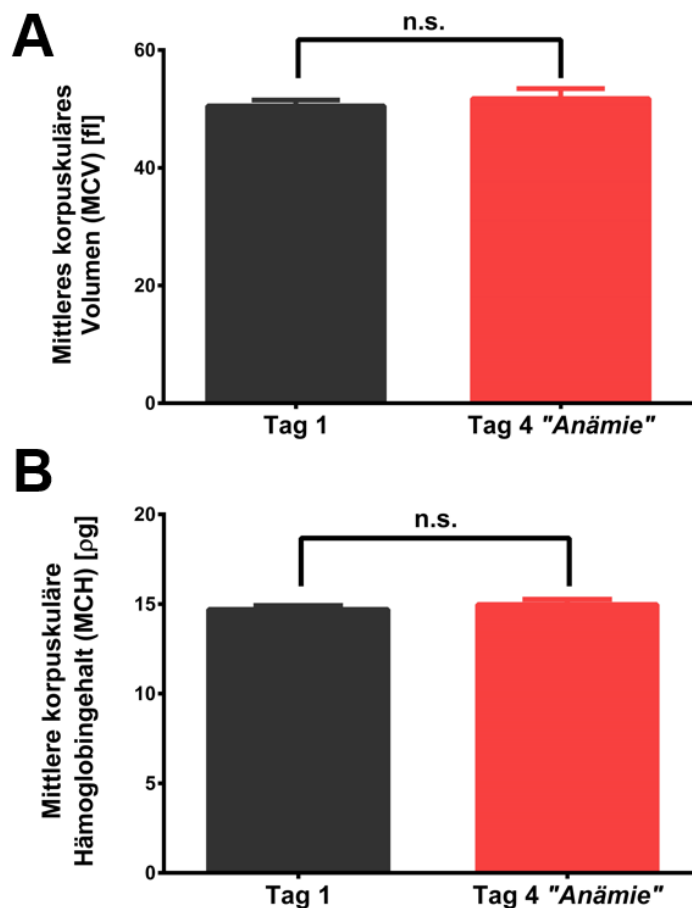
Der Effekt der Blutentnahmen konnte durch Darstellung der Entwicklung der Hb-Konzentrationen von „anämischen Mäusen“ unter Punktion im Vergleich zu „Kontrollen“ beschrieben werden (Abb. 13). Dabei konnte aufgezeigt werden, dass die Hb-Konzentrationen venöser Vollblutproben von Versuchsmäusen, ausgehend von einem Initialwert  $14,59 \pm 0,24$  g/dl ( $n=8$ ), nach drei Punktionstagen auf  $7,30 \pm 0,59$  g/dl ( $n=4$ ) reduziert werden konnte. Dies definierte den Punktionszeitraum auf drei Tage und den Etablierungszeitraum auf vier Tage. Zum Tag 4 konnte eine Unterscheidung zwischen „anämischen Mäusen“ und „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0286$  (\*) getroffen werden.



**Abb. 13: Repetitive Blutabnahmen induzierten eine Reduktion der Hämoglobinkonzentration (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$  \*:  $p < 0,05$ ;  $n_{\text{Tag}1}=8$   $n_{\text{Tag}2-4}=4$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). In Bestimmung der Hämoglobinkonzentration [g/dl] zur Bestätigung der Etablierung einer manifesten Anämie konnte in „anämischen Mäusen“ ein reduzierter Zustand aufgezeigt werden, welcher nicht auf mit dem Protokoll einhergehende Handhabung, sondern auf die Punktionen zurückzuführen war.**

Eine Unabhängigkeit der Hb-Konzentration von Faktoren unabhängig der Punktionen, konnte durch Erhalt der Hb-Konzentration in den „Kontrollen“ zum Tag 4 durch  $14,48 \pm 0,28$  g/dl (n=4) dargestellt werden.

In weiterer Charakterisierung des durch repetitiven Blutverlust induzierten anämischen Zustandes wurden die Erythrozytenindizes MCV und MCH vor und nach Anämieinduktion gegenübergestellt (Abb. 14). Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen initial erhobenen Messergebnissen und „anämischen Mäusen“ aufgezeigt werden. Zusätzlich wurde die mittlere korpuskuläre Hb-Konzentration zur Plausibilitätskontrolle herangezogen. Eine gleichgerichtete Entwicklung von MCV und MCH konnte in Auswertung individueller Adaptationen zu einem Signifikanzniveau von  $p > 0,9999$  (n=4) bestätigt werden.

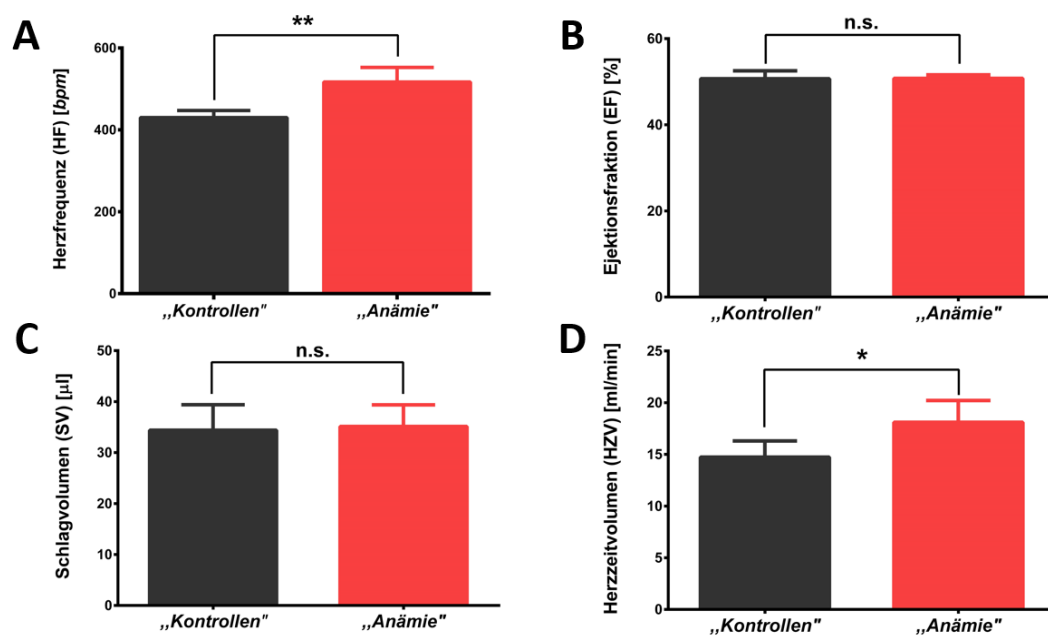


**Abb. 14:** In Anämieinduktion verblieben Erythrozytenindizes in „anämischen Mäusen“ normwertig (gepaarter Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; n.s.:  $p > 0,05$ ; n=4; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). **A** Im Vergleich des mittleren korpuskulärem Volumens (MCV) [fl] vor und nach Anämieinduktion konnten keine signifikanten Anpassungen festgestellt werden. **B** In Gegenüberstellung des mittleren korpuskulärem Hämoglobingehalts (MCH) [pg] konnten keine signifikanten Unterschiede über die Punktionen festgestellt werden.

## 3.2 Echokardiographie

Zur Analyse von Adaptionen unter Anämieinduktion konnten im Rahmen von *in vivo* Studien mittels transthorakaler Echokardiographie signifikante hämodynamische Anpassungen im Rahmen repetitiver Punktionen erhoben werden.

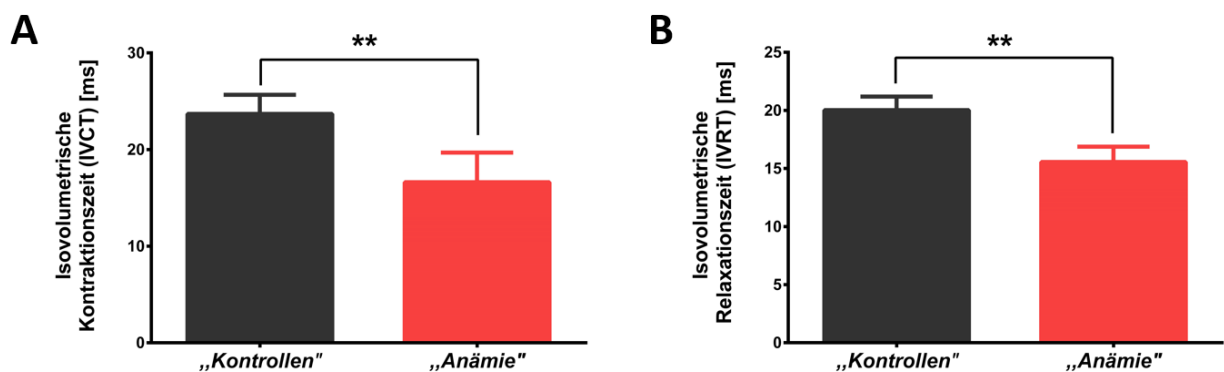
Die Herzfrequenz (HF) konnte in „anämischen Mäusen“, umschrieben durch  $516,92 \pm 35,81$  *bpms* ( $n=6$ ), gegenüber Messergebnissen von „Kontrollen“, umschrieben durch  $430,16 \pm 17,21$  *bpms* ( $n=5$ ), als signifikant gesteigert zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0043$  (\*\*) dargestellt werden (Abb. 15A). Unter vergleichbarer Ejektionsfraktion (EF) (Abb. 15B) und vergleichbarem Schlagvolumen (SV) (Abb. 15C) waren in Gegenüberstellung des HZV signifikante Unterschiede zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0303$  (\*) zu beschreiben (Abb. 15D). Das Blutvolumen, welches pro Minute vom linken Ventrikel befördert wurde, konnte in „Kontrollen“ durch  $14,73 \pm 1,57$  ml/min ( $n=5$ ) und in „anämischen Mäusen“ durch  $18,11 \pm 2,10$  ml/min ( $n=6$ ) wiedergegeben werden. In Beschreibung von endsystolischen und enddiastolischen Volumina des linken Ventrikels konnten keine signifikanten Unterschiede dargestellt werden.



**Abb.15: Echokardiographische Beschreibung einer Hyperdynamisierung der Kreislagsituation (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$ , \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ;  $n_K=5$   $n_A=6$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). A:** In Vergleich der Herzfrequenz (HF) [bpm] konnte eine signifikante Steigerung bei „anämischen Mäusen“ beschrieben werden. **B:** In Vergleich der Ejektionsfraktion (EF) [%] waren keine signifikanten Unterschiede zu beschreiben. **C:** Gegenüber „Kontrollen“ konnte in Bezug auf das Schlagvolumen (SV) [µl] in „anämischen Mäusen“ keine signifikanten Unterschiede dargestellt werden. **D:** „Anämische Mäuse“ wiesen ein signifikant höheres Herzzeitvolumen (HZV) [ml/min] als „Kontrollen“ auf.

Die Durchmesser des linken Ventrikels während Systole (Diameter; s) und Diastole (Diameter; d) waren in Auswertung nicht signifikant voneinander zu unterscheiden. In Darstellung der teilweisen Verkürzung des linken Ventrikels von Diastole zu Systole (*Fractional Shortening*) war eine signifikante Differenzierung zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0303$  (\*) möglich, indem in „Kontrollen“ Verkürzungen von  $28,36 \pm 3,31$  % (n=5) und in „anämischen Mäusen“ Verkürzungen von  $38,67 \pm 8,07$  % (n=6) zu beschreiben waren. In Gegenüberstellung der geschätzten absoluten Gewichte der linken Ventrikel konnten keine signifikanten Unterschiede ausgeführt werden.

In Vergleich der Ventrikelmotilität durch isovolumetrische Kontraktions- und Relaxationszeit (IVCT, IVRT) des linken Ventrikels konnten in „anämischen Mäusen“ signifikant kürzere Zeiten beschrieben werden. So konnte die IVCT in „Kontrollen“, ausgedrückt durch  $23,69 \pm 1,98$  ms (n=5), zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0087$  (\*\*) als signifikant länger beschrieben werden als in „anämischen Mäusen“, ausgedrückt durch  $16,62 \pm 3,06$  ms (n=6) (Abb. 16A). Gleichgerichtet war auch die IVRT zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0043$  (\*\*) zu unterscheiden und beschrieb das Zeitintervall in „Kontrollen“ mit  $20,03 \pm 1,16$  ms (n=5) gegenüber „anämischen Mäusen“ mit  $15,56 \pm 1,33$  ms (n=6) (Abb. 16B). Demgegenüber waren in Darstellung der Zeit der frühen Füllungsphase (*MV Decel*) und der Gesamtzeit der Füllung des linken Ventrikels (*MV ET*) keine signifikanten Unterschiede zu definieren.



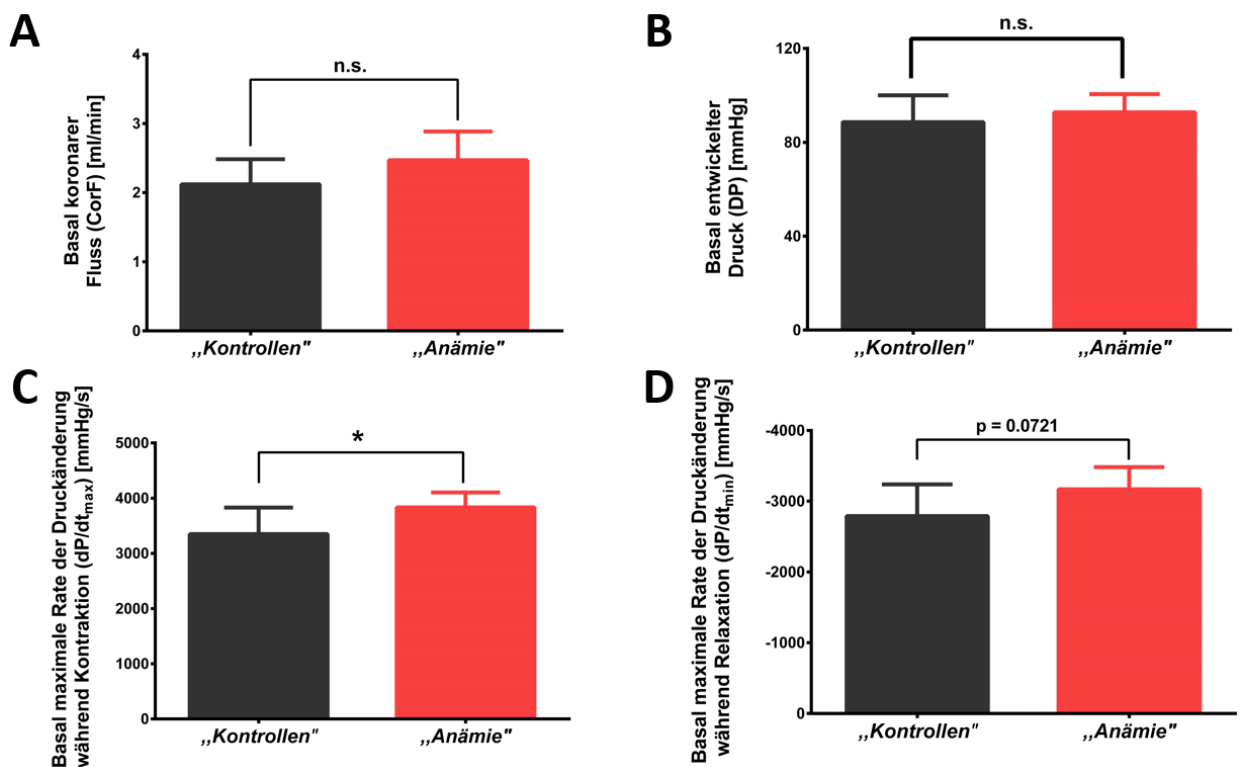
**Abbildung 16: Echokardiographisch erhobene IVCT und IVRT waren in „anämischen Mäusen“ verkürzt (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; \*\*:  $p < 0,01$ ;  $n_K = 5$   $n_A = 6$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). A: In Vergleich der Isovolumetrische Kontraktionszeit (IVCT) [ms] konnte den „anämischen Mäusen“ eine signifikant kürzere Kontraktionszeit nachgewiesen werden. B: Gleichgerichtet ist auch in Isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT) [ms] in „anämischen Mäusen“ eine signifikante Reduktion der Relaxationszeit zu beschreiben.**

### 3.3 Isoliert perfundiertes Herzmodell nach Langendorff

Zur Charakterisierung der kardialen Funktion von akuten Anämien unterworfenen Versuchstierherzen wurden diese im Vergleich zu nichtanämischen „Kontrollen“ durch *ex vivo* Untersuchung nach dem Modell des isoliert perfundierten Herzens nach Langendorff dargestellt und in Untersuchungssituationen verglichen.

#### 3.3.1 Langendorff Laborstudien - Kalibrierung

Im Rahmen der Kalibrierung konnten Messwerte erhoben werden, welche „Kontrollen“ und „anämischen Mäuse“ im Hinblick auf eine basale Charakterisierung gegenüberstellten. Um möglichst reelle Adaptionen definieren zu können, wurden Messergebnisse aus der Kalibrierung für die Langendorff Laborstudien - Substanzapplikation bezogen, welche ursprüngliche Zustände beschrieben (Abb. 17).

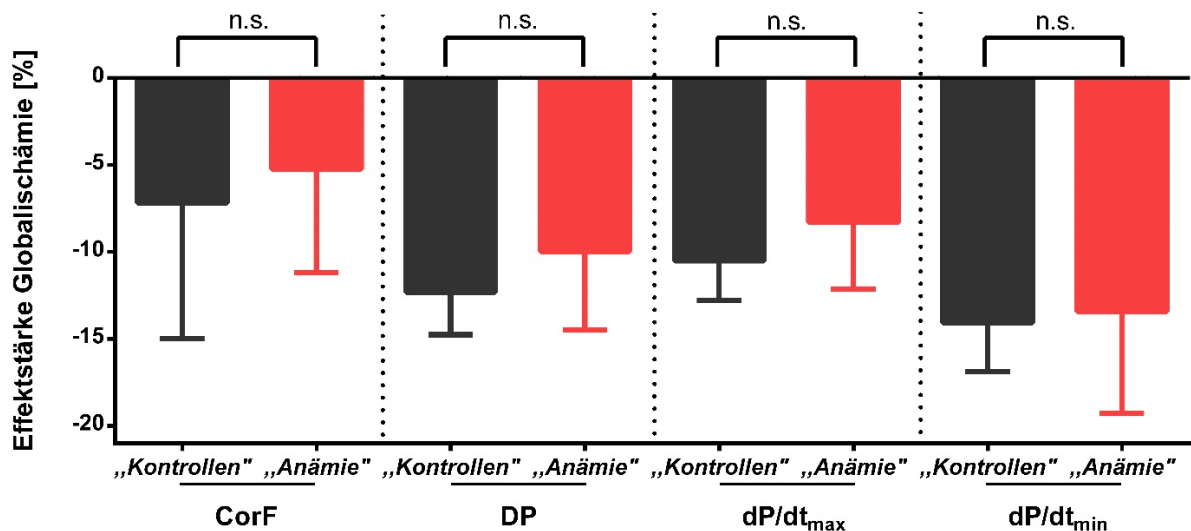


**Abb. 17: Anämieinduktion ging mit einer Steigerung myokardialer Funktionsparameter einher (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$ , \*:  $p < 0,01$ ;  $n_K = 7$   $n_A = 8$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). A:** In Darstellung des koronaren Fluss (CorF) [ml/min] konnten zwischen „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ keine signifikanten Unterschiede beschrieben werden. **B:** „Anämische Mäuse“ zeigten einen vergleichbaren entwickelten Druck (DP) [mmHg] gegenüber „Kontrollen“. **C:** In maximalen Raten der Druckänderung während Kontraktion ( $dP/dt_{max}$ ) [mmHg/s] konnten den „anämischen Mäusen“ eine signifikant höhere Druckänderungsrate zugesprochen werden. **D:** Gleichgerichtet ist in „anämischen Mäusen“ in Darstellung der maximalen Raten der Druckänderung während Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) [mmHg/s] ein Trend zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0721$  zu beschreiben.



Die Darstellung des detektierten basalen koronaren Fluss (CorF) konnte in den Versuchskohorten als nicht signifikant unterschiedlich, durch  $2,12 \pm 0,36$  ml/min ( $n=7$ ) in „Kontrollen“ gegenüber  $2,47 \pm 0,41$  ml/min ( $n=8$ ) in „anämischen Mäusen“ dargelegt werden (Abb. 17A). Der myokardiale Wirkungsgrad lässt sich durch Druckparameter beschreiben. Dabei ließen sich in Darstellung des entwickelten Drucks (DP) keine signifikanten Unterschiede zwischen „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ feststellen (Abb. 17B). Demgegenüber waren in den maximalen Raten der Druckänderung während Kontraktion und Relaxation ( $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$ ) Unterschiede zwischen „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ zu formulieren. In „anämischen Mäusen“ konnte in Auswertung des  $dP/dt_{max}$ , dargestellt durch  $3832,50 \pm 270,49$  mmHg/s ( $n=8$ ), eine signifikant (\*) höhere Druckentwicklung in Kontraktion gegenüber „Kontrollen“, dargestellt durch  $3335,86 \pm 461,39$  mmHg/s ( $n=7$ ), charakterisiert werden (Abb. 17C). Dies zeigte sich in Form eines statistischen Trends auch in  $dP/dt_{min}$ , welche durch  $-2790,57 \pm 449,16$  mmHg/s ( $n=7$ ) in „Kontrollen“ und  $-3168,88 \pm 314,24$  mmHg/s ( $n=8$ ) in „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0721$  (n.s.) zu unterscheiden wären (Abb. 17D).

Die zur Erhaltungsbeurteilung eingesetzten Globalischämien gingen mit Beeinträchtigung kardialer Funktionsparameter beider Untersuchungsgruppe einher (Abb. 18). Dabei konnten die Effektstärken der limitierenden Wirkung der Globalischämie in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ als vergleichbar beschrieben werden.



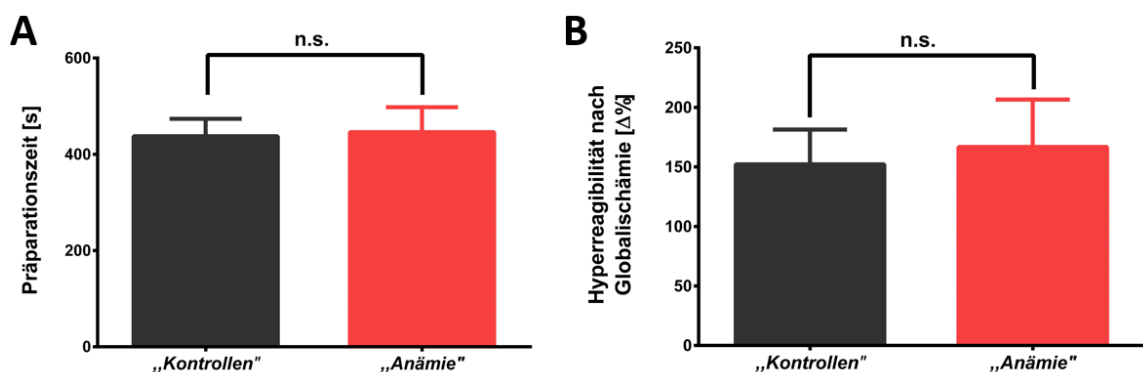
**Abb. 18: Globalischämie induzierte eine vergleichbare Beeinträchtigung kardialer Funktionen (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$ ;  $n_K=7$   $n_A=8$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ).** Der etablierte Globalischämie kann einen Effekt im Sinne einer Beeinträchtigung [%] der kardialen Funktion im koronarem Fluss (CorF), entwickeltem Druck (DP), der maximalen Rate der Druckänderung in Kontraktion ( $dP/dt_{max}$ ) und der maximalen Rate der Druckänderung während Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) dargelegt werden. In Gegenüberstellung der Effektstärke konnten in „Kontrollen“ und „Anämie Mäusen“ keine signifikanten Unterschiede beschrieben werden.

Individuelle Anpassung des CorF nach Globalischämie konnten in den „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,1094$  (n.s.), sowie in den „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0547$  (n.s.) unterschieden werden. Eine signifikante Reduktion des DP unter Globalischämie konnte in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) und in „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau  $p = 0,0078$  (\*\*) dargestellt werden. In Beschreibung des  $dP/dt_{max}$  konnte eine signifikante Minderung der Funktion, dargestellt in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) und „anämischen Mäuse“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*), aufgezeigt werden. Konkordant konnten in Darstellung des  $dP/dt_{min}$  in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) und in „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) Differenzen aufgezeigt werden. Dies stellt vergleichbare Limitierungen kardialer Funktionen in „anämischen Mäusen“ und „Kontrollen“ durch eine kurzzeitige Globalischämie dar.

### 3.3.2 Langendorff Laborstudien - Substanzapplikation

Im Rahmen von Langendorff Laborstudien wurden durch Applikation der kardiovaskulär wirksamen Substanzen Bradykinin, Adenosin und Isoproterenol deren Effekte auf „Kontrollen“ und „anämische Mäuse“ beobachtet.

Im Rahmen der Kalibrierungsphase konnte ein hinreichender Erhaltungszustand der Versuchstierherzen dargestellt werden. Als Indikator für eine erfolgreiche Präparation fungierte eine kurze Präparationszeit, welche minimiert und in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,9038$  (n.s) gleichgeschaltet werden konnte (Abb. 19A). Als Kriterium eines hinreichenden Erhaltungszustandes wurde eine Hyperreagibilität auf Globalischämie um  $> 100 \Delta\%$  definiert, welche in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ erfüllt wurde, ohne dass signifikante Unterschiede zu beschreiben waren (Abb. 19B).



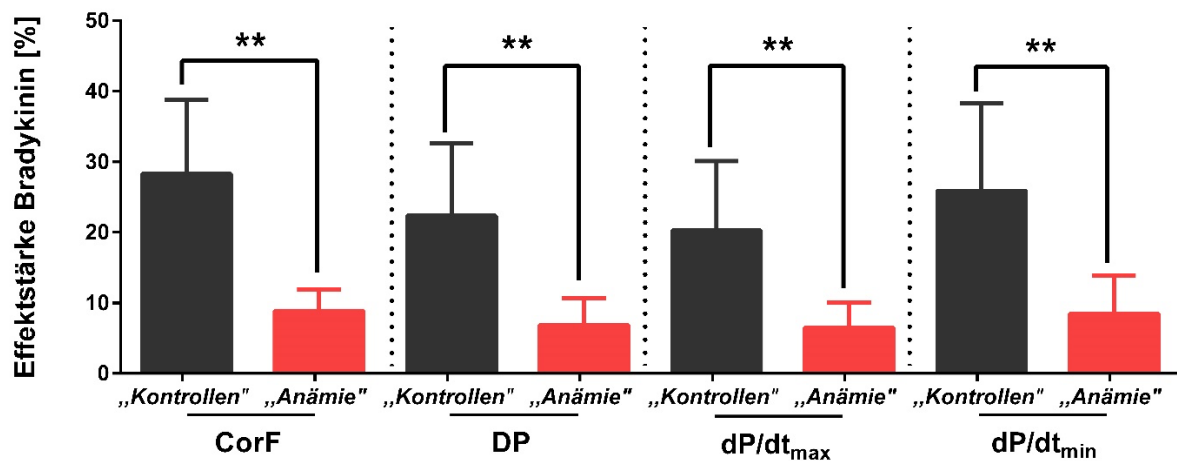
**Abb. 19:** „Kontrollen“ und „anämische Mäuse“ waren nach Präparation vergleichbar. (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). **A:** In „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ konnte eine vergleichbare Präparationszeit [s] erzielt werden ( $n_K=6$   $n_A=8$ ) **B:** Eine hinreichende Hyperreagibilität [Δ%] qualifiziert die Versuchstierherzen zur Auswertung. Darüber hinaus waren zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede zu beschreiben ( $n_K=7$   $n_A=8$ ).

### 3.3.2.1 Bradykinin

Bradykinin konnte vasodilatierende und myokardial stimulierende Effekte in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ zugeschrieben werden, bei einer signifikant gesteigerten Effektstärke in „Kontrollen“ (Abb. 20).

In Darstellung des CorF konnte in „Kontrollen“ und in „anämischen Mäusen“ durch Applikation eine individuelle Steigerung zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0313$  (\*) gegenüber Baseline dargestellt werden. Dabei war die Effektstärke in „Kontrollen“ und „anämische Mäuse“ signifikant zu unterscheiden. In „Kontrollen“ war eine Steigerung um  $28,30 \pm 10,46$  % (n=6) zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0022$  (\*\*) als höher zu charakterisieren als in „anämischen Mäuse“, umschrieben durch  $8,88 \pm 2,98$  % (n=6).

Über einen vasodilatierenden Effekt hinaus konnten auch signifikante Steigerungen des DP und der Kontraktilitätsparameter  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  definiert werden. Eine Unterscheidung der individuellen Basal- zu Effektparametern war in Auswertung des DP in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0313$  (\*) und „anämischen Mäusen“ zu einem statistischen Trend von  $p = 0,0625$  (n.s.) möglich. Der dabei detektierte Anstieg des DP, beschrieben in „Kontrollen“ durch Zunahme um  $22,33 \pm 10,34$  % (n=6) und in „anämischen Mäusen“ durch Zunahme um  $6,85 \pm 3,81$  % (n=6), ließ sich zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0022$  (\*\*) unterscheiden.

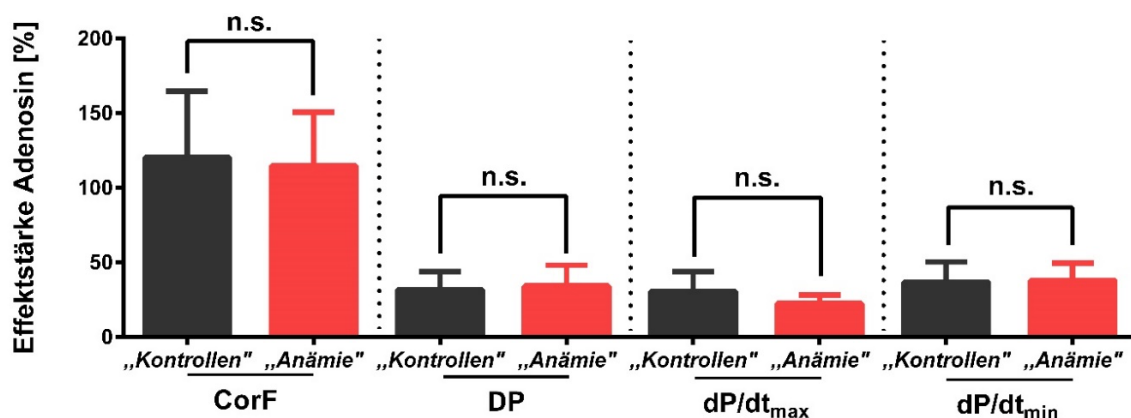


**Abb. 20: Bradykinin zeigte in „Kontrollen“ ein höheres Effektmaß (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; \*\*:  $p < 0,01$ ; n=6; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). In Auswertung der Effekte [%] konnte Bradykinin eine vasodilatierende und kardiale Funktion steigernde Wirkung beschrieben werden. Beschriebene Effekte konnte in Darstellung von koronarem Fluss (CorF), entwickeltem Druck (DP), der maximalen Rate der Druckänderung in Kontraktion ( $dP/dt_{max}$ ) und der maximalen Rate der Druckänderung während Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) in „Kontrollen“ als signifikant stärker dargestellt werden als in „anämischen Mäusen“.**

Einhergehend mit einer Steigerung des DP konnte eine signifikante Steigerung des  $dP/dt_{max}$  definiert werden. So konnte ein individueller Anstieg des  $dP/dt_{max}$  zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0313$  (\*) in „Kontrollen“ und in „anämischen Mäusen“ dargestellt werden. Darüber hinaus ließ sich ein signifikant differenzielles Effektmaß zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0043$  (\*\*) beschreiben, wonach „Kontrollen“ mit einer Zunahme um  $20,30 \pm 9,78$  % ( $n=6$ ) eine stärkeren Anstieg formulierte als „anämische Mäuse“, dargestellt durch eine Zunahme um  $6,52 \pm 3,56$  % ( $n=6$ ). Gleichgerichtet ließen sich Effekte auf den  $dP/dt_{min}$  darstellen. Zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0313$  (\*) in „Kontrollen“ und zu einem statistischen Trend von  $p = 0,0625$  (n.s.) in „anämischen Mäusen“ ließ sich eine individuelle Steigerung des  $dP/dt_{min}$  formulieren. Dabei stellten sich Effekte in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0022$  (\*\*) als größer dar, da in „Kontrollen“ eine Zunahme um  $25,90 \pm 12,39$  % ( $n=6$ ) und in „anämischen Mäusen“ um  $8,44 \pm 5,42$  % ( $n=6$ ) zu beschreiben war.

### 3.3.2.2 Adenosin

Den Adenosin Applikationen konnten in Laborstudien vergleichbare vasodilatierende und kardiale Funktion steigernde Wirkungen in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ nachgewiesen werden (Abb. 21).



**Abb. 21: Adenosin zeigte vergleichbares Effektmaß in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$ ;  $n_K=7$   $n_A=8$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). In Auswertung der Effekte [%] konnte Adenosin eine vasodilatierende und kardiale Funktion steigernde Wirkung beschrieben werden. Beschriebene Effekte konnten in Darstellung von koronarem Fluss (CorF), entwickeltem Druck (DP), der maximalen Rate der Druckänderung in Kontraktion ( $dP/dt_{max}$ ) und der maximalen Rate der Druckänderung während Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ als gleichwertig beschrieben werden.**

Bezugnehmend auf den CorF konnte eine individuelle Steigerung in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) und in „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) definiert werden. Die durch Applikation induzierte Steigerung des CorF konnte dabei in den Versuchsgruppen als vergleichbar dargestellt werden. In Auswertung des

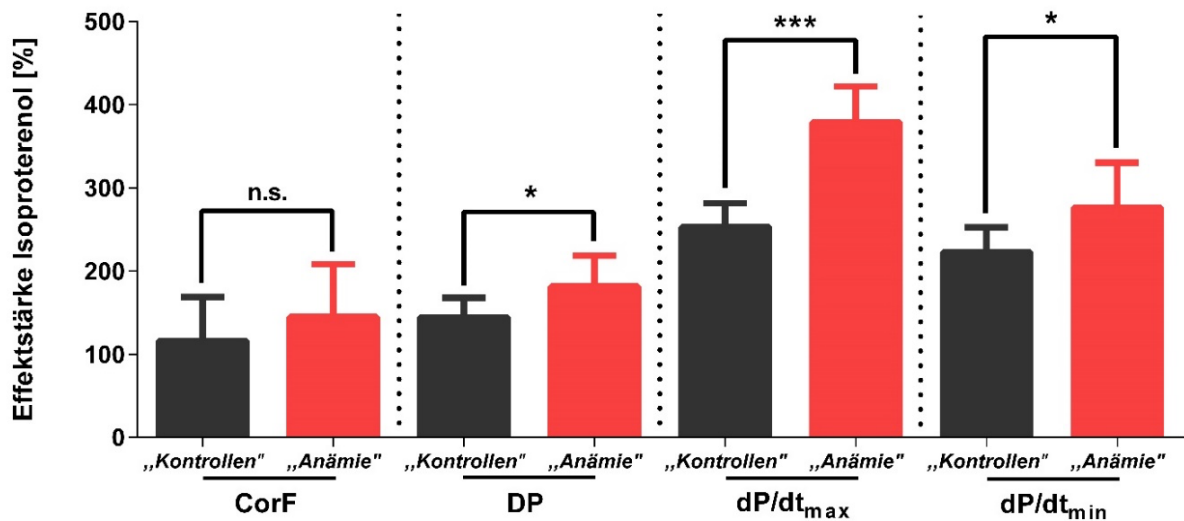
DP konnte sowohl in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) als auch in „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) eine individuelle Steigerung der Funktion ausgedrückt werden. Dabei konnte die Effektstärke als äquivalent beschrieben werden. Die durch die  $dP/dt_{\max}$  beschriebene Kontraktilität wurde durch Adenosin Applikation sowohl in „Kontrollen“, zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) als auch in „anämischen Mäusen“, zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) individuell gesteigert. Dabei konnte das Ausmaß des Anstieges in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ als vergleichbar charakterisiert werden. Ergänzend konnte auch eine signifikante individuelle Steigerung des  $dP/dt_{\min}$  dargestellt werden. Dies konnte in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) und in „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) beschrieben werden.

### 3.3.2.3 Isoproterenol

Isoproterenol konnte in Laborstudien vasodilatierende und kardiale Funktion steigende Effekte in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ nachgewiesen werden, mit einer signifikant gesteigerten Effektstärke in „anämischen Mäusen“ (Abb. 22).

In Bezug auf den CorF induzierte Isoproterenol in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) und in „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) eine signifikante individuelle Steigerung des Flusses über die Koronarien. Dabei konnten keine Unterschiede in Effektstärke auf „Kontrollen“ und „anämischen Mäuse“ definiert werden. Gleichgerichtet war eine signifikante individuelle Steigerung der kardialen Funktion, ausgedrückt durch DP zu beschreiben, welche sich jeweils zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) in „Kontrollen“ und zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) in „anämischen Mäusen“ darstellte. In Auswertung der Effektstärke konnte beschrieben werden, dass diese in „anämischen Mäusen“ mit  $181,51 \pm 36,98$  % ( $n=8$ ) zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0205$  (\*) größer ausfiel als in „Kontrollen“ mit  $144,37 \pm 23,43$  % ( $n=7$ ). Einhergehend mit gesteigertem DP konnten in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) und in „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) höhere absolute  $dP/dt_{\max}$  Messwerte beschrieben werden. Dabei konnte die Effektstärke in „anämischen Mäusen“, durch  $379,05 \pm 43,03$  % ( $n=8$ ) zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0003$  (\*\*\*) als größer als in „Kontrollen“, dargestellt durch  $253,10 \pm 28,28$  % ( $n=7$ ), beschrieben werden. Konkordant konnten in Auswertung des  $dP/dt_{\min}$  unter Isoproterenol Applikation in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0156$  (\*) sowie „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) signifikante individuelle Steigerungen beschrieben werden. Dabei konnte das

Ausmaß des Effektes in „anämischen Mäusen“ mit  $276,02 \pm 54,34$  % (n=8) gegenüber „Kontrollen“ mit  $222,79 \pm 29,66$  % (n=7) zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0140$  (\*) unterschieden werden.



**Abb. 22: Isoproterenol zeigte in „anämischen Mäusen“ ein höheres Effektmaß (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$  \*:  $p < 0,05$  \*\*\*:  $p < 0,001$ ;  $n_k=7$   $n_A=8$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). In Auswertung der Effekte [%] konnte Isoproterenol eine vasodilatierende und kardiale Funktion steigernde Wirkung beschrieben werden. Beschriebene Effekte konnten in Darstellung von entwickeltem Druck (DP), der maximalen Rate der Druckänderung in Kontraktion ( $dP/dt_{max}$ ) und der maximalen Rate der Druckänderung während Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ unterschieden werden, nicht jedoch in Beschreibung des koronaren Flusses (CorF).**

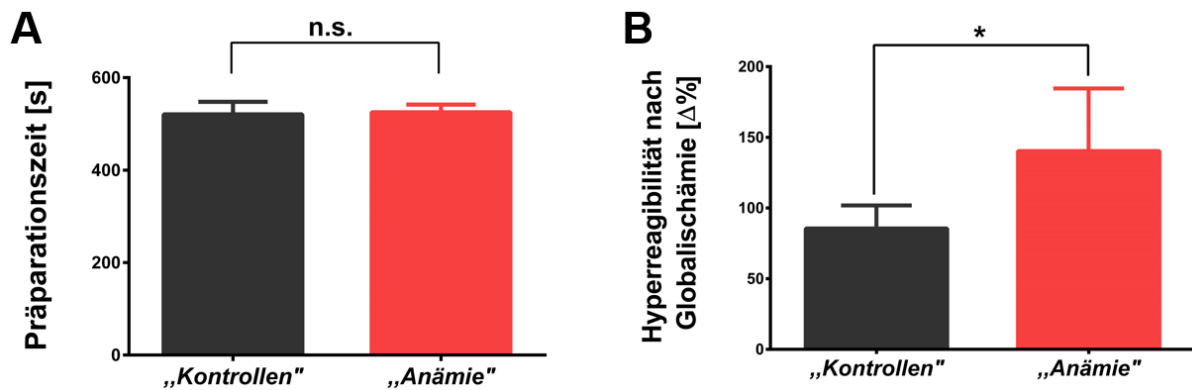
### 3.3.3 Langendorff Laborstudien – Ischämie/Reperfusion

Im Zuge der Charakterisierung von Anämie unterworfenen Versuchstierherzen konnten signifikant zu differenzierende Effekte im Rahmen eines lokalen Ischämie/Reperfusionseignisses gegenüber „Kontrollen“ definiert werden.

Zur Darstellung eines hinreichenden Erhaltungszustandes der Versuchstierherzen wurde eine Kalibrierungsphase durchgeführt. Bedingt durch höheren Präparationsaufwand wurden höhere Präparationszeiten und geringere Hyperreagibilität auf Globalischämie toleriert. Im Rahmen der Laborstudien konnte die Präparationsdauer minimiert und durch  $520,50 \pm 27,27$  s (n=6) in „Kontrollen“ und  $525,13 \pm 16,51$  s (n=8) in „anämischen Mäusen“ gleichgeschaltet werden (Abb. 23A).

Als Kriterium eines hinreichenden Erhaltungszustandes wurde eine Hyperreagibilität auf Globalischämie  $> 70 \Delta\%$  definiert. Dies konnte in „Kontrollen“ und in „anämischen Mäusen“ erfüllt werden, was allen Versuchstierherzen einen hinreichenden Erhaltungszustand bescheinigte. Darüber hinaus konnte in „anämischen Mäusen“, beschrieben durch  $140,25 \pm 44,35$  % (n=8)

eine zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0127$  (\*) höhere Hyperreagibilität gegenüber „Kontrollen“, beschrieben durch  $85,50 \pm 16,29$  % ( $n=6$ ) dargestellt werden (Abb. 23B).



**Abb. 23:** „Anämische Mäuse“ zeigten bei vergleichbarer Präparationszeit eine gesteigerte vaso-vagale Reagibilität (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$  \*:  $p < 0,05$ ;  $n_k=6$   $n_A=8$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). **A:** In „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ konnte eine vergleichbare Präparationszeit [s] erzielt werden. **B:** Eine hinreichende Hyperreagibilität [ $\Delta$ %] qualifiziert die Versuchstierherzen zur Auswertung. Darüber hinaus konnte in „anämischen Mäusen“ eine signifikant größere Hyperreagibilität aufgezeigt werden.

Die Induktion einer Lokalischämie durch Okklusion des RIVA konnte durch eine individuelle Reduktion des CorF in „Kontrollen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0313$  (\*) und in „anämischen Mäusen“ zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0078$  (\*\*) beschrieben werden. Als Einschlusskriterium des Versuchsherzens in die Laborstudie wurde eine Reduktion des CorF  $> 30\%$  gegenüber Baseline zum Messpunkt „45. Minute Ischämie“ definiert. Dies konnte in allen Versuchstieren erzielt werden. Darüber hinaus konnten in absoluter und relativer Darstellung des CorF zur Baseline keine signifikanten Unterschiede zwischen „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ während Ischämie aufgezeigt werden (Abb. 24).

Unter Lokalischämie konnte eine stärkere Limitierung von kardialen Funktionsparametern in „anämischen Mäusen“ gegenüber „Kontrollen“ dargestellt werden. In Auswertung des DP und der Kontraktilitätsparameter  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  konnte in absoluter Darstellung eine signifikant stärkere Beeinträchtigung „anämischer Mäuse“ über die gesamte Ischämiezeit beschrieben werden (Abb. 25A, 26A, 27A). Dies ließ sich in Form von statistischen Trends zu definierten Messpunkten auch in relativer Auswertung zur Baseline nach RIVA Okklusion gleichgerichtet abbilden (Abb. 25B, 26B, 27B). Insbesondere zur 10. Minute Ischämie konnte dabei eine signifikant stärkere Beeinträchtigung von „anämischen Mäusen“ gegenüber „Kontrollen“ in Funktionsparameter dargestellt werden. So konnte in Auswertung des DP,  $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$  zum Messpunkt 10. Minute Ischämie, signifikant stärkere Beeinträchtigungen der „anämischen Mäuse“ jeweils zu Signifikanzniveaus von  $p = 0,0200$  (\*) beschrieben werden (Abb. 25B, 26B, 27B).

Mit Wiedereröffnung der Okklusion wurde die eingeleitete Reperfusion durch einen Anstieg des CorF zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0023$  (\*\*) in „Kontrollen“ und  $p = 0,0002$  (\*\*\*) in „anämischen Mäusen“ bestätigt, indem in „Kontrollen“ eine Steigerung um  $90,97 \pm 37,13$  % ( $n=6$ ) und in „anämischen Mäusen“ eine Steigerung um  $166,21 \pm 78,88$  % ( $n=8$ ) beschrieben werden konnte. In Darstellung absoluter Messwerte konnten über die Reperfusionphase hinaus keine signifikanten Unterschiede zwischen „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ beschrieben werden (Abb. 24A). In Gegenüberstellung relativer Entwicklungen zur Baseline konnte in Auswertung des CorF dargestellt werden, dass „anämische Mäuse“ mit einer höheren Reagibilität auf den definierten ischämischen Zustand reagierten als „Kontrollen“. Die Unterschiede konnten zu den Messpunkten 5. - 50. Minute Reperfusion als signifikant formuliert werden (Abb. 24B).

Die myokardialen Funktionparameter in Reperfusion zeigten in Darstellung absoluter Messparameter keine signifikanten Unterschiede zwischen „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ (Abb. 25A, 26A, 27A). Im Vergleich relativer Effekte gegenüber Baseline zeigte der DP nach Adaptionphase signifikant höhere Messergebnisse in „anämischen Mäusen“ gegenüber „Kontrollen“ (Abb. 25B). So war zu den Reperfusionzeiten 20., 30., 50. und 60. Minute signifikante Unterschiede zu beschreiben. Gleichgerichtet ließen sich auch Entwicklungen der Kontraktilitätsparameter  $dP/dt_{\max}$  und  $dP/dt_{\min}$  umschreiben, welche nach einer Adaptionphase durch signifikant höhere Messergebnisse in „anämischen Mäusen“ umschrieben werden konnten (Abb. 26B, 27B). In Darstellung des  $dP/dt_{\max}$  konnten zu den Messpunkten 20., 30., 50. und 60. Minute Reperfusion eine signifikante Unterscheidung erfolgen, während in Auswertung des  $dP/dt_{\min}$  eine signifikante Differenzierung zu den Messpunkten 30., 50. und 60. Minute erfolgen konnte.

Diese Ergebnisse beschreiben, dass „anämische Mäuse“ während Lokalokklusion durch Verschluss des RIVA eine signifikant stärkere Beeinträchtigung erfuhren und in anschließender Reperfusion gesteigerte kardiale Funktionen zeigten.



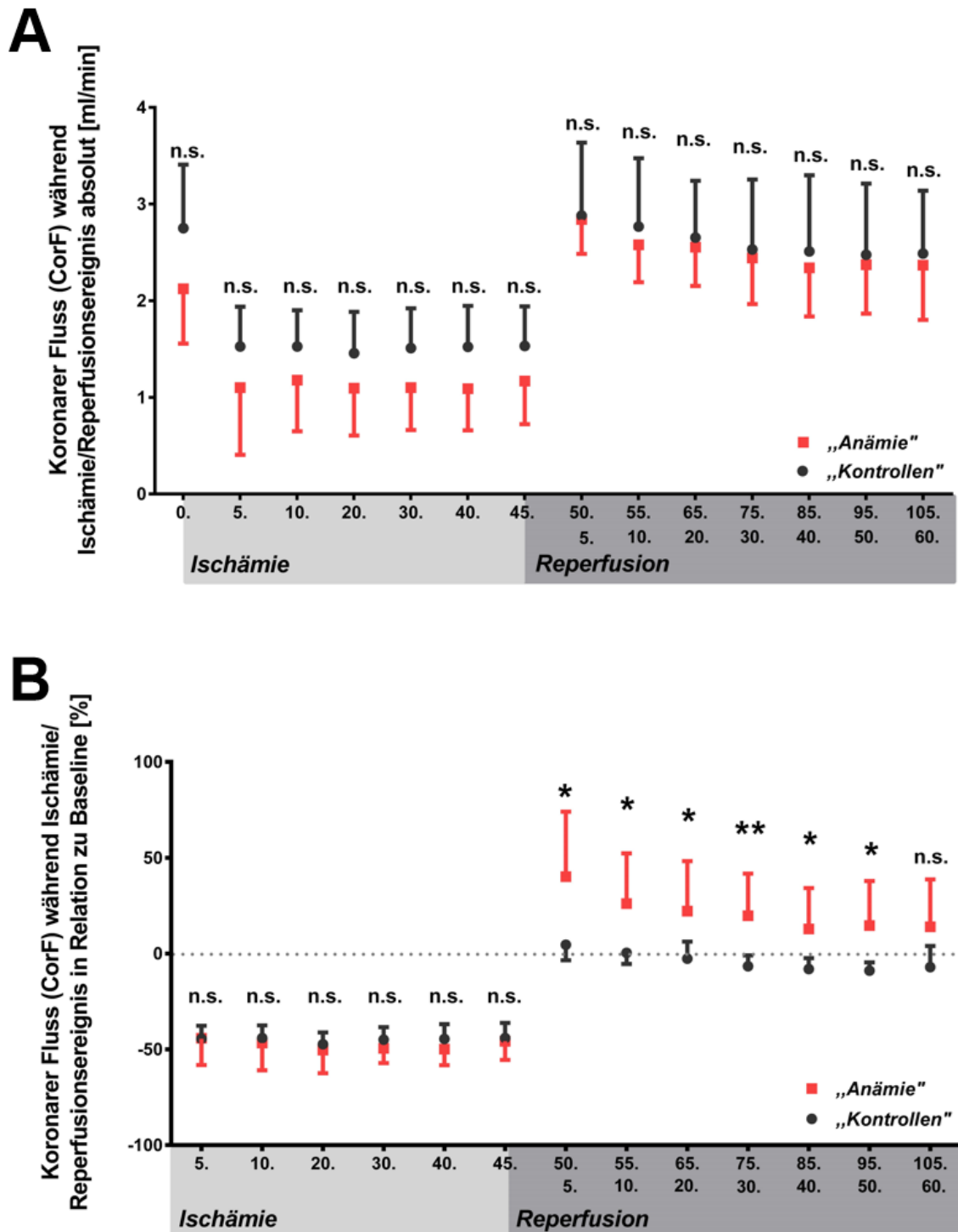


Abb. 24: In Ischämie zeigte sich eine gleichwertige Reduktion des koronaren Flusses (CorF) und in „anämischen Mäusen“ eine gesteigerte Reperfusion nach Wiedereröffnung der Okklusion (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$  \*:  $p < 0,05$  \*\*:  $p < 0,01$ ;  $n_k=6$   $n_A=8$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). Während der Ischämiephase konnte zwischen „anämischen Mäusen“ und „Kontrollen“ eine gleichwertige Reduktion [%] des CorF dargestellt werden. In Darstellung relativer Entwicklungen zur Baseline [%] konnte in „anämischen Mäusen“ eine signifikant gesteigerte Reperfusion nach Wiedereröffnung des RIVA aufgezeigt werden.

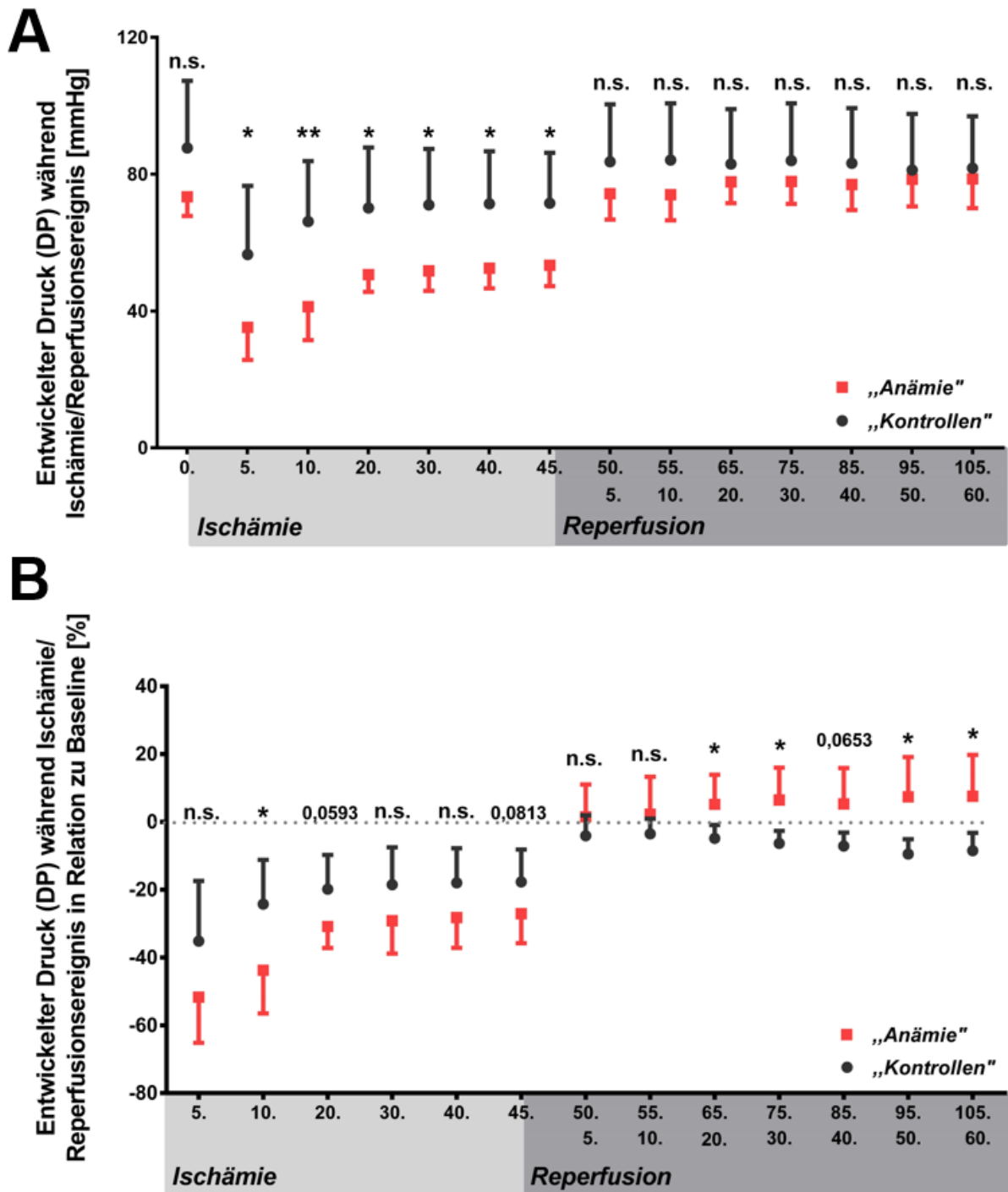


Abb. 25: In Ischämie zeigten „anämische Mäuse“ eine stärkere Limitierung des entwickelten Druckes (DP) und in Reperfusion eine gesteigerte Erholung (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$ ; \*:  $p < 0,05$ ;  $n_K=6$   $n_A=8$ ; Darstellung in MW  $\pm$  SD). Während der Ischämiephase konnte in „anämischen Mäusen“ eine signifikant stärkere Limitierung [%] des Funktionsparameter des DP aufgezeigt werden. Nach Wiedereröffnung des RIVA entwickelten „anämische Kontrollen“ signifikant höhere Funktionswerte.

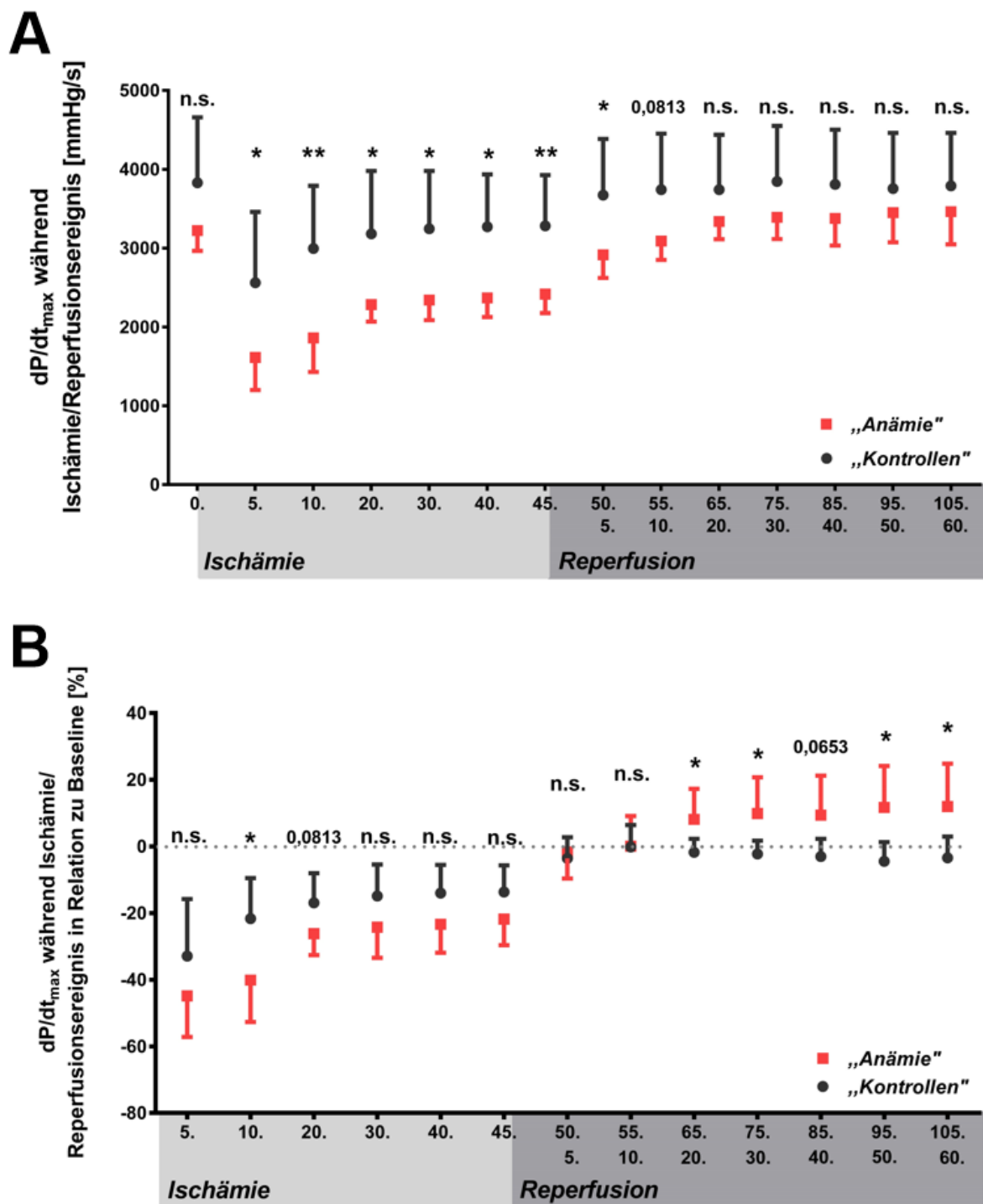


Abb. 26: In Ischämie zeigten „anämische Mäuse“ eine stärkere Limitierung maximaler Rate der Druckänderung in Kontraktion ( $dP/dt_{max}$ ) und in Reperfusion eine gesteigerte Erholung (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$ ; \*:  $p < 0,05$ ;  $n_k = 6$   $n_A = 8$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). Während der Ischämiephase konnte in „anämischen Mäusen“ eine signifikant stärkere Limitierung [%] des Funktionsparameter des  $dP/dt_{max}$  aufgezeigt werden. Nach Wiedereröffnung des RIVA entwickelten „anämische Kontrollen“ signifikant höhere Funktionswerte.

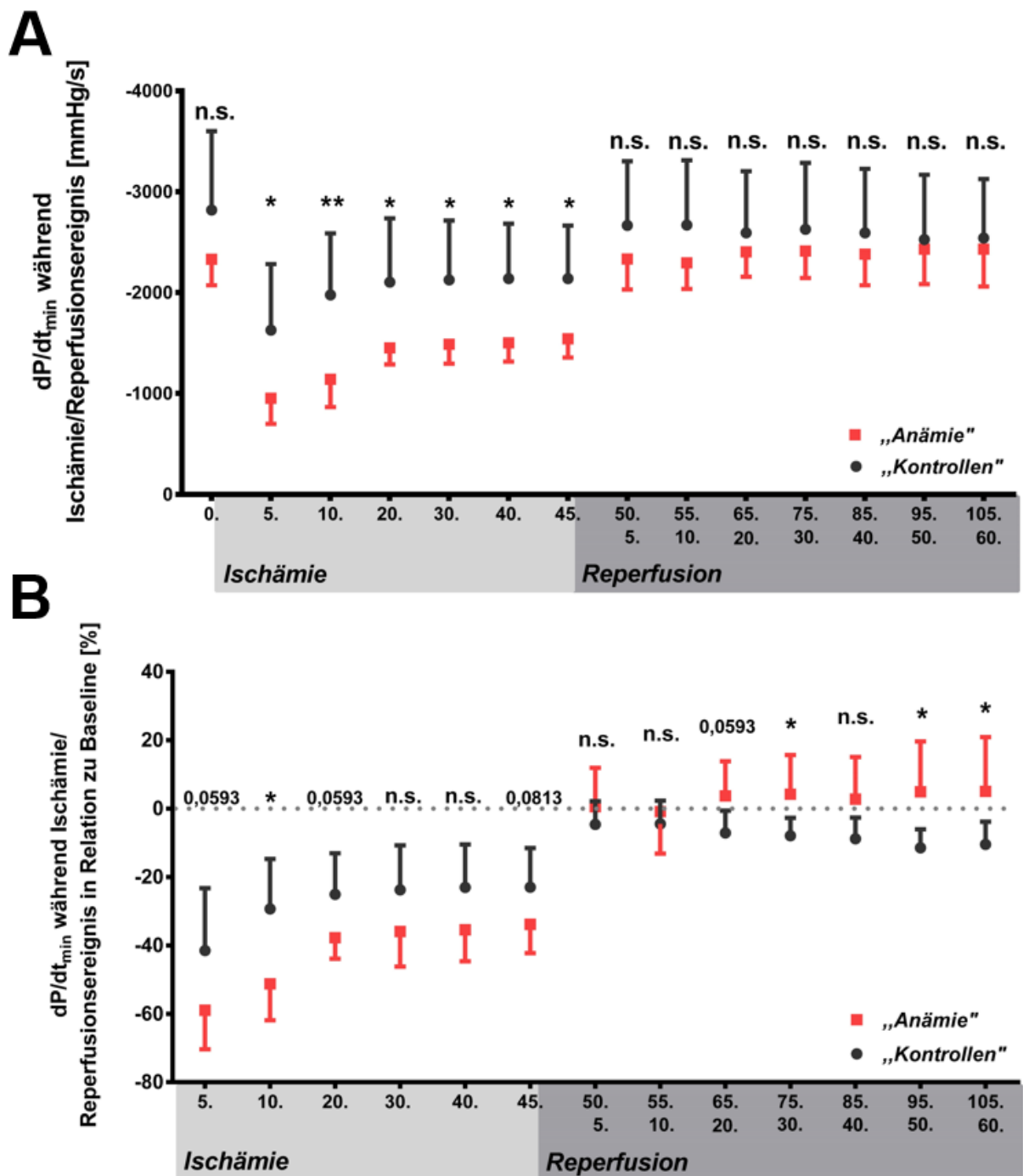
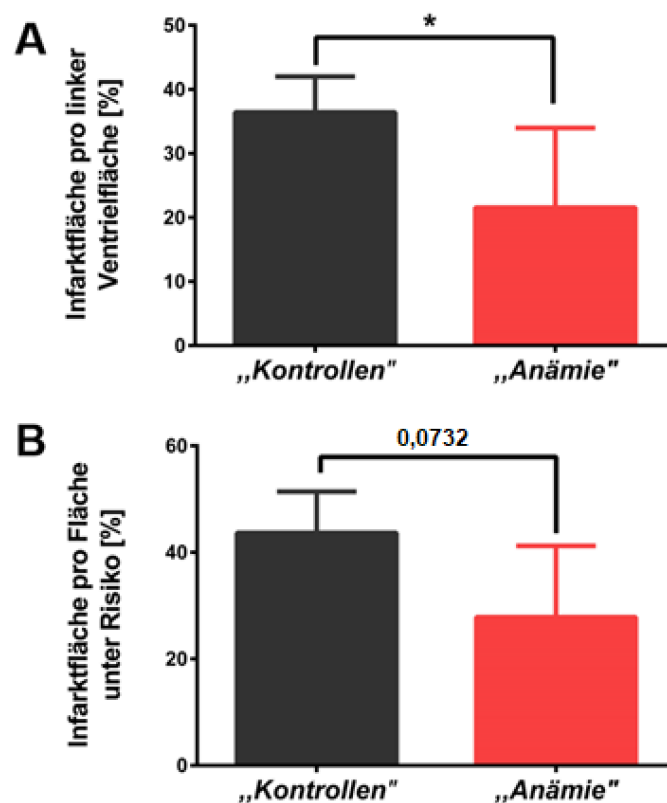


Abb. 27: In Ischämie zeigten „anämische Mäuse“ eine stärkere Limitierung der maximalen Rate der Druckänderung in Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) und in Reperfusion eine gesteigerte Erholung (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$  \*:  $p < 0,05$  \*\*:  $p < 0,01$ ;  $n_k = 6$   $n_A = 8$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). Während der Ischämiephase konnte in „anämischen Mäusen“ eine signifikant stärkere Limitierung [%] des Funktionsparameter des  $dP/dt_{min}$  aufgezeigt werden. Nach Wiedereröffnung des RIVA entwickelten „anämische Kontrollen“ signifikant höhere Funktionswerte.

### 3.4 Infarktgrößenbestimmung

In Bestimmung und Auswertung der resultierenden Infarktgrößen wurden Myokardflächen durch Evans Blau und TTC eingefärbt. Die Vergleichbarkeit von Infarktgrößen konnte bestätigt werden, indem das Ratio aus Fläche unter Risiko (*Area at Risk*) und Fläche des linken Ventrikels in „Kontrollen“, beschrieben durch  $82,45 \pm 15,96 \%$  ( $n=5$ ) und in „anämischen Mäusen“, beschrieben durch  $75,18 \pm 11,81 \%$  ( $n=7$ ), als vergleichbar definiert werden konnte.

In Auswertung der Infarktgrößen konnte gezeigt werden, dass „anämische Mäuse“ signifikant geringere Infarktbereiche auf das etablierte Ischämie/Reperfusionseignis ausbildeten (Abb. 28). In Darstellung der Infarktfläche pro Fläche des linken Ventrikels konnte differenziert werden, dass „Kontrollen“, beschrieben durch  $36,92 \pm 6,09 \%$  ( $n=5$ ) zu „anämischen Mäusen“, beschrieben durch  $21,96 \pm 13,28 \%$  ( $n=7$ ) bei einem Signifikanzniveau von  $p = 0,048$  (\*) gesteigerte Infarktflächen aufwiesen. In Gegenüberstellung der Infarktfläche pro Fläche unter Risiko wären „anämische Mäuse“, beschrieben durch  $28,11 \pm 13,86 \%$  ( $n=7$ ) und „Kontrollen“ durch  $45,51 \pm 7,03 \%$  ( $n=5$ ), zu einem statistischen Trend von  $p = 0,0732$  (n.s.) von „Kontrollen“ zu unterscheiden.



**Abb. 28:** In Auswertung von Infarktgrößen zeigten „anämische Mäuse“ kleinere Infarkte (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.:  $p > 0,05$ ; \*:  $p < 0,05$ ;  $n_K=5$   $n_A=7$ ; Darstellung in  $MW \pm SD$ ). **A:** „Anämische Mäusen“ zeigten gegenüber „Kontrollen“ kleinere Infarktareal pro Ventrielfläche. **B:** „Anämische Mäusen“ zeigten gegenüber „Kontrollen“ kleinere Infarktareal pro Fläche unter Risiko.

### 3.5 Oxidativer Stress - *Glutathion Assay*

Zur Evaluierung des Redoxstatus wurden die Entitäten „Herz“, „Erythrozyten“ und „Plasma“ von „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ in Hinblick auf ihre Glutathionniveaus analysiert. Dazu wurden basale Proben und Proben, welche 24 Stunden post *in vivo* Ischämie/Reperfusionereignis erhoben wurden, verglichen (Tabelle 19).

Basal könnte in Auswertung des „Herz“ von „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ eine höhere Glutathion-Reserve in „anämischen Mäusen“ dargestellt werden. Dies zeigte sich in einer zu einem statistischen Trend von  $p = 0,0823$  (n.s.) günstigerem Ratio aus freiem und totalem GSH in „anämischen Mäusen“ in Darstellung basaler Messparameter. So konnten in „anämischen Mäusen“ die Anteile des freien GSH am totalem GSH beschrieben durch  $43,82 \pm 6,63 \%$  (n=6) gegenüber „Kontrollen“ beschrieben  $35,57 \pm 3,05 \%$  (n=5) dargestellt werden. In Gegenüberstellung des freien GSH war keine signifikanten Unterschiede zu formulieren.

In „Erythrozyten“ ließen sich in „anämischen Mäusen“ durch Darstellung des freien und totalen GSH höhere Glutathionniveaus beschreiben. Dabei könnte in „anämischen Mäusen“ das freie GSH in zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0823$  (n.s.) und das totale GSH zu einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0519$  (n.s.) als gesteigert beschrieben werden. Besonders in Darstellung des totalen GSH, beschrieben in „anämischen Mäusen“ durch  $95,47 \pm 17,54$  mmol/mg (n=6) gegenüber der Darstellung in „Kontrollen“, beschrieben durch  $72,84 \pm 9,45$  mmol/mg (n=5), wurden gesteigerte Verfügbarkeiten deutlich.

Entgegen anderer Entitäten ließ sich in „Plasma“ das Glutathionniveau in „anämischen Mäusen“ als signifikant reduziert beschreiben. Besonders in Darstellung des freien GSH konnte in „anämischen Mäusen“ signifikant supprimierte Glutathionniveaus aufgefasst werden, welche intensivierete Diskussion erfordern. Dem freien GSH folgend war auch das einhergehende Ratio aus freiem GSH und totalem GSH signifikant reduziert.

Ergänzend wurden Messproben ausgewertet, welche 24 Stunden post *in-vivo* Ischämie/Reperfusionereignis gewonnen wurden. Erhobene Messwerte wurden auch in Vergleich zu basal erhobenen Messwerten gesetzt. Dabei waren nur in den Proben „Plasma“ signifikante Adaptionen zu benennen.

|                                    | Basal              |                                   | 24h post in vivo Ischämie/Reperfusionseignis |                |
|------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|--|----------------|
|                                    | „Kontrollen“ (n=5) | „Anämie“ (n=6)                    | „Kontrollen“ (n=5)                           | „Anämie“ (n=4) |
| <b>„Herz“</b>                      |                    |                                   |  |                |
| Freies GSH (normiert auf Protein)  | 191,02 ± 70,18     | 231,48 ± 55,33                    | 222,58 ± 64,41                               | 247,51 ± 70,30 |
| Totales GSH (normiert auf Protein) | 533,87 ± 192,74    | 524,70 ± 99,36                    | 672,56 ± 173,83                              | 624,67 ± 79,36 |
| Freies GSH/Totales GSH [%]         | 35,57 ± 3,05       | 43,82 ± 6,63 <sup>p=0,0623</sup>  | 33,61 ± 4,55                                 | 39,11 ± 7,13   |
| <b>„Erythrozyten“</b>              |                    |                                   |  |                |
| Freies GSH (normiert auf Protein)  | 52,03 ± 9,08       | 67,01 ± 11,73 <sup>p=0,823</sup>  | 55,91 ± 9,32                                 | 61,06 ± 9,40   |
| Totales GSH (normiert auf Protein) | 72,84 ± 9,45       | 95,47 ± 17,54 <sup>p=0,0519</sup> | 75,81 ± 14,95                                | 86,71 ± 13,49  |
| Freies GSH/Totales GSH [%]         | 71,16 ± 4,00       | 70,35 ± 4,21                      | 74,06 ± 2,90                                 | 70,49 ± 0,92   |
| <b>„Plasma“</b>                    |                    |                                   |  |                |
| Freies GSH (normiert auf Protein)  | 46,24 ± 8,98       | 0,42 ± 4,88 **                    | 25,77 ± 9,64†                                | 19,78 ± 13,63† |
| Totales GSH (normiert auf Protein) | 202,45 ± 26,94     | 164,24 ± 48,11                    | 181,39 ± 57,50                               | 112,20 ± 41,66 |
| Freies GSH/Totales GSH [%]         | 23,30 ± 6,51       | 0,00 ± 3,18**                     | 14,60 ± 4,40                                 | 16,28 ± 10,16  |

**Tabelle 19: „Anämische Mäuse“ zeigten eine höhere antioxidative Reserve (ungepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n.s.: p>0,05 \*\*: p<0,01 (Vergleich in basaler Darstellung) †: p<0,05 (Vergleich zur jeweiligen Versuchskohorte basal); Darstellung in MW ± SD. In Quantifizierung der Glutathionmengen (GSH) in den Entitäten „Herz“, „Erythrozyten“ und „Plasma“ waren spezifische Verdünnungsfaktoren zu achten. Bedingt durch die verwendeten Assays können Messergebnisse nur als dimensionslose Zahlen ausgegeben werden. Dies erlaubt nur Vergleiche innerhalb einer Entität und keine Darstellungen absoluter Messwerte. Im Vergleich von „anämischen Mäusen“ und „Kontrollen“ könnte eine höhere antioxidative Aktivität bzw. Reserve basal in den Proben „Herz“ dargestellt werden. Gleichgerichtet könnte in „anämischen Mäusen“ in „Erythrozyten“ eine höheres Glutathionniveau beschrieben werden. Im Vergleich zu anderen Entitäten zeigen „Plasma“ Proben in „anämischen Mäusen“ geringe Glutathionmengen.**

## 4. Diskussion

Anämien, als Pathologien mit hoher gesamtgesellschaftlicher Relevanz, sind unzureichend in Effekten und Interaktionen mit pathophysiologischen Mechanismen des akuten Myokardinfarktes verstanden. Klinisch beschriebene Assoziationen von Anämien mit möglichem adversen *Outcome* im Rahmen eines akuten ischämischen Ereignisses konnten ungenügend kausal dargelegt werden, bedingt durch Limitationen in Form von *Confoundern*. Zielsetzung der durchgeführten tierexperimentellen Studie ist die Überführung und Überprüfung klinischer Beobachtungen in einem tierexperimentellen Anämie-Modell, um das pathophysiologische Verständnis der Anämie zu steigern und mögliche Mediatoren der Interaktion mit akuten Ischämie/Reperfusionseignissen zu beschreiben. Die Anämie, induziert durch forcierten Blutverlust im Tiermodell, erlaubt Adaptionen der isoliert bestehenden akuten Anämie zu beschreiben.

Das etablierte akute Anämie-Modell im Versuchstier der Maus konnte in *in vivo* und *ex vivo* Studien kardiale und hämodynamische Adaptionen umschreiben, welche Anämie mit hyperdynamischer Zirkulation und gesteigerten kardialen Funktionen assoziierten. Weiterführend konnte aufgezeigt werden, dass basal beschriebenen Adaptionen Einflussnahme auf Pathophysiologien während eines Ischämie/Reperfusionseignisses zuzuschreiben waren. „*Anämische Mäuse*“ waren während Ischämie durch signifikant stärkere Limitationen kardialer Funktionsparameter gekennzeichnet. Mit Reperfusion zuvor ischämischer Gebiete konnte eine signifikant höhere Erholung kardialer Funktionen beschrieben werden, welche sich abschließend in signifikant besseren Erhaltungszuständen „*anämischer Mäuse*“ darstellte. Bestärkt werden konnten Beobachtungen durch angefügte Infarktgrößenbestimmungen, welche „*anämischen Mäusen*“ signifikant kleinere Infarktareale zusprachen. Als möglicher Mediator wurde der antioxidative Status repräsentativ durch Glutathion dargestellt. Dabei konnte in „*anämischen Mäusen*“ eine mögliche höhere antioxidative Reserve beschrieben werden. Dieser könnte das Potential zugeschrieben werden Ischämie- und Reperfusionsschäden in Anämie zu minimieren.

### 4.1 Tierexperimentelles Anämie-Modell

Voraussetzung für jegliche Auswertung und Interpretation von erhobenen Messdaten ist eine Vergleichbarkeit von Versuchstieren, etabliert durch Standardisierung von Handhabung, um Störfaktoren zu minimieren oder gleichzuschalten. In der Haltung der Versuchstiere wurden Beeinflussungen durch externe und haltungsbedingte Faktoren durch umfassende Standardisierungen angeglichen. Um Stressmomenten vorzubeugen, wurde den Versuchstieren eine Akklimatisierung eingeräumt, auf eine besonnene Handhabung geachtet, Manipulationen auf ein Minimum reduziert und Interaktionszeiten begrenzt. Die umfassend etablierten



Standardisierungen und Gleichschaltungen von Stressmomenten erlaubten nicht nur die Belastung der Versuchstiere zu minimieren, sondern auch einen zu vernachlässigen Einfluss von *Confoundern* auf die erhobenen Messparameter anzunehmen.

Unter der Prämisse der Vergleichbarkeit von Versuchstieren konnte die Induktion einer akuten Anämie im Versuchstier der Maus etabliert werden, unter der Zielsetzung anämische Versuchstiere für Laborstudien zu generieren. Bei der Etablierung wurden Spezifitäten der Versuchstiere, regulatorische Rahmenbedingungen und gewünschten Effekten entsprochen. Das definierte Zielkriterium, eine Hb-Konzentration von  $< 9$  g/dl in venösen Vollblutproben, konnte dabei in Vorversuchen als ein vertretbarer Kompromiss aus Maximierung anämischer Effekte und Respektierung des Tierwohls definiert werden. In Handhabungen und Punktionen wurden Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde entsprochen, um Beeinträchtigungen und Belastung seitens der Versuchstiere zu minimieren. Um *Confounder* vorzubeugen, wurden Protokolle abgestimmt und möglichst entsprechend etabliert. Zum Erhalt der Hämodynamik wurde eine Volumensubstitution durch kristalloide Lösungen etabliert. Unter der Annahme, dass die osmotische Resistenz im Sinne der Integrität der Erythrozytenmembran nicht beeinträchtigt war, konnte eine ausgeglichene Substitution erzielt werden. Weiterhin entspricht dies der klinischen Praxis, wonach primärer Volumenersatz unter stark eingeschränkten Indikationen für kolloidale Infusionslösungen durch kristalloide Lösungen erfolgt.

Die Zielsetzung des Anämie-Modells umfasste die Etablierung einer akuten, normochromen normozytären Anämie, induziert durch repetitiven Blutverlust. In Auswertung der erhobenen Messparameter konnte aufgezeigt werden, dass den geforderten Charakteristika anämischer Zustand, Ätiologie und Etablierungszeitraum entsprochen und dessen Umsetzung bestätigt werden konnte.

In Auswertung der Blutbilder von venösen Vollblutproben konnten reduzierende Effekte auf die Hb-Konzentration durch repetitive Punktionen ausgeführt werden, indem von Tag zu Tag eine Reduktion des Hb-Werts aufgezeigt werden konnte. Mit dem vierten Tag konnte das definierte Hb-Kriterium in allen Versuchsmäusen zuverlässig erzielt werden. Die Gegenüberstellung mit „*Kontrollen*“ identifizierte die repetitiven Punktionen und einhergehenden Blutverluste als bedingende Kausalität. Im Rahmen aller durchgeführten Laborstudien ließ sich die Gesamtheit aller induzierten Anämien am vierten Tag durch eine Hb-Konzentration von  $7,76 \pm 0,90$  g/dl ( $n=14$ ) in „*anämischen Mäusen*“ darstellen. Diese Ergebnisse bestätigen die Zuverlässigkeit, Gültigkeit und Unabhängigkeit des zu etablierenden Anämie-Modells.

In Darstellung der Ergebnisse assoziiert mit repetitiven Punktionen konnte aufgezeigt werden, dass das Protokoll eine normochrome normozytäre Anämie induzierte. In Klassifikation der Anämien nach Erythrozytenindizes erlaubt diese Charakterisierung morphologisch regulärer

Erythrozyten eine ätiologische Spezifizierung auf aplastische Anämien, renale Anämien, hämolytische Anämien und Blutungsanämien. Unter der Prämisse sonst gesunder Versuchstiere und durch erfolgte Darstellung einer Beständigkeit der Hb-Konzentrationen in Versuchstieren in Abhängigkeit von Punktionen erlauben diese Ergebnisse eine Blutungsanämie als ätiologische Kausalität anzunehmen.

Eine exakte und anschauliche Abgrenzung akuter und chronischer Anämien lässt sich nach der Literatur nicht darstellen. Häufig wird die akute Anämie wie mit Etablierungszeiträumen wie spontan oder innerhalb weniger Tage assoziiert [9]. Nach einer Definition entwickle sich eine akute Blutungsanämie nach einem plötzlichen Blutverlust, beschrieben durch 20% der Gesamtblutmenge ohne hinreichende Kompensation [10]. Übertragen auf das etablierte Anämie-Modell könnte unter Außerachtlassung von Neubildungsprozessen und Substitutionen der Blutverlust auf ca. 38 % innerhalb von drei Tagen beziffert werden. Bei Zugrundelegung des Etablierungszeitraum und der Physiologie der Erythropoese, in welcher die Synthese und Ausreifung von Erythrozyten rund eine Woche in Anspruch nimmt, lassen sich die Definitionskriterien der chronischen Anämie, welche diese als unzureichend adaptierte Erythropoese darstellen, nicht verifizieren und somit für das Anämie-Modell zurückweisen. Weiterführend kann die Pathogenese der etablierten akuten Anämie im Mausmodell in Form einer akuten Hämorrhagie als Definitionsgrundlage für die Bezeichnung einer akuten Anämie interpretiert werden [9]. Diese Charakteristika legitimieren die Bezeichnung der durch das etablierte Modell induzierten Anämie als akut.

Als Begleiteffekt der durchgeführten Anämieinduktion muss eine Aktivierung des Immunsystems benannt werden, welche sich in einer Steigerung der absoluten Leukozytenzahl und einer veränderten prozentualen Darstellung von Lymphozyten und Granulozyten formulieren lässt. Als weitere Limitierungen muss mit einbezogen werden, dass in Auswertung möglicher Effekte durch Punktionen und Blutverlust ausschließlich hämatologisch Auswirkungen bemessen wurden. Weiterführende Wirkungen des tierexperimentellen Protokolls konnten nicht erfasst werden.

#### **4.2 Basale Charakterisierung kardialer Funktionen „anämischer Versuchstiere“**

Das etablierte Anämie-Protokoll definierte die Versuchstiergruppen „Kontrollen“ und „anämische Mäuse“, welche im Rahmen basaler Charakterisierung im Hinblick auf hämodynamische und myokardiale Funktionen untersucht wurden. Eine statistische Analyse erhobener Messwerte erlaubte Adaptionen auf Induktion einer akuten Anämie durch *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen zu beschreiben, welche basal „anämische Mäuse“ mit hyperdynamischer Kreislauffunktion und gesteigerter Kontraktilität assoziierte.

Zur *in vivo* Evaluation morphologischer sowie funktioneller Charakteristika der Versuchstiere wurde die nichtinvasive transthorakale Echokardiographie angewandt. Um eine Vergleichbarkeit der Untersuchungsgruppen zu erlauben, wurde dem Einsatz des Anästhetikums Isoflurans, dem Erhalt der Körpertemperatur und einer hinreichend physiologischen Herzfrequenz entsprechend dem Protokoll Sorgfalt getragen. Zur Sicherung einer hinreichenden Qualität der Sonographiebefunde im Hinblick auf Objektivität und Reliabilität wurde eine persönliche Befähigung im Vorfeld durch angeleitete Untersuchungen erworben. Auswertungen fanden unter konformer Interpretation der erhobenen Messbilder statt.

In Ergänzung wurden durch das *ex vivo* Modell des isoliert perfundierten Herzens nach Langendorff standardisierte Messwerte erhoben. Voraussetzung einer Vergleichbarkeit von Versuchstieren war die Durchführung der Untersuchungen unter identischen Konditionen, welche in einem etablierten Protokoll definiert und umfassend berücksichtigt wurden. Dabei verfügte die substituierte Krebs-Henseleit Lösung über hinreichende Funktionen, konnte aber nicht physiologische Sauerstoff- und Energiemetabolismen aufrechterhalten [126]. Weiterführend ist anzumerken, dass die zu beschreibende Unabhängigkeit der Versuchstierherzen von systemischen und neurohumeralen Faktoren Vergleiche mit *in vivo* erhobenen Ergebnissen begrenzt und Übertragbarkeit auf klinische Studienergebnisse limitiert. Darüber hinaus bedingen Spezifitäten der etablierten Protokolle der *ex vivo* Experimente eine modifizierte Darstellung von realen Messparametern, welche nicht *in vivo* Verhältnissen entsprechen.

Die in den tierexperimentellen Studien erhobenen Messergebnisse weisen auf eine signifikant gesteigerte Hämodynamik in „*anämischen Mäusen*“ im Sinne einer hyperdynamischen Zirkulation zur Kupierung pathophysiologischer Adaptionen im Zuge der Induktion einer akuten Anämie hin.

In intraindividuellen Vergleichen konnte in „*anämischen Mäusen*“ in *in vivo* Versuchen eine signifikante Steigerung des HZV, vorrangig vermittelt durch eine signifikante Steigerung der HF, formuliert werden. Konträr zu Studien, welche in chronischen Anämien eine Steigerung der Chronotropie als wirkungsvollen Faktor entkräftigen konnten [22], unterstreichen die *in vivo* Ergebnisse die Relevanz der gesteigerten Chronotropie in der akuten Adaptionphase auf eine akute Anämie. Bekräftigt wird die induzierte Leistungssteigerung durch *in vivo* beschriebene signifikante Verkürzungen der isovolumetrischen Kontraktions- bzw. Relaxationszeiten in „*anämischen Mäusen*“, welche als Folge einer reduzierten Systolen- und Diastolendauer im Zuge einer erhöhten HF interpretiert werden können. Dies kann als physiologische Reaktion auf eine signifikante Reduktion der Hb-Konzentration aufgefasst werden, sofern die Bereitstellung von Sauerstoff an das Gewebe als Produkt des HZV und des arteriellen Sauerstoffgehaltes definiert wird [127]. Experimentelle Studien konnten vergleichbare kardiovaskuläre Reaktionen auf die Initiierung einer akuten normovolämischen Anämie in größeren Säugetieren

beschreiben [27, 128, 129] und eine inverse Korrelation zwischen HZV und Hb-Konzentration skizzieren [130, 131]. Ein umschriebener Beitrag des Schlagvolumens zur Steigerung des HZV konnte im etablierten Anämie-Modell nicht dargestellt werden. Dies unterliegt möglicherweise einer Maskierung durch eine sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch um eine vielfach erhöhte HF der Versuchsmäuse im Sinne einer Limitierung des Studiendesigns. Des Weiteren konnte in Studien zur Auswirkung einer Isofluran Applikation auf C57BL/6 Mäusen kardiodepressive Effekte beschrieben werden, dessen Wirkungsweisen unzureichend definiert sind [132].

Eine Steigerung der kardialen *Performance* konnte über eine forcierte HF hinaus, auch in signifikanten Steigerungen von Kontraktilitätsparametern dargestellt werden. *In vivo* assoziierte eine signifikante Steigerung des *Fractional Shortening* und *ex vivo* eine signifikante Steigerung des  $dP/dt_{max}$  sowie eine Erhöhung des  $dP/dt_{min}$  „anämischen Mäuse“ mit einer Motilitätssteigerung. Die Kontraktilitätssteigerung könnte synergistisch mit erhöhten HF ein signifikant höheres HZV begünstigen, auch wenn basal deren Relevanz durch die Darstellung vergleichbarer Schlagvolumina *in vivo* als auch durch vergleichbaren entwickelten Druck *ex vivo* limitiert wird. Dies erlaubt anzunehmen, dass im Rahmen der Adaption auf anämische Zustände „anämische Mäuse“ Leistungssteigerungsvermögen vorhalten, um auf notwendige Forderungen unter Belastung adäquat reagieren zu können.

Als eine vermittelnde Kausalität von Leistungssteigerungen könnte dabei eine erhöhte Adrenozeptoren Funktion formuliert werden. Dies lässt sich in *in vivo* Ergebnissen mit Effekten einer vermehrten Sympathikusstimulation in Anämie in Einklang bringen [27, 28, 131], welche vermittelt durch aortale Chemorezeptoren [28, 131] und vermehrte Freisetzung von Katecholaminen [131, 133] Leistungen „anämischer Mäuse“ forcieren könnte. Sympathikus assoziierte, myokardial vermittelte positive Inotropie, Chronotropie, Dromotropie und Lusitropie würden über beta-adrenerge Rezeptoren *in vivo* erhobene Ergebnisse bekräftigen [29, 128]. Unterstützt wird dies durch in klinischen Studien formulierte Annahme, dass durch Applikation von Betablockern die durch akute Anämie induzierte Wirkungen signifikant korrigiert werden könnte [128]. Aus den erhobenen Ergebnissen suggeriert ein gesteigertes Ansprechen von „anämischen Mäusen“ auf standardisierte Applikation von Isoproterenol eine forcierte Abhängigkeit von Katecholaminen. Dies stellt gleichgerichtet anämische Leistungssteigerungen in Abhängigkeit von Adrenozeptoren.

In Darstellung der isolierten Versuchstierherzen *ex vivo* konnten dabei über die Explantation hinaus gleichgerichtete Effekte einer Steigerung des Leistungsvermögens bereits basal beschrieben werden, welche Hinweise auf strukturelle myokardiale Adaptionen im Rahmen einer akuten Anämie erlauben. Die maximalen Druck-Änderungsraten in Kontraktion waren in „anämischen Mäusen“ signifikant und die maximalen Druck-Änderungsraten in Relaxation zu

einem statistischen Trend als gesteigert zu beschreiben. Gestärkt werden können die Beobachtung höherer Leistung durch eine zu einem signifikanten Trend von  $p = 0,09$  (n.s.) höherer Koronarfluss in „*anämischen Mäusen*“, welcher mit erhöhtem Metabolismus im Zuge forcierterer Arbeit zu assoziieren wäre. Dies impliziert konkordant mit *in vivo* Ergebnissen höhere Substratforderungen einer akuter Anämie bereits in Ruhe.

Mögliche Adaptionen könnten dabei weiterführenden Funktionen der Endothelzellen zugeschrieben werden, welche mit gesteigerter Vasoreagibilität in „*anämischen Mäusen*“ an Relevanz gewinnen. Über Regulation des vaskulären Tonus können vom Endothel freigesetzte Substanzen mit der Modifikation kardialer Funktion assoziiert werden. Diese modulieren Kontraktilität positiv und negativ in Abhängigkeit von notwendiger *Performance*, welche in Interaktion von kardialen Myozyten und Endothelzellen detektiert wird [134–137]. Dabei bekräftigen die erhobenen Ergebnisse eine gesteigerte Notwendigkeit zur forcierten Regulation des Gefäßstatus in Anämie. In Charakterisierung des Gefäßstatus erlaubt die Auswertung der Hyperreagibilität auf Kurzischämie Hinweise darauf, dass „*anämische Mäuse*“ zu stärkerer Vasodilatation in Reaktion auf Ischämie befähigt sind. Dies konnte in Beschreibung der relativen Hyperreagibilität bei längeren Präparationszeiten bestätigt werden. Dabei scheint es physiologisch plausibel eine gesteigerte Vasoreagibilität mit Adaptionen einer gesteigerten Rekrutierung von physiologischen Koronarreserven zur Entsprechung höherem kardialen Sauerstoffverbrauchs unter gesteigertem HZV in akuter Anämie zu assoziieren, möglicherweise vermittelt durch eine Steigerung von Endothelfunktionen.

Über die basale Charakterisierung hinaus ist zu beschreiben, dass „*Kontrollen*“ und „*anämische Mäuse*“ im Rahmen von *ex vivo* Versuchen vergleichbare Beeinträchtigungen auf globale Kurzischämie zeigten. Dies könnte als erster Hinweis auf die Integrität der kardialen Funktion während Ischämie und Reperfusion in Anämie verstanden werden, indem aufgezeigt werden konnte, dass „*anämische Mäuse*“ nach Globalischämie keine gesteigerte Limitierung erfahren. Dies ist klinischen Studien, welche Anämie mit adversen *Outcome* nach Myokardinfarkt assoziieren [59, 78] entgegen zu stellen. Begrenzt werden Aussagen durch die mutmaßlich ungenügende Ischämiedauer und unzureichende Übertragbarkeit der *ex vivo* Ergebnisse auf klinische Zusammenhänge.

Im Rahmen der basalen Charakterisierung von akuter Anämie im Rahmen eines Mausmodells konnte definiert werden, dass sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* eine hämodynamische Hyperdynamisierung eine Steigerung kardialer Funktionsparameter erlaubt. Darüber hinaus gestattet die Interpretation von Ergebnissen erster Ischämie/Reperfusionereignisse, dass akute Anämie im Mäuse-Modell nicht mit reduzierten Funktionen zu assoziieren seien.

## 4.3 Medikamentenstudien

Zur erweiterten Charakterisierung von Versuchstierherzen wurde *ex vivo* durch Applikation der kardiovaskulärwirksamen Substanzen Bradykinin, Adenosin und Isoproterenol deren Effekte auf Gefäßstatus und myokardiale Funktionen beschrieben. Über die Beschreibung der allgemeinen Substanzeffekte hinaus konnte in „*anämischen Mäusen*“ in Darstellung der Effekte der Bradykinin Applikation reduzierte, in Darstellung der Adenosin Applikation gleichwertige und in Darstellung der Isoproterenol Applikation erhöhte Effektstärken dargestellt werden, welche Adaptionen unter Anämie implizieren.

Unter Achtung der Spezifitäten und Limitierungen des *ex vivo* Modells des isoliert perfundierten Herzens nach Langendorff war die Darstellung der Vergleichbarkeit der zu untersuchenden Studiengruppen voranzustellen. Zur Darstellung der Präparationsleistung und eines hinreichenden Erhaltungszustandes nach Präparation konnte die Auswertung der Präparationszeit und der Hyperreagibilität in Reaktion auf Globalischämie herangezogen werden. Indem vergleichbare Präparationszeiten und vergleichbare Hyperreagibilitäten aufgezeigt werden konnten, welche den zuvor definierten Kriterien eines hinreichenden Erhaltungszustandes entsprachen, konnte die Annahme der Vergleichbarkeit der Versuchstiergruppen legitimiert werden. Vergleichbarkeit von substanzabhängigen Effekten konnte Sorge getragen werden, indem die Applikation durch eine Infusionspumpe unter Achtung der definierten Konzentrationen und Standards ausgeführt wurde. Die verwendeten Substanzansätze wurden einheitlich für den gesamten Studienzeitraum angefertigt und bis zu ihrem Einsatz entsprechend ihren Spezifitäten gelagert, um Abweichungen vorzubeugen. In Applikation der definierten Substanzen konnte in „*Kontrollen*“ und „*anämischen Mäusen*“ jeweils signifikante Effekte auf die untersuchten Parameter skizziert werden, wodurch eine konsistente Durchführung belegt werden konnte.

Diese vorangestellten Auswertungen und die Achtung von Standards erlauben einen Vergleich von „*Kontrollen*“ und „*anämischen Mäusen*“ im Hinblick auf definierte Substanzapplikationen.

### 4.3.1 Charakterisierung aus Bradykinin Applikation

Durch Applikation des vasoaktiven Peptidhormons Bradykinin konnte in „*Kontrollen*“ und in „*anämischen Mäusen*“ Vasodilatation und Forcierung der kardialen Funktionsparameter erzielt werden, was sich in signifikanten individuellen Steigerungen des CorF, DP,  $dP/dt_{\max}$  und  $dP/dt_{\min}$  darstellte. Dies bestärkte in Achtung des Wirkmechanismus des Bradykinins ein beschriebenes intaktes Kallikrein-Kinin-System im Herzen, welches durch  $B_2$  Rezeptoren und Aktivität der eNOS, welche als konstitutive Isoform über vaskuläre Endotheliumszellen hinaus

auch in kardialen Myozyten nachgewiesen werden konnte, wirken soll [103, 138, 139]. In Gegenüberstellung der Effektstärken von Bradykinin konnten diese in „*anämischen Mäusen*“ als signifikant reduziert in Darstellung aller Messparameter beschrieben werden. Die physiologische Wirkungsweise des Bradykinins auf das kardiovaskuläre System erlaubt unter diesen Ergebnissen Hinweise auf Adaptionen einhergehend mit akuter Anämie, welche das eNOS System beeinflussen. Dabei scheint es plausibel anzunehmen, dass durch Bradykinin induzierte Wirkungen in Abhängigkeit von eNOS Verfügbarkeit und Aktivität zu setzen sind, welche in akuter Anämie möglicherweise reduziert sind.

In der Literatur konnten Abhängigkeiten des eNOS Systems von Anämie beeinflussenden Aspekten wie Erythrozyten-Funktion, Sauerstoffangebot und hämodynamischen Adaptionen beschrieben werden.

In Bezug auf Erythrozyten-Funktion konnten Studien darstellen, dass funktionelle eNOS Aktivitäten als Teil einer *erythrocrine function* [140] hämoglobinhaltiger Erythrozyten einen signifikanten Beitrag zur Regulation des Gefäßstatus durch Synthese, Transport, Freisetzung und Entwertung von NO leisten [141–143]. In dieser Funktion spricht eine Reduktion des Hb-Wertes im Sinne der induzierten akuten Anämie für konsekutive Auswirkungen auf gefäßregulatorisch wirksame Mechanismen, welche sich in adaptierten eNOS Aktivitäten des Herzens widerspiegeln könnten. Dazu konnte in Studien beschrieben werden, dass sich Expression und Aktivität der eNOS in Erythrozyten von Patienten mit endothelialen Dysfunktionen gleichgerichtet reduziert darstellten [141, 144], was Hinweise auf komplexe systemische Wechselwirkungen und funktionelle Regulationsmechanismen zwischen eNOS Entitäten erlaubt.

Einhergehend mit einer reduzierten Sauerstofftransportkapazität im Sinne einer Anämie sind Studien, welche produziertes NO durch eNOS in eine Abhängigkeit von Sauerstoff stellen in Diskussionen mit einzubeziehen [145]. Ohne adäquate Versorgung mit notwendigen Substraten und/oder Cofaktoren z.B. unter unzureichender Sauerstoffversorgung, kann die eNOS Funktion als beeinträchtigt und NO Bereitstellung als limitiert angenommen werden [146]. Hervorzuheben ist dabei die Interaktion von NO mit Sauerstoff bei welcher Nitrit gebildet wird, welches nach herrschendem Sauerstoffgradienten über Reaktionen mit desoxygeniertem Hämoglobin und desoxygeniertem Myoglobin zu funktionellem NO rekonvertiert wird [147, 148] und somit als physiologisches Reservoir für funktionelles NO fungiert. In Bezug auf Sauerstoffverfügbarkeiten im Rahmen des etablierten Anämie-Modells wäre es plausibel anzunehmen, dass diese Regulation besonderen Forderungen unterworfen wäre, wobei Ergebnisse aus der Adenosin Applikationen Hinweis auf eine ausreichende Oxygenierung des Myokards *in vivo* erlauben. Adaptionen durch forcierten Sauerstoffumsatz im Rahmen der induzierten akuten Anämie könnten die Bereitstellung von NO durch eNOS und Nitrit Reserven beeinflussen auch

wenn die Relevanz unter der Prämisse, dass die akute Anämie durch hämodynamische Anpassungen als kompensiert angenommen werden kann, begrenzt scheint.

Aus Reduktion des Hkt in „*anämischen Mäusen*“ ergeben sich hämodynamische Veränderungen, welche eNOS Aktivitäten relevant beeinflussen können. Veränderte Viskositäten können mit veränderten Scherraten assoziiert werden, welche als ein Stimulus für eNOS Aktivität gelten [149]. In Studien konnte beschrieben werden, dass Veränderungen des Hkt den Scherstress in Koronararterie signifikant beeinflussen und in diesem Sinne anämische Zustände mit reduziertem Scherstress zu assoziieren wären [150, 151]. In Übertragung auf die durchgeführte Laborstudie resultiert aus diesen Annahmen eine verminderte eNOS Aktivität in „*anämischen Mäusen*“, möglicherweise dargestellt in konsekutiv eingeschränktem Vermögen, eine Bradykinin vermittelte Reaktion zu zeigen. Unter Voraussetzung, dass mögliche Adaptionen auch *ex vivo* persistieren würden, könnten die erhobenen Befunde die Annahmen stützen und eNOS Aktivität in Abhängigkeit der Viskosität stellen.

Die durch die Bradykinin Applikation geführte Assoziation von veränderten eNOS Aktivitäten und induzierter akuten Anämie eröffnet vielseitige Diskussionen über Adaptionen und vermittelnde Effekte. Besonders vielversprechend erscheint auch die Assoziation von reduzierter kardialer eNOS Aktivität in akuter Anämie mit verändertem NO Stoffwechsel, aus welchem sich relevante Adaptionen für Ischämie/Reperfusionereignisse und oxidativem Stress ergeben könnten [152, 153]. Das Studiendesign limitiert dabei Möglichkeiten Kausalitäten zu benennen.

#### **4.3.2 Charakterisierung aus Adenosin Applikation**

In Darstellung der Effekte durch Adenosin Applikation konnte in „*Kontrollen*“ und „*anämischen Mäusen*“ eine gleichwertige signifikante Steigerung des CorF und signifikante Steigerung von myokardialen Funktionsparametern, dargestellt in DP,  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$ , beschrieben werden. Dies entspricht der durch die Literatur beschriebenen Stimulation der  $A_2R$ , welche mit Vasodilatation und positiver Inotropie assoziiert wird [114–117].

Als vorrangiger Effektor der Leistungssteigerung fungierte dabei eine potente, gleichwertige Vasodilatation, welche sich in erhobenen Ergebnissen durch eine Steigerung von  $120,42 \pm 44,40 \%$  (n=7) in „*Kontrollen*“ und  $114,78 \pm 36,03 \%$  (n=8) in „*anämischen Mäusen*“ darstellen ließ. In Zusammenschau mit durch Isoproterenol Applikation generierten Steigerungen des CorF von  $116,08 \pm 52,70 \%$  (n=7) in „*Kontrollen*“ und  $144,64 \pm 63,76 \%$  (n=8) in „*anämischen Mäusen*“ erlaubt dies zu charakterisieren, dass „*Kontrollen*“ und „*anämischen Mäuse*“ im gleichen Maße ihren koronaren Gefäßstatus maximieren können. Unter dieser Prämisse kann beschrieben werden, dass „*anämische Mäuse*“ im *ex vivo* Modell keine Limitierung forciert Vasodilatation erfahren. Dies greift in Studien beschriebene Umstände auf, welche



beschreiben, dass durch verfügbare physiologische Koronarreserven von 400 – 500 % im gesunden Myokard der Gefäßstatus keine Limitierung der hämodynamischen Kompensation darstellt [26].

Ergebnisse der Adenosin Applikation erlauben Hinweise auf Sauerstoffverfügbarkeiten der Myozyten in „*anämischen Mäusen*“ zu formulieren. Dazu konnte in der Literatur beschrieben werden, dass A<sub>2</sub>R-Aktivitäten im Sinne einer „*Self-Protection*“ Myozyten vor hypoxischen Zuständen beschützen können [137]. Dies impliziert, dass gesteigerte Adenosin Rezeptoraktivitäten in Situationen des Missverhältnisses von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf zu erwarten wären. Die mittels *ex vivo* Experiment abgebildete Adenosin Wirkungen in „*anämischen Mäusen*“ und „*Kontrollen*“, welche vergleichbare Potentiale darstellten, gestattet die Annahme, dass in Reaktion auf die Pathophysiologien der akuten Anämie im Myokard keine Mediation durch den Hypoxie-Sensor Adenosin erforderlich war. Dieser Hinweis auf eine ausreichende Oxygenierung des Myokards *in vivo* erlaubt die akute Anämie durch Zentralisierung und Adaption als hinreichend kompensiert anzunehmen [127]. Gestützt wird dies durch klinische Beobachtungen, welche zeigen, dass ein intaktes Myokard eine Senkung des Hb-Wertes auf 7,5 g/dl durch Maximierung kardialer Funktionen kompensieren kann [21, 26].

Aus der Adenosin Applikation konnte für die Charakterisierung der akuten Anämie in einem Mausmodell formuliert werden, dass in Bezug auf den Koronarstatus eine akute Anämie keine Limitierung beschreibt. Darüber hinaus konnte in Interpretation des Adenosin Systems als Hypoxie-Sensor Pathophysiologien der akuten Anämie im Herzen als hinreichend kompensiert angenommen werden.

### 4.3.3 Charakterisierung aus Isoproterenol Applikation

In der Literatur wird Isoproterenol als synthetisches, nicht-selektives Beta-Sympathomimetikum über  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren im Myokard eine Steigerung der Herzfrequenz und des kardialen *Outputs* und über  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren in der Gefäßmuskulatur eine Relaxation zu gesprochen [119, 120]. Diesen Effekten konnte in Darstellung von Ergebnissen der Isoproterenol Applikation entsprochen werden, indem in „*Kontrollen*“ und „*anämischen Mäusen*“ signifikante Steigerungen des CorF und der Funktionsparameter DP,  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  beschrieben werden konnten. Effektmaße waren dabei differenziell zu beschreiben.

In Darstellung der kardialen *Performance* Steigerung konnte aufgezeigt werden, dass „*anämische Mäuse*“ signifikant größere Reaktionen auf standardisierte Isoproterenol Applikation zeigten, welche sich in signifikant höheren Effektmaßen in Darstellung der kardialen Funktionsparameter präsentierte. Hervorzuheben sind dabei besonders signifikante Steigerungen in Beschreibung der Dynamik von Kontraktionen ( $dP/dt_{max}$ ). Vermittelt durch den Wirkmecha-

nismus der Substanz Isoproterenol sind Assoziation von akuter Anämie zu veränderten Aktivitäten des adrenergen Systems im Besonderen zu  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren zu formulieren. Entsprechend gesteigerten Effekten können Hinweise auf höhere Isoproterenol Sensitivitäten in „*anämischen Mäusen*“ formuliert werden. Dies stellt gleichgerichtet, wie bereits im Rahmen der basalen Charakterisierung beschrieben, anämische Leistungssteigerungen in Abhängigkeit von Adrenozeptoren und Katecholaminen [27–29, 131]. Die Ergebnisse der *ex vivo* Laborstudien legen weiterführend eine strukturelle Anpassung nahe, welche über die Explantation des Versuchstierherzens hinaus gesteigerte  $\beta_1$  Funktionen vermitteln.

Eine Assoziation einer akuten Anämie mit einer signifikanten Steigerung des Leistungsvermögens erlaubt weitere strukturelle Adaptionen zu diskutieren. Im Rahmen der Maximierung von Leistungspotentialen durch Applikation von Isoproterenol waren in „*anämischen Mäusen*“ auch in Darstellung absoluter Funktionswerte signifikant höhere Messwerte zu erheben. So konnte beispielhaft der DP in „*Kontrollen*“, beschrieben durch  $190,14 \pm 11,72$  mmHg ( $n=7$ ) signifikant (\*) gegenüber „*anämischen Mäusen*“, beschrieben durch  $220,38 \pm 33,91$  mmHg ( $n=8$ ) unterschieden werden. Sofern nicht das adrenerge System, sondern Leistungsvermögen als bestimmende Entität zur Maximierung von Leistung in dem etablierten Modell definiert wird, könnten Assoziation zwischen dauerhafter Kompensation adverser Pathophysiologien und möglichen Anpassungen im Sinne eines Trainingseffektes geführt werden. Hervorgerufen durch reduzierte Sauerstofftransportkapazitäten und daraus resultierenden Leistungsansprüchen an das kardiale System könnten in Reaktion auf chronische Mehrbelastung Myokardfunktionen adaptiven Veränderungen unterworfen sein und erbringbare Leistung maximiert werden. Hinweis darauf formulieren nicht nur höhere Maximalleistungen in „*anämischen Mäusen*“, sondern auch zu einem statistischen Trend gesteigerter Grundumsatz von „*anämischen Mäusen*“ in Darstellung des  $\text{CorF}$  *ex vivo* unter Ruhebedingungen. In Darstellung von Effekten aeroben Trainings konnte dazu in Studien Anpassungsreaktionen im Sinne gesteigerter aerober Kapazität der belasteten Muskulatur durch vermehrte Kapillarisation und vermehrter vasodilatatorischer Kapazität aufgezeigt werden [154, 155].

In standardisierter Applikation von Isoproterenol konnte sowohl in „*Kontrollen*“ als auch in „*anämischen Mäusen*“ eine Maximierung der Funktionsparameter DP,  $dP/dt_{\max}$  und  $dP/dt_{\min}$  beschrieben werden. Diese Ergebnisse suggerieren, dass auch unter Stimulation durch Leistungsinduktoren eine akute Anämie in isolierter *ex vivo* Darstellung keine Funktionslimitierung in unterworfenen Versuchstierherzen darstellt. Dies unterstützt aufgestellte Hypothesen, dass unter ausreichender Substratverfügbarkeit Leistungssteigerungen zur Kupierung durch akute Anämie hervorgerufene Pathophysiologien möglich sind und sich in hinreichender Kompensation adverser Effekte darstellen [21, 26].

In experimentellen Studien konnte dargestellt werden, dass durch Aktivierung von  $\beta_3$ -adrenerge Rezeptoren allgemeine kardioprotektive Effekte induziert werden könnten, mit der Möglichkeit einer klinischen Wirkung vorzugsweise während einer späten Ischämie oder/ und früher Reperfusion [156]. Überhöhte Effektmaße von Isoproterenol in „*anämischen Mäusen*“ könnten dazu unabhängig der Wirkungsweise von Isoproterenol auf eine allgemeine Forcierung des adrenergen Systems hinweisen, mit dem Potential myokardiale Schäden im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionereignisses abzuwenden. Dies könnte in Einklang gebracht werden mit den *ex vivo* beobachteten signifikant kleinere Infarktarealen in „*anämischen Mäusen*“

Diskutierte Beobachtung erlauben Isoproterenol Applikation im Rahmen des *ex vivo* Modells mit gesteigerten kardialen Funktionalitäten vor allem in „*anämischen Mäusen*“ zu assoziieren. Als mögliche vermittelnde Mechanismen könnten gesteigerte adrenerge Sensibilität oder ein Trainingseffekt im Zuge von Mehrbelastung beschrieben werden.

#### **4.4 Charakterisierung aus Ischämie/Reperfusionereignissen**

Zur weiterführenden Charakterisierung kardialen Funktionsvermögen unter akuter Anämie wurden Versuchstiere im Rahmen des *ex vivo* Modell des isoliert perfundiertem Herz nach Langendorff einem Ischämie/Reperfusionereignis unterworfen. Die Lokalischämie des RIVA war auf 45 Minuten und die anschließende Reperfusion auf 120 Minuten definiert. Unter Darstellung der Vergleichbarkeit der zu untersuchenden Versuchstiere konnte in „*anämischen Mäusen*“ eine signifikant stärkere Limitation der kardialer Funktionsparameter DP,  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  in Ischämie beschrieben werden. In der anschließenden Reperfusion zeigten „*anämische Mäuse*“ eine signifikant gesteigerte *Recovery* kardialer Funktionen, ausgedrückt in CorF, DP,  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$ . Diese Ergebnisse ließen sich durch Darstellung signifikant kleiner Infarktareale bekräftigen.

Unter Achtung der Spezifitäten und Limitierungen des *ex vivo* Modells des isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff waren Studien eine Darstellung der Vergleichbarkeit der zu untersuchenden Studiengruppen voranzustellen. Zur Beschreibung des hinreichenden Erhaltungszustandes nach Präparation konnten die Ergebnisse der Auswertung von Präparationszeit und Hyperreagibilität nach globaler Kurzischämie herangezogen werden. Aufgrund des präparatorischen Mehraufwandes wurden notwendigerweise verlängerte Präparationszeiten toleriert, welche sich in „*Kontrollen*“ und „*anämischen Mäusen*“ nicht unterschieden. In Darstellung der Hyperreagibilität in Reaktion auf globale Kurzischämie konnten alle Versuchstierherzen das zuvor definierte Kriterium eines hinreichenden Erhaltungszustandes erfüllen.

Zur Evaluation möglicher Effekte im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionereignisses war eine Vergleichbarkeit der Ischämie-Phase in „*Kontrollen*“ und „*anämischen Mäusen*“ erforderlich. Ein gleichwertig limitierter Zustand während reversibler Lokalischämie konnte durch

äquivalente relative Flussreduktion von  $> 30\%$  in den Versuchstieren beschrieben werden. Vergleichbarkeit des durch Ligatur, einer akuten Ischämie unterworfenen Myokardareal konnte im Rahmen der Auswertung von Infarktarealen durch Darstellung vergleichbarer Flächen unter Risiko pro linkem Ventrikel in „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ bestärkt werden. Gültigkeit der Infarktauswertung konnte erzielt werden, indem ausreichend Reperfusion etabliert wurde, um reduktive Äquivalente zu entfernen [157, 158].

Diese vorangestellten Auswertungen und die Achtung von Standards erlaubten einen Vergleich von „Kontrollen“ und „anämischen Mäusen“ im Hinblick auf ein definiertes Ischämie/Reperfusionereignis.

#### 4.4.1 Charakterisierung aus Lokalischämie

Während definierter, reversibler Lokalischämie induziert durch Okklusion des RIVA der A. coronaria sinistra konnte eine signifikant stärkere Reduktion der kardialen Funktionsparametern DP,  $dP/dt_{\max}$  und  $dP/dt_{\min}$  in „anämischen Mäusen“ beschrieben werden.

In Darstellung absoluter Messwerte konnte in „anämischen Mäusen“ über die gesamte Ischämiezeit signifikant geringere kardiale Funktionalitäten als in „Kontrollen“ beschrieben werden, welche besonders zu Beginn der Ischämie zu den Messpunkten 5. und 10. Minute Ischämie in „anämischen Mäusen“ als maximal limitiert darzustellen waren. Gestützt werden Beobachtungen durch Darstellung der relativen Funktionalitäten zum präischämischen Zustand, indem „anämischen Mäusen“ eine stärkere Reduktion kardialer Funktionen zugeschrieben werden konnte, welche zur 10. Minute Ischämie als signifikant zu beschrieben waren. Dies erlaubt zu formulieren, dass „anämische Mäuse“ mit einer signifikant größeren Limitation kardialer Funktionen in Ischämie einhergehen und assoziiert akute Anämie mit gesteigerter Beeinträchtigung während eines akuten Verschlusses eines Herzkranzgefäßes, im Sinne eines Myokardinfarktes.

Die Induktion einer akuten Anämie ist demnach mit Adaptionen und veränderten Pathomechanismen verbunden, welche in ihrem Effekt Funktionalitäten unter Hypoxie begrenzen. Dies erlaubt Diskussionen hinsichtlich möglicher vermittelnder Effekte, welche, nach der Pathophysiologie der Anämie, veränderte Sauerstoffverfügbarkeiten mit der Pathophysiologie von Ischämien verknüpfen.

Als ein möglicher Mechanismus veränderter Effekte einer Ischämie ist eine Assoziation von akuter Anämie mit Steigerungen des Leistungsvermögens und forciertem Substratbedarf im Hinblick auf einen potentiellen Schwellenwert einer hinreichenden Versorgung zu diskutieren. Voranzustellen ist eine Definition der Ischämie, welche diese als eine Hypoperfusion von Gewebe mit oxygeniertem Blut, im Sinne einer unzureichenden Versorgungslage, auffasst. Eine experimentelle Studie konnte sowohl in *in vivo* als auch in *ex vivo* Versuchen darstellen, dass

die Schwere einer myokardialen Ischämie in einer akuten Anämie nicht in Abhängigkeit der Hämodilution darzustellen, sondern vielmehr auf einen hypoxischen Zustand zurückzuführen sei [159]. In Bezug auf eine manifeste Anämie erlaubt dies zu formulieren, dass erst bei Versagen von Kompensationsmechanismen mit konsekutiven hypoxischen Bedingungen nachteilige Effekte in Erscheinung treten. Dazu konnten im Rahmen der durchgeführten *in vivo* Versuche der Echokardiografie aufgezeigt werden, dass, um physiologischen Funktionen entsprechen zu können, „*anämische Mäuse*“ eine Hyperdynamisierung der Herz-Kreislauf Funktion etablierten. Mit chronischen Mehrbelastungen des Kreislaufsystems einhergehend, sind Anpassungsreaktionen zu erhöhter Leistungsfähigkeit zu hypothesieren, welche eine gesteigerte maximale Sauerstoffaufnahmeinduzieren könnte [160]. In Darstellung von Effekten aeroben Trainings konnten in Studien Anpassungsreaktionen im Sinne gesteigerter aerober Kapazität der belasteten Muskulatur durch vermehrte Kapillarisation und vermehrter vasodilatatorischer Kapazität dargestellt werden [154, 155]. Dies konnte im Rahmen der basalen Charakterisierung in Bezug auf höheres Leistungsvermögen und in Interpretation des koronaren Flusses durch höheren Grundumsatz in Anämie bekräftigt und auf das etablierte Anämie-Modell bezogen werden. Bereits unter der isolierten Pathophysiologie der Anämie konnte in Beschreibung der myokardialen Hämodynamik und des Metabolismus definiert werden, dass obwohl die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz in Koronarien signifikant reduziert war, der Sauerstoffumsatz des Myokards signifikant anstieg, assoziiert mit einem signifikanten Anstieg des Laktates [133]. Dies könnte als ein Indikator für gesteigerte Relevanz anaerober Stoffwechselaktivität basal interpretiert werden und verdeutlicht die maximale Ausschöpfung aerobem Metabolismus und eine gesteigerte Abhängigkeit des Energiemetabolismus von Sauerstoff zur Aufrechterhaltung kardialer Funktionen in Anämie.

Dazu konnte in Auswertung der Ergebnisse der Adenosin Applikation formuliert werden, dass submaximalen Auslastung im Anämie-Modell als hinreichend kompensiert angenommen werden könnten. Dies kann durch experimentellen Studien bekräftigt werden, indem eine signifikante Reduktion des Hb-Wertes das Sauerstoffangebot zwar auf einen kritischen Zustand reduziert, dies aber unter stabilen Bedingungen den Sauerstoffkonsum nicht beeinträchtigt [161–163]. In Assoziation zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffkonsum kann dabei der Terminus „Schwellenwert“ definiert werden, unterhalb welchem eine direkte Abhängigkeit des Sauerstoffkonsums vom Sauerstoffangebot formuliert werden kann [127]. Weitere Limitierungen im Sinne reduziertem Sauerstoffangebotes würden einen ausreichenden Sauerstoffkonsum behindern. Unter pathologischen Bedingungen würde dieser Schwellenwert angehoben und die Sauerstoffverwertung limitiert [127].

In durchgeführten Langendorff Studien zeichneten sich „*anämische Mäuse*“ während Ischämie durch eine signifikant stärkere Beeinträchtigung kardialer Funktionsparameter aus, welche

sich als Resultat aus chronischen Mehrbelastungen, forciertem erhöhtem Wirkungsgrad mit vermehrter Sauerstoffforderung oder auch dem Potential bzw. Notwendigkeit zu höherer Sauerstoffaufnahme interpretiert werden könnte. Unter der Annahme, dass regulatorische Adaptationen basal eine hinreichende Kompensation ermöglichen, könnte beschrieben werden, dass diese bedarfsorientierte Adaption das mögliche Kompensationsvermögen von anämischen Versuchstierherzen maximal ausschöpft. Unter Zuwirken einer weiteren Verschärfung der Myokardversorgung durch eine Lokalischämie fordern die antrainierten Adaptionen einen überhöhten Sauerstoffbedarf, welchem nicht entsprochen werden könnte. Dem folgend könnte ein entstehendes Defizit als essentieller aufgefasst werden, als in vergleichbaren „Kontrollen“, einhergehend mit einer signifikant stärkeren Beeinträchtigung der kardialen Funktion in anämischen Versuchstieren während Ischämie. In *in vivo* Studien kann dazu aufgezeigt werden, dass mit einer Reduktion des Hkt im Sinne einer manifesten Anämie Koronarreserven signifikant beeinträchtigt werden, einhergehend mit einer höheren kardialen Vulnerabilität [164].

Über überhöhte Sauerstoffabhängigkeiten hinaus könnten reduzierte kardiale Funktionen Effekte protektiver Mechanismen darstellen, welche Schäden vom Myokard unter Hypoxie abwenden. In Regulation kardialer Funktionen konnten Interaktionen dargestellt werden, welche versuchen durch Etablierung eines funktionellen Gleichgewichtes aus Substratforderung und Substratangebot Beeinträchtigungen zu minimieren. Bei „*anämischen Mäusen*“ könnten dabei forcierte Substratforderungen eine entschiedenere Begrenzung kardialer Funktionen notwendig machen. Formulierten Hypothesen könnten mit dem in Literatur beschriebenen Phänomen des „*Hibernating*“, assoziiert werden. Dieses Phänomen beschreibt den Zustand eines „Winterschlafs“ des Myokards mit persistierender myokardialer Dysfunktion während kardialer Ischämie, welche sich mit Reetablierung der koronaren Reperfusion rasch verbessert [165, 166]. Eine *Recovery* der kardialen Funktion setzt dabei voraus, dass Myozyten reversibel ihre Funktionalität verlieren und eine kontraktile Dysfunktion in ischämischem aber vitalem Myokard beschrieben werden kann. Klinisch kann dies verdeutlicht werden, indem Patienten mit „*hibernating*“ Myokard eine schlechtere, nach Reperfusion aber bessere Prognose aufzeigen [167]. Dabei wird kardiale Depression in Ischämie vorrangig durch herabgesetzte Pumpfunktion der schlechter durchbluteten Muskelanteile vermittelt. Dies kann aufgefasst werden als eine aktive Anpassung des Energiemetabolismus durch Reduktion der myokardialen kontraktile Funktion unter reduziertem Energieangebot zum Erhalt der Vitalität und strukturellen Integrität [168, 169]. In tierexperimentellen Studien konnte dies als „*perfusion-contraction-matching*“ formuliert werden [170]. Unter vorangestellten Hypothesen, dass Anämie bedingt durch einen „Trainingseffekt“ der Myokardzellen ein erhöhter Energieumsatz zuzuschreiben sei, erlaubt dies zu formulieren, dass „*anämischen Mäuse*“ stärkere Beeinträchtigung aus einem ge-

steigerten *Mismatch* aus standardisierter Perfusion und gesteigertem Energiebedarf unterworfen sind, welches sich im Sinne einer Autoregulation in reduzierteren kardialen Funktionen darstellen könnte. Dies konnte in Versuchen beschrieben werden, indem unmittelbar in Reaktion auf Lokalischemie *ex vivo* eine signifikant überhöhte Beeinträchtigung kardialer Funktion aufgezeigt werden konnte.

In Interaktion von kardialen Myozyten und vaskulären Endothelzellen wäre eine Modifikation kardialen Leistungsvermögens durch von Endothelzellen bereitgestellten kardioaktiven Substanzen möglich [134–136], welche im Rahmen der Ischämie zum Selbstschutz der Myozyten kardiale Funktionen bis zu einer hinreichenden Adaption limitieren. Dazu befähigt die Myozyten die Fähigkeit als Sauerstoff-Sensor zu fungieren [137], welche physiologisch gefäßregulatorisch wirkt und pathophysiologisch unter limitiertem Gefäßstatus möglicherweise durch Modulation der kardialen Funktion ein funktionelles Gleichgewicht aus Sauerstoffanspruch und Sauerstoffbereitstellung erzielen könnte. Besonders in der Frühphase nach Ischämieinduktion waren gesteigerte Reduktionen der kardialen Funktionen zu beschreiben, welche ein manifestes Missverhältnis zwischen Energiebedarf und Energieangebot zugeschrieben werden könnte [168]. Beobachtete signifikant stärkere Beeinträchtigungen in „*anämischen Mäusen*“ könnten aus reduzierten Substratreserven des Myokards erklärt werden. In Anlehnung an mögliche Effekte unzureichender Metabolisierung und Reserven in Anämie könnten Kupierungen limitiert sein und nachteilige Effekte in der frühen Ischämie vermitteln werden. Die Nachteile könnten nach Minuten durch Einstellen eines neuen Gleichgewichtes aus Perfusion und Substratforderung in einem niedrigeren Funktionsniveau ausgeglichen werden [171]. Anpassungen der Versuchstiere an einen veränderten Metabolismus könnten mit signifikanter Laktatproduktion, Reduktion des koronarvenösen pH-Wertes, Anstieg des koronarvenösen pCO<sub>2</sub> und signifikanter Erniedrigung der Kreatinin Konzentration einhergehen [172]. Gleichgerichtete Anpassungen wären auch unter Anämie bereits basal zu erwarten, mit dem Potential, dass „*anämische Mäuse*“ an Veränderungen besser adaptiert seien und irreversible Schäden minimiert würden.

In Darstellung „*anämischer Mäuse*“ in Lokalischemie konnte aufgezeigt werden, dass Anämieinduktion mit einer signifikant stärkeren Limitierung kardialer Funktionen einhergeht. In Translation auf klinische Zusammenhänge könnte eine besonders hohe Vulnerabilität von anämischen Myokardinfarktpatienten in der Frühphase des Myokardinfarktes assoziiert sein. Als mögliche vermittelnde Mechanismen könnten veränderte Substratforderungen oder Ischämie assoziierte, protektive Phänomene wie das „*Hibernating*“ Myokard diskutiert werden.

#### 4.4.2 Charakterisierung aus Reperfusion und Infarktgrößen

Mit Induktion der Reperfusion konnte in „*anämischen Mäusen*“ und „*Kontrollen*“ eine *Recovery* des koronaren Flusses und kardialer Funktionsparameter beschrieben werden, welche signifikant zu unterscheiden war. Obwohl sich die Versuchstiergruppen in absoluter Darstellung von Messparametern nicht unterscheiden ließen, verfügten „*anämische Mäuse*“ in Darstellung relativer Messparameter zum präischämischen Zustand nach Wiedereröffnung des RIVA über eine signifikant höhere Hyperämie und signifikant stärkere Erholung kardialer Funktionen.

In Beschreibung postischämischer Funktionen konnte dargelegt werden, dass „*anämische Mäuse*“ in Mittelwerten höhere *Performance* Niveaus beschreiben konnten als präischämisch, während „*Kontrollen*“ in Mittelwerten gleichwertige oder reduzierte Niveaus darstellten. Die zur Erfassung von Ischämieschaden angeschlossene Bestimmung von Infarktgrößen beschrieb gleichgerichtet, dass „*anämische Mäuse*“ kleinere Infarktflächen auf vergleichbare Limitationen des CorF ausbildeten. In Zusammenschau der Beobachtungen erlaubt dies zu hypothesieren, dass „*anämische Mäuse*“ im Rahmen der Reperfusion in ihrer Funktionalität durch Lokalischemie weniger limitiert wurden als „*Kontrollen*“ und sogar das Potential besitzen ihre Funktionalitäten zu steigern.

Im Hinblick auf in der Literatur beschriebene Phänomene und Mechanismen, welche die Anämie mit möglichen Einflüssen auf die Pathophysiologie des Myokardinfarktes assoziieren, lassen sich verschieden gerichtete Hinweise auf mögliche vermittelnde Effekte formulieren. Dabei sind mögliche Interaktionen mit dem NO System, den Prinzipien des oxidativen Stresses, Verfügbarkeiten von EPO, eine Präkonditionierung und die Phänomene „*Hibernating*“ und „*Stunning*“ mögliche Ausgangspunkte für Diskussionen und weiterführende Untersuchungen. Möglichen Interpretationen von Anämie vermittelnden Effekten ist die Darstellung der Pathophysiologie, des durch Ischämie und Reperfusion vermittelten Schadens als Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) voranzustellen. Demnach sind Schäden nicht ausschließlich auf durch Ischämie induzierte Minderversorgung des betroffenen Myokards sondern paradoxerweise auch auf die Reperfusion des unterworfenen Myokards zurückzuführen [153]. Dem anteilig vermitteltem myokardialen Schaden durch IRS konnte nach experimentellen Studien bis zu 50% des eigentlichen Infarktschadens zugesprochen werden [145]. Dies erlaubt nicht nur Effekte der Ischämie, sondern auch Effekte auf Reperfusion das Potential zuzuschreiben, Funktionalitäten und Infarktausmaße zu beeinflussen.

Aus den Ergebnissen der Substanzapplikation im Rahmen von Langendorff Studien konnten von „*Kontrollen*“ zu „*anämischen Mäusen*“ Veränderungen im NO System aufgezeigt



werden, wobei „*anämischen Mäuse*“ potentiell verminderte Effekte durch eNOS zugeschrieben werden könnten. In der Literatur konnten vielfältige Interaktionen zwischen NO und dem kardiovaskulären System belegt werden, im Besonderen unter ischämischen Bedingungen. Unter physiologischen Bedingungen lässt sich dem vasoaktiven NO eine kardioprotektive Funktion zuschreiben, vermittelt durch antioxidative und antiinflammatorische Wirkungen [152, 173–175]. Dem gegenüber konnte unter hypoxischen Bedingungen eine eNOS vermittelte Induktion von oxidativem Stress durch überschießende ROS Produktion beschrieben werden, welche IRS mitbedingen [153]. In Übertragung auf das etablierte Anämie-Modell und einhergehende Adaptionen in Reaktion auf Ischämie/Reperfusionereignis sind differenzielle Mechanismen in Assoziation mit Bereitstellung von NO zu diskutieren.

Als ein möglicher vermittelnder Effekt könnte eine Potenzierung der induzierbaren NOS (iNOS) in „*anämischen Mäusen*“ als kompensatorischer Mechanismus auf eNOS Reduktion hypothesierter werden, welche möglicherweise NO Verfügbarkeit während Ischämie und Reperfusion fördert und kardioprotektive Wirkungen von NO erlaube. Diese NOS Isoform konnte neben konstitutiv exprimierten neuronaler NOS (nNOS) und eNOS im Herzen nachgewiesen werden [176]. In Studien konnten eNOS *knockout* Mäuse (eNOS<sup>-</sup>) mit erhöhter Expression von induzierbarer NOS RNA assoziiert werden [177, 178]. Diesem folgend sei eine gesteigerte Verfügbarkeit von NO in „*anämischen Mäusen*“ anzunehmen. Verfügbarkeiten von NO bzw. NO *Donors* wurden dabei mit Reduktion von IRS assoziiert [179–181]. Dabei konnte NO zugeschrieben werden, Gewebe durch physiologische Regulation des vaskulären Tonus zu schützen, Inhibierung der Plättchenaggregation zu bewirken, Sauerstoff abhängigen Radikalen zu entkräften, eine physiologischen Membranpermeabilität zu erhalten, Immunverteidigung zu aktivieren und Endothelzell-Regeneration zu stimulieren [182]. Darüber hinaus könnten mögliche Mechanismen auf negativen inotropen und chronotropen Effekten des NO auf Kardiomyozyten beruhen, durch welche hyperkontraktile Prozesse während Reperfusion abgeschwächt und ventrikuläre Gefäßbelastung reduziert werden [178, 183, 184]. Zusätzlich würde durch Interaktion von NO und der mitochondrialen Atmungskette ein zytoprotektiver Effekt etabliert, welcher eine Proteinmodifikation und Reduktion der Bildung von ROS erwirkt [145]. Eine Unabhängigkeit der iNOS von Ca<sup>2+</sup> beugt dabei einem möglicherweise schädlichen *NO Burst* in Reaktion auf Ischämie vor und vermittelt so unabhängig der eNOS rein kardioprotektive Effekte des NO [138, 153]. Klinische Anwendung könnte dies finden im Rahmen von Nitrit Applikationen, welche das Potenzial besitzen Herzinfarktgrößen signifikant zu reduzieren [185–187] und protektiv vor Reperfusionsschäden zu wirken [188]. Dabei können Nitrite als Reservoir pathologisch erniedrigte NO-Spiegel während Hypoxie bzw. Ischämie mit assoziiertem Sauerstoffmangel und konsekutiver NOS-Dysfunktion ausgleichen.

Darüber hinaus könnte eine reduzierte Verfügbarkeit bzw. Aktivität von eNOS, Entkopplungsprozesse unter Hypoxie limitieren und Bildung von ROS begrenzen. Zu Grunde liegt ein Mechanismus, welcher beschreibt, dass unter hypoxischen Bedingungen eine Entkopplung der eNOS von ihrer Funktionalität der NO Produktion, vermittelt durch reduzierte Tetrahydrobiptern (BH<sub>4</sub>) Konzentration, eine vermehrte Produktion von ROS bedingt [153, 189]. Die als *eNOS uncoupling* formulierte endotheliale Dysfunktion tritt in Folge vermehrter Oxidierung des Cofaktors BH<sub>4</sub> durch vermehrten oxidativen Stress während Ischämie und Reperfusion auf. Durch Oxidierung wird die funktionelle Konzentration von BH<sub>4</sub> reduziert und bewirkt bei Erreichen eines kritischen Quotienten aus BH<sub>4</sub> und eNOS eine Transformation der eNOS. Die *uncoupled eNOS* stellt fortan Superoxide bereit, welche nachhaltig antioxidative Mechanismen beschränkt und oxidative Schäden stärkt [153, 189]. Superoxid Bereitstellung kann sich direkt auf die kardiale Funktionalität auswirken, indem in Interaktion mit NO gebildetes Peroxynitrit myokardiale Kontraktilität beschränkt und kardiale Funktion limitiert [190]. In Reperfusion konnte dazu in *ex vivo* Studien aufgezeigt werden, dass eNOS<sup>-</sup> Mäuse sich durch signifikant höhere funktionelle Erholung und abgemilderte postischämische Dysfunktion gegenüber Kontrollen präsentierten [191]. Diese Ergebnisse sind jedoch kritisch zu diskutieren, da in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm auch gegenteilige Effekte präsentiert werden konnten, welche den Fokus auf *Confoundern* richten [177]. Zu diesen Interpretationen können Studien benannt werden, nach welchen eNOS Reduktionen durch Applikation eines *eNOS Inhibitors* protektiv vor postischämischen Dysfunktionen wirken und Infarktausprägungen reduzieren [191–193]. Assoziieren sei dies mit einer auf myokardiale Ischämie folgende Reperfusion, welche sich durch massive Bereitstellung von NO im Sinne eines *NO Burst* [194] vermittelt durch überhöhte Ca<sup>2+</sup> Freisetzung und abhängige Aktivierung in kardialen Myozyten [195] oder Adaptionen des Scherstress während Reperfusion mit konsekutiver NO Freisetzung darstellt [196]. Dabei ist zu diskutieren ob kardioprotektive Effekte durch limitierte NO Bereitstellung aus reduzierter eNOS Funktionalität selbst oder durch weiterführende Effekte unabhängig NO bzw. eNOS Aktivität induziert werden [197, 198]. Darüber hinaus können beschriebene Effekte der Laborstudien Annahmen unterstützen, dass mit Reduktion der eNOS Aktivität Ischämie/Reperfusionsschäden vermittelt durch oxidativen Stress minimiert werden können, möglicherweise bedingt durch Beschränkung von Entkopplungsprozessen. Klinische Relevanz von Entkopplungsprozessen konnte unterstützt werden durch Studien, welche exogene Substitution von BH<sub>4</sub> mit positiven Effekten auf linksventrikuläres *Remodelling* und reduzierten myokardialen Schaden nach Ischämie/Reperfusion assoziieren konnten [199–201]. Die beschriebenen Studienergebnisse legen komplexe Interaktionen zwischen NO Verfügbarkeiten, eNOS Aktivitäten und kardialen Dysfunktionen im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionereignisses nahe. Die durch das *ex vivo* Modell nach Langendorff erhobenen Ergebnisse assoziieren verringerte

eNOS vermittelte Effekte mit reduzierten Beeinträchtigungen eines IRS und bekräftigt in der Literatur gleichgerichtete Ausführungen.

Als weiterer möglicher Mediator von Schäden, hervorgerufen durch ein Ischämie/Reperfusionereignis, konnten EPO-Konzentrationen definiert werden. In Bezug auf das etablierte Anämie-Modell ist zu formulieren, dass als Reaktion auf eine verminderte systemische Sauerstoffsättigung physiologisch eine gesteigerte EPO-Bereitstellung induziert wird, welche erlaubt eine gesteigerte EPO-Konzentration mit „*anämischen Mäusen*“ zu assoziieren. In experimentellen Studien konnte aufgezeigt werden, dass funktionelle EPO-Rezeptoren in kardialem Gewebe nachzuweisen sind und, dass exogene EPO-Applikation kardiale Funktionen nach Ischämie/Reperfusionereignis verbessern [202–205]. Dabei konnte *ex vivo* unter EPO-Applikation mit einsetzender Reperfusion signifikant höhere kardiale Perfusion und signifikant höhere kardiale Funktionalitäten beschrieben werden [202]. Zu Grunde zu legen seien Effekte, welche auf nicht-erythropoetischen Prozessen beruhen. So konnte EPO zugeschrieben werden antiapoptotisch zu wirken, Effekte von ROS zu limitieren, kardiale  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpen zu modulieren und NO Bereitstellung zu erwirken [202, 206–209]. Darüber hinaus konnte hypothesiert werden, dass EPO Neovaskularisation induziert, assoziiert mit gesteigerter alpha-MHC Expression und darüber günstige Effekte moduliert [205]. Unterstützt wird dies durch experimentelle Versuche, welche Mangel an EPO-Rezeptoren im Herzen mit signifikant größeren Infarkten assoziieren konnten [210]. Konträr sind klinische Studien anzuführen, welche EPO-Behandlung nicht mit einer Verbesserung kardialer Funktion und reduzierter Infarktgröße assoziieren können, sondern sogar nachteilige Effekte formulierten [211–214]. Allen klinischen Studien gemein ist die Tatsache, dass EPO-Applikationen nach etabliertem Ischämie/Reperfusionereignis erfolgten. Dies begrenzt Vergleiche mit experimentellen Studien, welche EPO-Applikationen vor Ereignissen etablierten und positive Effekte darstellten. Daraus ergibt sich eine mögliche Begrenzung positiver Effekte von EPO auf den Ischämie- und frühen Reperfusionseiträume.

In Übertragung auf das etablierte Anämie-Modell konnte eine Assoziation von „*anämischen Mäusen*“ und gesteigerten kardialen Funktionen bei reduzierter Infarktgröße formuliert werden. Anämie als Modell einer EPO-Induktion und konsekutiver forciertem exprimieren von EPO-Rezeptoren führt dabei zu Steigerung von EPO-Konzentrationen bereits vor einem möglichen Ischämie/Reperfusionereignisses. Somit sind die Ergebnisse konkordant den Ausführungen der experimentellen Studien beizufügen, welche EPO mit gesteigerten Funktionen und kleineren Infarkten assoziieren.

Im Zuge möglicher pathophysiologischer Adaptionen im Rahmen der Anämie könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass pathophysiologische Anpassungen der Mikrozirkula-

tion günstige Effekte auf das Recovery der Funktionalität von Myozyten etablieren. In Darstellung mikrozirkulatorischer Effekte in Reaktion auf Anämie könnten Mechanismen beschrieben werden, welche das Sauerstoffangebot im Gewebe steigert. Durch Rekrutierung von zuvor verschlossenen Kapillaren würde ein gesteigerter Kapillarfluss und gesteigerte Sauerstoffextraktion etabliert [215].

Nach einem Konzept des *Reperfusion Injury* wird nur ein kleiner Teil der Myokardzellen sofort irreversibel geschädigt und übrige Myokardzellen werden während Ischämie vermittelt durch Anoxie, biochemische und pathologische Veränderungen unterworfen, beschreiben aber einen potentiell funktionellen Status [165]. Mit einsetzender Reperfusion und Reetablierung von Sauerstoffangebot bestehe das Potenzial Veränderungen, einhergehend mit Ischämie, aufzuheben und den funktionellen Zustand zu reetablieren [165]. Mit Anämie assoziierte Anpassungen der Mikrozirkulation könnten die Möglichkeit bieten, einen höheren Anteil der potentiell funktionellen Myokardzellen zurück in Funktion zu führen und so myokardiale Beeinträchtigung im Rahmen von Ischämie/Reperfusionseignissen zu begrenzen. Als möglicher vermittelnder Mechanismen könnte ein gesteigerter Kollateralfluss mit einhergehender gesteigerter Sauerstoffversorgung an das beeinträchtigte Myokard formuliert werden [159].

In Beschreibung von Interaktionen des Myokards mit Hypoperfusion bzw. Ischämie konnten zwei Phänomene beschrieben werden, welche kardiale Funktionen modulieren. Mögliche Einflüsse des „*Hibernating*“, als Beschreibung eines Winterschlafmyokards und das „*Stunnig*“, als eine transiente postischämische Dysfunktion, sollten in die Diskussion um mögliche veränderte kardiale Funktionen in „*anämischen Mäusen*“ miteinbezogen werden.

Die Darstellungen des Phänomens „*Hibernating*“, welches als möglicher Modulator reduzierender Funktionen in „*anämischen Mäusen*“ während Ischämie bereits diskutiert wurde, könnte durch vermittelte Schonung des Myokards kardioprotektiv wirken und kardiale Funktionsvermögen erhalten. In experimentellen Studien konnte dazu dargestellt werden, dass Hypoperfusion mit assoziierter Minderversorgung im Sinne einer Ischämie Gewebe mit aktivem Metabolismus schadet [216] und, dass reduzierte Beanspruchungen besonders zu Beginn einer Globalischämie kardioprotektiv wirken [126]. Dies erlaubt die Ausprägung von kardialer Schädigung in Abhängigkeit von der Leistung des Herzens in Ischämie zu stellen. In Bezug auf die durchgeführte *ex vivo* Laborstudie könnte den Hypothesen folgend formuliert werden, dass „*anämische Mäuse*“ ausgehend von vergleichbaren kardialen Funktionen zu „*Kontrollen*“, im Rahmen der Ischämie eine signifikant stärkere Limitierung der kardialen Funktion erfahren, welche nach einer Assoziation von Leistung und myokardialen Schaden einen besseren Erhaltungszustand in Reperfusion bedingen und kleinere Infarktausbildung in Anämie begünstigen könnten. Diesem konnte in Auswertung der Reperfusion und der ausgebildeten Infarktarealen

in „*anämischen Mäusen*“ entsprochen werden und assoziiert Anämie mit einer möglichen Interaktion reduzierter Funktionen in Ischämie mit gesteigertem Erhaltungszustand in Reperfusion konkordant zum Phänomen des „*Hibernating*“.

Über „*Hibernating*“ hinaus konnte als weiteres Phänomen das „*Stunning*“ beschrieben werden, welches postischämische kontraktile Dysfunktionen nach Ischämie auffasst [217, 218]. Dies definiert einen transienten Zustand signifikanter aber vollständig reversibler Beeinträchtigung der kardialen Funktion in Reperfusion [165], welcher nicht mit Zelluntergang assoziiert sei [126]. In Interpretation ist das Ausmaß postischämischer Limitationen somit nicht direkt mit möglichen kardialen Schäden und Infarktausprägungen gleichzusetzen, sondern erfordert differenzierte Betrachtungen. In Darstellung möglicher Adaptionen unter Anämie könnte in Interpretation signifikant besserer kardialer Funktionalitäten in „*anämischen Mäusen*“ während Reperfusion eine geringere Beeinflussung von postischämischen Dysfunktionen durch „*Stunning*“ angenommen werden. Das Phänomen des „*stunned Myocard*“ kann mit verschiedenen Interaktionen assoziiert werden wie Energiemetabolismus, Mikrozirkulation, ROS, Immunaktivitäten, strukturellen Schäden oder  $Ca^{2+}$  Abweichungen [168, 219–222] und bietet potentielle Wechselwirkungen mit manifesten Anämien. Dabei konnte gezeigt werden, dass besonders eine pharmakologische Reduktion von ROS das myokardiale „*Stunning*“ abschwächt und eine beschleunigte Erholung kontraktile Funktionalitäten bedingt [223]. Dies könnte in Rahmen höherer antioxidativer Kompetenz von „*anämischen Mäusen*“ für eine stärkere *Recovery* der kardialen Funktion in Reperfusion durch geringeres „*Stunning*“ sprechen. Experimentelle Studien konnten dabei einer myokardialen Ischämie von 5 - 15 Minuten und folgender Reperfusion, eine anhaltende Depression der kardialen Funktionalität über mehrere Tage nachweisen [224, 225]. Dies limitiert die Aussagekraft der erhobenen Beobachtungen in Bezug auf das Phänomen „*Stunning*“, da unter dieser Prämisse bei etablierter Beobachtungszeit von 60 Minuten der Reperfusion erhobenen Effekte nicht als persistent oder transient charakterisieren werden können.

Im Rahmen experimenteller Studien konnten Phasen von vorangegangenen kurzzeitiger Ischämie, im Sinne einer Präkonditionierung, als protektiv in Bezug auf myokardiale Schäden in anschließender anhaltender Lokalischämie dargestellt werden [226]. Vermittelt werden protektive Mechanismen der Präkonditionierung durch Triggersubstanzen, vorrangig in Interaktion mit Kalium-Kanälen, welche in vorgeschalteten Ischämien stimuliert werden und sich kardioprotektiv in akuter Ischämie ausüben [168, 227].

In Übertragung auf das etablierte Anämie-Modell ist Diskussionen voranzustellen, dass Anämien nicht mit einer Präkonditionierung im klassischen Sinne als Modell repetitiver ischämischer Zustände zu assoziieren sind. Auch wenn Ergebnisse aus Adenosin Applikation suggerieren, dass hinreichende Sauerstoffversorgung auch unter etablierter akuter Anämie Bestand

hätte, so konnten experimentelle Studien dennoch Hinweise wie erhöhte Laktatkonzentrationen auf veränderte Sauerstoffverfügbarkeiten in Anämie aufzeigen [133]. Dies impliziert die Notwendigkeit der anaeroben Glykolyse bedingt durch unzureichende Sauerstoffversorgung. Einhergehende Adaptionen des chronisch anaeroben Stoffwechsels könnten Mechanismen vermitteln, welche, in forcierten anaeroben Zuständen wie einer Lokalischämie, eine erhöhte Resistenz gegenüber irreversiblen Schaden oder dessen Verzögerung erlauben. Als möglicher Mediator wäre eine Induktion von kardioprotektiven Mechanismen im Sinne einer Präkonditionierung plausibel, da „*anämische Mäuse*“ bereits Anpassungen an submaximale Sauerstoffverfügbarkeiten getroffen hätte. Dies wird bestärkt, indem in „*anämischen Mäusen*“ gleichgerichtet wie in experimentellen Studien zur Präkonditionierung kleiner Infarktareale mit limitierten Sauerstoffverhältnissen zu assoziieren seien [226].

Als ein möglicher Mediator unzureichender Sauerstoffverfügbarkeiten und Kardioprotektion sind Interaktionen mit dem EPO-System zu formulieren, welches in Anämie eine besondere Relevanz zeigt. Aufbauend auf bereits ausgeführte mögliche Effekte von EPO auf Ischämie/Reperfusionsschäden konnten Studien zeigen, dass Kardioprotektion vermittelt durch intermittierende Hypoxie in direkter Abhängigkeit von HIF-1 $\alpha$  Gen Verfügbarkeiten steht [228]. In Darstellung der günstigen Effekte von Präkonditionierung konnte aufgezeigt werden, dass EPO-Knockout Mäuse, welche sich durch absoluten EPO Mangel auszeichneten, nachteiligen Effekten ausgesetzt werden, welche jedoch durch EPO Applikation abgewendet werden können [229]. Dies erlaubt Hinweise auf Assoziationen von Präkonditionierung mit EPO, welches in Anämie als erhöht angenommen werden könnten. Dazu konnte definiert werden, dass eine raschere postischämische Erholung der kontraktilen Funktion durch Präkonditionierung aus einer Reduktion der Infarktgröße resultiert und nicht aus einer Abschwächung von „*Stunning*“ [230]. Dies entspricht Ergebnissen aus durchgeführten *ex vivo* Laborstudien und legt einen gleichgerichteten Mechanismus wie bei der myokardialen Präkonditionierung nahe, auch wenn diese im klassischen Sinne im dargestellten Modell nicht zu verifizieren ist.

Die in *ex vivo* Studien beschriebenen Ergebnisse, welche Anämie mit gesteigerten Funktionalitäten in Reperfusion und geringere Infarktausprägung assoziieren, könnten als Effekt verschiedenartiger Mechanismen interpretiert werden, welche Prinzipien des Ischämie/Reperfusionsschadens, Verfügbarkeiten von EPO, Phänomene des „*Hibernations*“ und des „*Stunnings*“ sowie Präkonditionierung umfassen. Limitierungen der durchgeführten Studie erlauben dabei im Rahmen der Diskussion nur Assoziationen darzustellen und Pathomechanismen weder zu be- noch zu widerlegen.

## 4.4 Charakterisierung des Redoxstatus

Als möglicher Mechanismus veränderter Pathophysiologie eines Ischämie/Reperfusionereignisses konnte in Studien die Verfügbarkeiten antioxidativer Reserven benannt werden [77]. Diese Assoziation sollte im Rahmen der durchgeführten Laborstudien als möglicher vermittelnder Mediator für die erhobenen *ex vivo* Ergebnisse untersucht werden. Zur Erfassung des Redoxstatus in „Kontrollen“ und unter anämischen Bedingungen wurde repräsentativ das Glutathionsystem untersucht. Besonders in Interaktion mit Erythrozyten kann Glutathion eine hohe Relevanz zugeschrieben werden, in welcher es durch hohe Sauerstoffspannung gebildeten *Reactive Oxygen Species* (ROS) entkräften soll [231]. Diese Relevanz forciert Alterationen unter Anämieinduktion durch Etablierung eines funktionellen Erythrozytendefizits. In Darstellung chronisch bestehender Sichelzellanämien in Kindern konnte dargestellt werden, dass antioxidative Kapazitäten des Plasmas ausgedrückt durch Spiegel der Superoxid-Dismutase, Katalasen, Glutathionen und Glutathion-Peroxidase verändert waren, woraus Interaktionen zwischen Anämien und dem Redoxsystem formuliert werden könnten [232].

Allen Interpretationen und Diskussionen voranzustellen ist die Achtung durchgeführter Normierungen der Messwerte auf Proteingehalt und die Achtung notwendiger Verdünnungen der Proben, um dem Messbereich des verwendeten Assays zu entsprechen.

In gesonderter Auswertung der Proteinfraction der jeweiligen Entität bzw. der jeweiligen Proben konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen aufgezeigt werden. Dennoch wurden erhobene Glutathionniveaus durch ihre zugehörige Proteinfraction normiert, um Störfaktoren vorzubeugen.

In Aufbereitung der Proben waren spezifische Verdünnungen zu achten, welche im Rahmen der Darstellung der Messergebnisse miteinbezogen werden mussten. Diese Verdünnungen erlaubten eine Bestimmung von Messwerten innerhalb der durch den jeweiligen Assay definierten Messbereich. Einhergehend mit notwendigen Adaptionen war es nicht möglich Stoffmengen zu benennen, sodass Messergebnisse als dimensionslose Werte ausgefasst werden müssen. Dies erlaubt nur Vergleiche von Messproben einer Entität und limitiert Vergleiche zu anderen Entitäten. Darüber hinaus dürfen Messwerte nicht in ihrer absoluten Quantität interpretiert werden.

In Auswertung der erhobenen Messparameter vor Ischämie/Reperfusionereignis konnte aufgezeigt werden, dass Anämieinduktion in Versuchsmäusen mit erhöhten Verfügbarkeiten antioxidativer Reserven bei einem möglichen gesteigerten protektiven Anteil des reduzierten GSH am totem GSH zu assoziieren war. In Darstellung basaler Funktionalitäten konnte in Bezug auf die Entität „Herz“ „anämischen Mäusen“ eine höhere antioxidative Reserve zugeschrieben werden, ausgedrückt durch ein günstigeren Ratios aus reduziertem und

oxidiertem Glutathion. Gleichgerichtet ließ sich auch in der Entität „*Erythrozyten*“ erhöhte Reserve des Glutathionsystems pro Menge Protein beschreiben. Konträr zu diesen Ergebnissen deuten Auswertung der Entität „*Plasma*“ auf eine signifikante Reduktion von freiem GSH in „*anämischen Mäusen*“ hin. In Interpretation dieser erhobener Messparameter ist deren Güte aufgrund der Bestimmung von negativen Messergebnissen anzuzweifeln, was als Hinweis auf eine unzureichende Anpassung auf den notwendigen Messbereich interpretiert werden könnte. Trotz dieser Einschränkung implizieren die erhobenen Messwerte stark supprimierte Verfügbarkeiten des freien GSH in „*anämischen Mäusen*“. Unter Achtung dieser Limitation erlaubt die Interpretation der Ergebnisse von „*Herz*“ und „*Erythrozyten*“ Anämie mit einer gesteigerten antioxidativen Aktivität bzw. Reserve im Glutathionsystem zu assoziieren.

Im Besonderen sind dabei Diskussionen über Funktionen des Glutathions in der Entität „*Herz*“ beachtenswert, welche sich in *ex vivo* Betrachtung in der Langendorff-Apparatur als isolierte Entität darstellte. In Studien und Experimenten konnte aufgezeigt werden, dass Ischämie/Reperfusionsschäden voranging durch gesteigerte Produktion von ROS in Reaktion auf ein reetabliertes Angebot von Sauerstoff an ischämisches Gewebe vermittelt werden [153, 165, 233]. Bezogen auf mögliche Adaptionen unter Anämieinduktion legen erhobene Ergebnisse in „*anämischen Mäusen*“ eine Steigerung der antioxidativen Verteidigung nahe, mit dem möglichen Potential, myokardiale Schäden vermittelt durch oxidativen Stress zu minimieren. In der Pathophysiologie des Ischämie/Reperfusionsschadens stehen einer gesteigerten Generierung von ROS erniedrigte Konzentrationen antioxidativ wirksamer Mechanismen in geschädigtem Gewebe gegenüber, welche nachteilige Effekte bestärken. Diese Stoffwechsellage begünstigt Wirken des oxidativen Stress, welcher endotheliale Dysfunktionen, DNA Schäden und ein lokale Immunantwort fördert und in Zelltod resultiert [153]. Der protektive Effekt durch mutmaßliche erhöhte antioxidative Verteidigung in „*anämischen Mäusen*“ könnte durch beschriebene signifikant bessere Erhaltungszustände in Reperfusion *ex vivo* und signifikant kleineren Infarkten von „*anämischen Mäusen*“ belegt werden. Dies lässt sich gleichgerichtet interpretieren wie Studienergebnisse, welche formulierten dass experimentelle Reduktion des reduzierten GSH oxidativen Stress verschärften [234].

Gleichgerichtet konnte in Studien beschrieben werden, dass Überexpression von Glutathion-Peroxidase, welche in hohen Konzentrationen im Herz nachgewiesen werden konnte [235], linksventrikuläres *Remodelling* und kardiale Beeinträchtigung nach Myokardinfarkt vorbeugt [236–238]. Die protektive Rolle der Glutathion-Peroxidasen, als Teil des Glutathionsystems mit forcierter antioxidativer Wirkung, konnte dabei als essentieller Mechanismus zum Erhalt kardialer Funktionen charakterisiert werden [236, 237, 239]. Erhöhte Glutathion-Reserven bei höheren Konzentrationen reduziertem GSH erlauben gleichgerichtete steigernde Funktionen



der Glutathion-Peroxidase zu formulieren und dieser im Rahmen der Anämie einen gesteigerten Effekt zuzuschreiben. Dies würde das etablierte Anämie-Modell mit einer Glutathion-Peroxidase Überfunktion assoziieren und die Einflussnahme günstiger Effekte erlauben. Glutathion-Peroxidase konnte im Zytosol und in Mitochondrien von Eukaryoten beschrieben werden [236]. Dazu sind Trainingseffekte unter Anämie zu diskutieren, welche bei gesteigerter Aktivität des aeroben Stoffwechsels mit einer Zunahme der Zahl und Größe von Mitochondrien beschrieben werden könnte [154, 155]. Eine Steigerung der Aktivität der Mitochondrien könnte mit einer Funktionssteigerung der Glutathion-Peroxidase verknüpft werden.

Über veränderte Funktion des antioxidativen Systems könnte auch hypothesiert werden, dass Anämieinduktion mit verhältnismäßiger Reduktion von ROS Produktion zu assoziieren sei. Dazu konnte in Studien beschrieben werden, dass alternierend niedrige und hohe Sauerstoffspannungen an kardialen Myozyten die Wahrscheinlichkeit von durch Oxidantien vermittelte Schäden erhöht [240]. Durch die potentiell in „*anämischen Mäusen*“ geringer ausfallende Sprünge in Sauerstoffversorgungslagen könnte eine geringere oxidative Belastung entstehen, welche sich in reduziertem oxidativem Stress darstelle. Eine günstigere Darstellung des Redoxstatus in „*anämischen Mäusen*“ könnte demnach auch als Ergebnis einer Stabilität des Sauerstoffangebotes an kardiale Myozyten, welche in Studien mit oxidativen Schäden assoziiert werden konnte, interpretiert werden.

Zur Komplementierung der Darstellung des Glutathionsystems in „*anämischen Mäusen*“ und „*Kontrollen*“ wurden die Entitäten „*Herz*“, „*Erythrozyten*“ und „*Plasma*“ zusätzlich 24 Stunden nach *in vivo* Lokalischämie analysiert. Dabei konnte beschrieben werden, dass mit einem Ischämie/Reperfusionereignis keine signifikante Veränderungen der Glutathion-Verfügbarkeiten in „*anämischen Mäusen*“ und „*Kontrollen*“ einhergingen. Mögliche Interpretationen der oxidativen Belastung im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionereignisses erlauben auf „*anämische Mäuse*“ und „*Kontrollen*“ *in vivo* vergleichbare Effekte anzunehmen. In Interpretation und unter Assoziation von oxidativem Stress und Ischämie/Reperfusionsschäden würde diese vergleichbare Belastung der antioxidativen Kompetenz im Falle einer isoliert betrachteten Kausalität gegen ein nachteiliges *Outcome* anämischer Patienten argumentieren.

Zusammenfassend erlaubt die Darstellungen des Glutathionsystems in Anämie diese mit erhöhten antioxidativen Reserven zu assoziieren, welchen das Potential zugeschrieben werden könnte, Schäden im Rahmen des Ischämie/Reperfusionereignisses zu minimieren. Dies kann durch Ergebnisse aus dem *ex vivo* Modell nach Langendorff bekräftigt werden.

## 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen von *in vivo* und *ex vivo* Studien konnten pathophysiologisch geprägte Adaptionen einer akuten Anämie an Versuchstierherzen aufgezeigt werden, welche erlauben veränderte kardiale Funktion und Integrität anzunehmen. Dabei scheint die aus klinischen Beobachtungen abgeleitete Arbeitshypothese, eine isoliert bestehende Anämie führe zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion nach Myokardinfarkt vermittelt durch oxidativen Stress, durch die durchgeführten Versuche nicht beständig zu sein. Im Gegenteil muss in der Gesamtschau aller erhobenen Ergebnisse eine Alternativhypothese, welche eine isoliert bestehende Anämie mit protektiven Effekten in Bezug auf einen Myokardinfarkt assoziiert, angenommen werden.

Akute Anämien konnten mit einer Hyperdynamisierung des Herzkreislaufsystems, verändertem Ansprechverhalten auf kardiovaskulärwirksame Substanzen, stärkerer Limitierung in *ex vivo* Lokalischämie bei besserer Erholung in Reperfusion, Ausbildung kleinerer Myokardinfarkte und höheren antioxidativen Kompetenzen assoziiert werden. In diesen Anpassungen konnten Hinweise auf vermittelnde Mechanismen formuliert werden, welche folgend zu einem erweiterten Verständnis der Interaktion von Anämie und Myokardinfarkt beitragen werden.

Dabei scheint eine Translation in klinische Umstände stark limitiert. Im Rahmen der tierexperimentellen *ex vivo* Studien konnten Adaptionen in zuvor Anämie unterworfenen Versuchstierherzen abgebildet werden, welche als isolierte Entität Versuchsprotokollen unterworfen wurden. Dies begrenzt Vergleiche zu *in vivo* erhobenen Ergebnissen, welche Versuchstiere bzw. Patientenkollektive unter anämischen Bedingungen untersucht haben.

Eine akute Anämie konnte mit notwendigen Hyperdynamisierungen des Herzkreislaufsystems assoziiert werden, durch welche pathophysiologisch bedingte Limitierungen des Hb-Wertes basal als hinreichend kompensiert angenommen werden konnten. Einhergehend mit gesteigerter Belastung und forcierten Leistungsforderungen sind abhängige Adaptionen aufzufassen, welche die Physiologie des Versuchstieres nachhaltig modifizierten. Diese zeichneten sich durch eine höhere Leistungsbefähigung aus, unterwarfen das anämische Herz scheinbar aber auch höheren Vulnerabilitäten. Unter durch Anämie gebildeten pathophysiologischen Leistungsforderungen eintretende Lokalischämien scheinen dabei eine gesteigerte Beeinträchtigung zu erzeugen. Die in klinischen Studien formulierte Assoziation von Anämie und nachteiligem *Outcome* nach akutem Myokardinfarkt konnte in den durchgeführten *ex vivo* Studien nicht bekräftigt werden. Hypothetisch ist eine *in vivo* fortbestehende Leistungsforderungen und davon ausgehende Mehrbelastung des Herzens unter Ischämie als relevante *Causa* zu interpretieren. Dies könnte während Ischämie das Versagen von Kompensations-

faktoren induzieren und systemische Hypoxie verschulden. Entstehende Limitierung des Leistungspotential durch einen Ischämie/Reperfusionsschaden könnten hinreichende Kompensation zukünftig begrenzen. Mutmaßlich könnte interpretiert werden, dass nicht Effekte der isoliert bestehenden Anämie während des Infarktgeschehens nachteiliges *Outcome* vermitteln, sondern viel mehr in Folge einer konsekutiven Leistungslimitierung nach Infarkt dieses begünstigt wird.

In Interpretation der Ergebnisse im klinischen Kontext wäre eine Bemühung kardiale Belastung durch Korrektur von signifikanten und manifesten Hb-Konzentration zu reduzieren auch noch nach angelaufener Pathologie des Infarktes empfehlenswert. Mit Reduktion der Mehrbelastung durch anämische Zustände und konsekutiver Normalisierung des kardialen Wirkungsgrades könnte nachteiligem *Outcome* entgegengewirkt werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- 1 Cappellini MD, Motta I (2015): Anemia in Clinical Practice-Definition and Classification: Does Hemoglobin Change With Aging? *Seminars in Hematology*; DOI: 10.1053/j.seminhematol.2015.07.006
- 2 McLean E et al. (2009): Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr*; DOI: 10.1017/S1368980008002401
- 3 Culleton B et al. (2006): Impact of anemia on hospitalization and mortality in older adults. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2005-10-4308
- 4 Denny SD et al. (2006): Impact of anemia on mortality, cognition, and function in community-dwelling elderly. *Am J Med*; DOI: 10.1016/j.amjmed.2005.08.027
- 5 Patel KV et al. (2007): Racial variation in the relationship of anemia with mortality and mobility disability among older adults. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2006-10-055384
- 6 WHO Scientific Group on Nutritional Anaemias & World Health Organization (1968): Nutritional anaemias: report of a WHO scientific group. *World Health Organ Tech Rep*; (405): 5–37
- 7 Herold G et al. (2015): *Innere Medizin 2015*. Köln: Gerd Herold
- 8 Kuhn V et al. (2017): Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxidants & Redox Signaling*; DOI: 10.1089/ars.2016.6954
- 9 Alder L, Tambe A. (2020): *Acute Anemia*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- 10 Greten H et al. (2010): Akute und chronische Blutungsanämien. *Innere Medizin*; DOI: 10.1055/b-0034-86195
- 11 Guralnik JM et al. (2004): Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2004-05-1812
- 12 Patel KV (2008): Epidemiology of anemia in older adults. *Seminars in Hematology*; DOI: 10.1053/j.seminhematol.2008.06.006
- 13 Ferrucci L et al. (2007): Unexplained anaemia in older persons is characterised by low erythropoietin and low levels of pro-inflammatory markers. *Br J Haematol*; DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06502.x
- 14 Salive ME et al. (1992): Anemia and hemoglobin levels in older persons: Relationship with age, gender, and health status. *J Am Geriatr Soc*; DOI: 10.1111/j.1532-5415.1992.tb02017.x.
- 15 Skjelbakken T et al. (2005): Haemoglobin and anaemia in a gender perspective: The Tromsø Study. *Eur J Haematol*; DOI: 10.1111/j.1600-0609.2004.00392.x
- 16 Nissenson AR et al. (2005): Economic burden of anemia in an insured population. *J Manag Care Pharm*; DOI: 10.18553/jmcp.2005.11.7.565
- 17 Robinson B et al. (2007): Prevalence of anemia in the nursing home: Contribution of chronic kidney disease. *J Am Geriatr Soc*; DOI: 10.1111/j.1532-5415.2007.01389.x
- 18 Artz AS et al. (2004): Prevalence of anemia in skilled-nursing home residents. *Arch Gerontol Geriatr*; DOI: 10.1016/j.archger.2004.03.006
- 19 United Nations Department of Economic and Social Affairs (2007): Population Division: *World Population Prospects. The 2006 Revision*. New York: United Nations
- 20 Zakai NA et al. (2005): A prospective study of anemia status, hemoglobin concentration, and mortality in an elderly cohort: The Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med*; DOI: 10.1001/archinte.165.19.2214

- 21 Zander R (2002): Kompensationsmechanismen der perioperativen Anämie. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*; (37):752–755
- 22 Varat MA et al. (1972): Cardiovascular effects of anemia. *American Heart Journal*; DOI: 10.1016/0002-8703(72)90445-0
- 23 Bishop JM et al. (1955): Circulatory dynamics at rest and on exercise in the hyperkinetic states. *Clin Sci*; 14(2):329–360
- 24 Leight L et al. (1954): Hemodynamic Studies in Sickle Cell Anemia. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.10.5.653
- 25 Bhatia ML et al. (1969): Coronary haemodynamic studies in chronic severe anaemia. *Br Heart J*; 31(3):365–374
- 26 Zander R (1996): Sauerstoff-Versorgung und Säure-Basen-Status bei extremer Anämie. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*; (31):492–494
- 27 Glick G et al. (1964): Role of the autonomic nervous system in the circulatory response to acutely induced anemia in unanesthetized dogs. *J Clin Invest*; DOI: 10.1172/JCI105085
- 28 Hatcher JD et al. (1978): Anemia as a stimulus to aortic and carotid chemoreceptors in the cat. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*; DOI: 10.1152/jappl.1978.44.5.696
- 29 Spahn DR et al. (1994): Cardiovascular and coronary physiology of acute isovolemic hemodilution: a review of nonoxygen-carrying and oxygen-carrying solutions. *Anesth Analg*; DOI: 10.1152/jappl.1978.44.5.696
- 30 Balasubramanian V et al (2019): Myocardial oxygen balance during acute normovolemic hemodilution: A novel compartmental modeling approach. *Comput Biol Med*; DOI: 10.1016/j.compbiomed.2018.12.009
- 31 Di Lullo L et al. (2015): Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients: From Pathophysiology to Treatment. *Cardiorenal Med*; DOI: 10.1159/000435838
- 32 Rodman T et al. (1959): The oxyhemoglobin dissociation curve in the common hemoglobinopathies. *Am J Med*; DOI: 10.1016/0002-9343(59)90041-5
- 33 Welte M (2009): Erythrozytentransfusion. *Anaesthesist*; DOI: 10.1007/s00101-009-1621-1
- 34 Camaschella C (2015): Iron-Deficiency Anemia. *N Engl J Med*; DOI: 10.1056/NEJ-Mra1401038
- 35 Jin X et al. (2019): Outcomes of patients with anemia and renal dysfunction in hospitalized heart failure with preserved ejection fraction (from the CN-HF registry). *Int J Cardiol Heart Vasc*; DOI: 10.1016/j.ijcha.2019.100415
- 36 Randi ML et al. (2020): Prevalence and Causes of Anemia in Hospitalized Patients: Impact on Diseases Outcome. *J Clin Med*; DOI: 10.3390/jcm9040950
- 37 Welte M et al. (2014): Klinisch-orientierte Transfusion von Erythrozytenkonzentraten – Wann sind sie indiziert? *Klinikarzt*; DOI: 10.1055/s-0034-1370756
- 38 Carson JL et al. (2012): Red blood cell transfusion: a clinical practice guideline from the AABB\*. *Ann Intern Med*; DOI: 10.7326/0003-4819-157-1-201206190-00429
- 39 Thygesen K et al. (2012): Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*; DOI: 10.1093/eurheartj/ehs184
- 40 Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. (2015): Deutscher Herzbericht 2015
- 41 Bugiardini R et al. (2006): Unanswered questions for management of acute coronary syndrome: Risk stratification of patients with minimal disease or normal findings on coronary angiography. *Arch Intern Med*; DOI: 10.1001/archinte.166.13.1391

- 42 Planer D et al. (2014): Prognosis of patients with non-ST-segment-elevation myocardial infarction and nonobstructive coronary artery disease: Propensity-matched analysis from the Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy trial. *Circ Cardiovasc Interv*; DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.113.000606
- 43 Gehrie ER et al. (2009): Characterization and outcomes of women and men with non-ST-segment elevation myocardial infarction and nonobstructive coronary artery disease: Results from the Can Rapid Risk Stratification of Unstable Angina Patients Suppress Adverse Outcomes with Early Implementation of the ACC/AHA Guidelines (CRUSADE) quality improvement initiative. *American Heart Journal*; DOI: 10.1016/j.ahj.2009.08.004
- 44 Reimer KA, Ideker RE (1987): Myocardial ischemia and infarction: Anatomic and biochemical substrates for ischemic cell death and ventricular arrhythmias. *Human Pathology*; DOI: 10.1016/S0046-8177(87)80031-X
- 45 Buja LM et al. (1988): Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury. *Cell Calcium*; DOI: 10.1016/0143-4160(88)90002-4
- 46 Thandroyen FT et al. (1992): Subcellular electrolyte alterations during progressive hypoxia and following reoxygenation in isolated neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.71.1.106
- 47 Buja LM (1988): Modulation of the myocardial response to ischemia. *Lab Invest*; 78 (11): 1345–1373
- 48 Nadal-Ginard B (2003): Myocyte Death, Growth, and Regeneration in Cardiac Hypertrophy and Failure. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.0000053618.86362.DF
- 49 Majno G, Joris I (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*; 146(1):3–15
- 50 Matsumura K et al. (1998): Progression of Myocardial Necrosis During Reperfusion of Ischemic Myocardium. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.97.8.795
- 51 Yellon DM, Hausenloy DJ (2007): Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med*; DOI: 10.1056/NEJMra071667
- 52 Skyschally A et al. (2008): Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Herz*; DOI: 10.1007/s00059-008-3101-9
- 53 MIAMED GmbH (2020): Diagnostik und Therapie bei akutem Koronarsyndrom: Darstellung gemäß der Leitlinien der DKG und ESC (STEMI 2017/NSTEMI 2015). Berlin/Köln: AMBOSS GmbH
- 54 Chesebro JH et al. (1987): Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. Clinical findings through hospital discharge. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.76.1.142
- 55 Aronson D et al. (2007): Changes in haemoglobin levels during hospital course and long-term outcome after acute myocardial infarction: A shift in the paradigm. *Eur Heart J*; DOI: 10.1093/eurheartj/ehm013
- 56 Spence RK (2010): The economic burden of anemia in heart failure. *Heart Fail Clin*; DOI: 10.1016/j.hfc.2010.02.003
- 57 Wen-Chih Wu et al. (2001): Blood transfusion in elderly patients with acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*; DOI: 10.1056/NEJMoa010615
- 58 Lorente V et al. (2020): Anemia in patients with high-risk acute coronary syndromes admitted to Intensive Cardiac Care Units. *J Geriatr Cardiol*; DOI: 10.11909/j.issn.1671-5411.2020.01.006
- 59 Sabatine MS et al. (2005): Association of hemoglobin levels with clinical outcomes in acute coronary syndromes. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.0000162477.70955.5F
- 60 Falluji NA et al. (2002): Effect of anemia on 1-year mortality in patients with acute myocardial infarction. *American Heart Journal*; DOI: 10.1067/mhj.2002.124351

- 61 Ohana-Sarna-Cahan L, Atar S (2017): Clinical outcomes of patients with acute coronary syndrome and moderate or severe chronic anaemia undergoing coronary angiography or intervention. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*; DOI: 10.1177/2048872617707959
- 62 Lawler PR et al. (2013): Anemia and mortality in acute coronary syndromes: A systematic review and meta-analysis. *American Heart Journal*; DOI: 10.1016/j.ahj.2012.10.024
- 63 Salisbury AC et al. (2010): Incidence, correlates, and outcomes of acute, hospital-acquired anemia in patients with acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*; DOI: 10.1161/CIRCOUTCOMES.110.957050
- 64 Bauer M (2003): "Early goal-directed therapy" der Sepsis. *Anaesthesist*; DOI: 10.1007/s00101-003-0589-5
- 65 Levy PS et al. (1996): Acute dilutional anemia and critical left anterior descending coronary artery stenosis impairs end organ oxygen delivery. *J Trauma* 1996; 41 (3): 416–423
- 66 Most AS et al. (1986): Effect of a reduction in blood viscosity on maximal myocardial oxygen delivery distal to a moderate coronary stenosis. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.74.5.1085
- 67 Rousseau M et al. (2010): Relation between hemoglobin level and recurrent myocardial ischemia in acute coronary syndromes detected by continuous electrocardiographic monitoring. *The American Journal of Cardiology*; DOI: 10.1016/j.amjcard.2010.07.009
- 68 Weiskopf RB (1998): Human Cardiovascular and Metabolic Response to Acute, Severe Isovolemic Anemia. *JAMA*; DOI: 10.1001/jama.279.3.217
- 69 Levy PS et al. (1993): Limit to cardiac compensation during acute isovolemic hemodilution: Influence of coronary stenosis. *Am J Physiol*; DOI: 10.1152/ajpheart.1993.265.1.H340
- 70 Kaiafa G et al. (2015): Is anemia a new cardiovascular risk factor? *International Journal of Cardiology*; DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.03.159
- 71 Hu H et al. (2010): Effects of anemia and blood transfusion in acute myocardial infarction in rats. *Transfusion*; DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02385.x
- 72 Levin A et al. (1996): Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: Identifying opportunities for intervention. *American Journal of Kidney Diseases*; DOI: 10.1016/S0272-6386(96)90357-1
- 73 Werdehoff SG et al. (1998): Elevated plasma endothelin-1 levels in sickle cell anemia: Relationships to oxygen saturation and left ventricular hypertrophy. *Am. J. Hematol.*; DOI: 10.1002/(SICI)1096-8652(199807)58:3<195::AID-AJH6>3.0.CO;2-M
- 74 Pereira AA, Sarnak MJ (2003): Anemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Kidney International*; DOI: 10.1046/j.1523-1755.64.s87.6.x
- 75 Dauerman HL et al. (2005): Bleeding complications in patients with anemia and acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*; DOI: 10.1016/j.amjcard.2005.06.088
- 76 Isler M et al. (2002): Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Erythrocytes of Patients with Iron Deficiency Anemia: Effects of Different Treatment Modalities. *Croatian Medical Journal* 2002; (43):16–19
- 77 Kinugawa S et al. (2000): Treatment With Dimethylthiourea Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Experimental Myocardial Infarction in Mice: Role of Oxidative Stress. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.87.5.392
- 78 Lipsic E et al. (2005): Hemoglobin levels and 30-day mortality in patients after myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*; DOI: 10.1016/j.ijcard.2004.10.043
- 79 Kanic V et al. (2019): Age-Specific Sex-Based Differences in Anemia in Patients with Myocardial Infarction. *J Womens Health (Larchmt)*; DOI: 10.1089/jwh.2018.7211

- 80 Moghaddam N et al. (2018): Association of Anemia With Outcomes Among ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Patients Receiving Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Circ Cardiovasc Interv*; DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.118.007175.
- 81 Chiwhane A et al. (2020): Incremental Prognostic Value of Anemia in Acute Coronary Syndrome from A Rural Hospital in India. *gh*; DOI: 10.5334/gh.527
- 82 Goodnough LT, Schrier SL (2014): Evaluation and management of anemia in the elderly. *Am. J. Hematol.*; DOI: 10.1002/ajh.23598.
- 83 Meybohm P et al. (2019): Liberal transfusion strategy to prevent mortality and anaemia-associated, ischaemic events in elderly non-cardiac surgical patients - the study design of the LIBERAL-Trial. *Trials*; DOI: 10.1186/s13063-019-3200-3
- 84 Europäische Union (2010): Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere
- 85 Dülsner A et al. (2017): Fachinformation aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte und dem Arbeitskreis 4 in der TVT - Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. GV-SOLAS Gesellschaft für Versuchstierkunde
- 86 Wolfensohn S, Lloyd M (2003): *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd
- 87 Alef M, Pfeifer S (2010): Inhalationsnarkose mit Isofluran oder Sevofluran – Wie lässt sich das Risiko von Nebenwirkungen reduzieren? *kleintier konkret*; DOI: 10.1055/s-0030-1248856
- 88 Hobbhahn J et al (1985): Effekte von Isofluran und Enfluran auf Durchblutung und Sauerstoffversorgung des Myokards bei Hunden. *Aktueller Stand der klinischen Anaesthesie*; DOI: 10.1007/978-3-642-71229-6\_5
- 89 Horn EP (2002): Perioperative Hypothermie: Pathophysiologie, Prophylaxe und Therapie. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*; DOI: 10.1055/s-2002-32703
- 90 Bell RM et al. (2011): Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*; DOI: 10.1016/j.jmcc.2011.02.018
- 91 Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch.*; DOI: 10.1007/BF01812150
- 92 Hugo Sachs Elektronik (2000): Bedienungsanleitung zur Apparatur isoliertes Herz, Größe 1 (Mauserherz), Modell IH-1, Typ 844
- 93 Bailey LE, Ong SD (1978): Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. *Journal of Pharmacological Methods*; DOI: 10.1016/0160-5402(78)90022-0
- 94 Krebs HA, Henseleit K (1932): Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*; DOI: 10.1515/bchm2.1932.210.1-2.33
- 95 Banner NR et al. (2008): The importance of cold and warm cardiac ischemia for survival after heart transplantation. *Transplantation*; DOI: 10.1097/TP.0b013e31818149b9
- 96 Elliott DF et al. (1960): Actions of pure bradykinin. *J Physiol*; 10.1113/jphysiol.1960.sp006548
- 97 Tshöpe C et al. (1997): Antihypertensive and Cardioprotective Effects After Angiotensin-converting Enzyme Inhibition: Role of Kinins. *Journal of Cardiac Failure*; DOI: 10.1016/s1071-9164(97)90047-6
- 98 Heeg E, Meng K (1965): Die Wirkung des Bradykinins, Angiotensins und Vasopressins auf Vorhof, Papillarmuskel und isoliert durchströmte Herzpräparate des Meerschweinchens. *Naunyn - Schmiedebergs Arch*; DOI: 10.1007/BF00246880



- 99** Décarie A et al. (1996): Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: Influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 1996; DOI: 10.1152/ajpheart.1996.271.4.H1340
- 100** Regoli D (1983): Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Adv Exp Med Biol*; (156):569-84.
- 101** Phagoo SB et al. (1999): Autoregulation of Bradykinin Receptors: Agonists in the Presence of Interleukin-1 $\beta$  Shift the Repertoire of Receptor Subtypes from B2 to B1 in Human Lung Fibroblasts. *Molecular Pharmacology*; DOI: 10.1124/mol.56.2.325
- 102** Sabourin T et al. (2002): Agonist-Induced Translocation of the Kinin B1 Receptor to Caveolae-Related Rafts. *Molecular Pharmacology*; DOI: 10.1124/mol.61.3.546
- 103** Nolly H (1994): A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts. *Hypertension*; DOI: 10.1161/01.HYP.23.6.919
- 104** Ribeiro JA et al. (2002): Adenosine receptors in the nervous system: Pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology*; DOI: 10.1016/S0301-0082(02)00155-7
- 105** Berne RM et al. (1974): Release of Adenosine from Ischemic Brain: Effect on Cerebral Vascular Resistance and Incorporation into Cerebral Adenine Nucleotides. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.35.2.262
- 106** Monteiro EC, Ribeiro JA (1987): Ventilatory effects of adenosine mediated by carotid body chemoreceptors in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; DOI: 10.1007/BF00177715
- 107** Rubio R et al. (1973): Sites of adenosine production in cardiac and skeletal muscle. *American Journal of Physiology*; DOI: 10.1152/ajplegacy.1973.225.4.938
- 108** Oßwald H (1975): Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline in dogs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*; DOI: 10.1007/BF00501815
- 109** Pell TJ et al. (1998): Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*; DOI: 10.1152/ajpheart.1998.275.5.H1542
- 110** Drury AN (1929): The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*; DOI: 10.1113/jphysiol.1929.sp002608
- 111** Wolf MM, Berne RM (1956): Coronary Vasodilator Properties of Purine and Pyrimidine Derivatives. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.4.3.343
- 112** Jacob RB (1960): Metabolism of purine derivatives by the isolated cat heart. *J Physiol*; DOI: 10.1152/ajplegacy.1960.198.2.322
- 113** Berne RM (1963): Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol* 1963; DOI: 10.1152/ajplegacy.1963.204.2.317
- 114** Belardinelli L et al. (1998): The A2A Adenosine Receptor Mediates Coronary Vasodilation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284(3):1066-1073
- 115** Shryock JC et al. (1998): A2A-Adenosine Receptor Reserve for Coronary Vasodilation. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.98.7.711
- 116** Rubino A et al. (1995): Contribution of P1-(A2b subtype) and P2-purinoreceptors to the control of vascular tone in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol*; DOI: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb14981.x
- 117** Szentmiklosi AJ et al. (1995): Adenosine receptors mediate both contractile and relaxant effects of adenosine in main pulmonary artery of guinea pigs. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; DOI: 10.1007/BF00169083
- 118** Armstrong S, Ganote CE (1994): Adenosine receptor specificity in preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: Evidence of A3 receptor involvement. *Cardiovascular Research*; DOI: 10.1093/cvr/28.7.1049

- 119** Hirche H (1966): Die Wirkung von Isoproterenol, Adrenalin, Noradrenalin und Adenosin auf die Durchblutung und den O<sub>2</sub>-Verbrauch des Herzmuskels vor und nach der Blockierung der  $\beta$ -Rezeptoren. *Pflügers Archiv*; DOI: 10.1007/BF00362566
- 120** Brodde OE, Michel MC (1999): Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev*; 51(4):651-690
- 121** Dunlop D, Shanks RG (1968): Selective blockade of adrenoceptive beta-receptors in the heart. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*; DOI: 10.1111/j.1476-5381.1968.tb00444.x
- 122** Åblad B et al. (1973): Pharmacological studies of two new cardioselective adrenergic beta-receptor antagonists. *Life Sciences*; DOI: 10.1016/0024-3205(73)90368-8
- 123** Kukovetz WR, Pch G (1967): Beta-adrenerge Effekte und ihr zeitlicher Verlauf unter Tetrahydropapaverolin und Isoprenalin am Langendorff-Herzen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. u. Exp. Path.*; DOI: 10.1007/BF00536390
- 124** Kaumann AJ et al. (1989): A comparison of the effects of adrenaline and noradrenaline on human heart: the role of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the stimulation of adenylate cyclase and contractile force. *Eur Heart J*; DOI: 10.1093/eurheartj/10.suppl\_b.29.
- 125** Popp A et al. (2009): Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0004764
- 126** Lindsey ML et al. (2018): Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; DOI: 10.1152/ajpheart.00335.2017
- 127** Hebert PC et al. (1997): Review of physiologic mechanisms in response to anemia. *CMAJ*; 156(11):27-40
- 128** Escobar E et al. (1966): Ventricular performance in acute normovolemic anemia and effects of beta blockade. *Am J Physiol*; DOI: 10.1152/ajplegacy.1966.211.4.877
- 129** Murray JF et al. (1962): Systemic oxygen transport in induced normovolemic anemia and polycythemia. *Am J Physiol*; DOI: 10.1152/ajplegacy.1962.203.4.720
- 130** Welch HG et al. (1992): Prudent strategies for elective red blood cell transfusion. *Ann Intern Med*; DOI: 10.7326/0003-4819-116-5-393
- 131** Chapler CK, Cain SM (1986): The physiologic reserve in oxygen carrying capacity: studies in experimental hemodilution. *Can J Physiol Pharmacol*; DOI: 10.1139/y86-002
- 132** Constantinides C (2011): Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse. *ILAR J*; 52(3):21-31
- 133** Murray JF, Rapaport E (1972): Coronary blood flow and myocardial metabolism in acute experimental anaemia. *Cardiovascular Research*; DOI: 10.1093/cvr/6.4.360
- 134** Paulus WJ et al. (1995): Paracrine Coronary Endothelial Control of Left Ventricular Function in Humans. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.92.8.2119
- 135** Smith JA et al. (1991): Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J Physiol (Lond )*; DOI: 10.1113/jphysiol.1991.sp018653
- 136** McClellan G et al. (1994): Endothelial cell storage and release of endothelin as a cardio-regulatory mechanism. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.75.1.85
- 137** Winegrad S et al. (1999): Self-protection by cardiac myocytes against hypoxia and hyperoxia. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.85.8.690
- 138** Schulz R et al. (1992): Induction and potential biological relevance of a Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol*; DOI: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb09021.x
- 139** Balligand JL et al. (1995): Nitric Oxide-dependent Parasympathetic Signaling Is Due to Activation of Constitutive Endothelial (Type III) Nitric Oxide Synthase in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.*; DOI: 10.1074/jbc.270.24.14582

- 140** Song CZ et al. (2013): Erythrocyte-based analgesic peptides. *Regul Pept*; DOI: 10.1016/j.regpep.2012.11.003
- 141** Cortese-Krott MM et al. (2012): Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2012-07-442277
- 142** Kleinbongard P et al. (2005): Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2005-10-3992
- 143** Helms C, Kim-Shapiro DB (2013): Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radic Biol Med*; DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.028
- 144** Eligini S et al. (2013): Nitric oxide synthetic pathway in red blood cells is impaired in coronary artery disease. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0066945
- 145** Sobierajski J et al. (2013): Neue Strategien in der Kardioprotektion beim akuten Myokardinfarkt: Bedeutung des hypoxischen Nitrat-Nitrit-NO-Stoffwechsels. *Dtsch Med Wochenschr*; DOI: 10.1055/s-0032-1333009
- 146** Bryan NS et al. (2007): Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.0706579104
- 147** Totzeck M et al. (2012): Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation. *Circulation*; DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087155
- 148** Rassaf T et al. (2007): Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.152488
- 149** Lüscher TF et al. (1997): Endotheliale Dysfunktion und Stickstoffmonoxid (NO; Nitric Oxide). *Der Internist*; DOI: 10.1007/s001080050052
- 150** Huo Y, Kassab GS (2009): Effect of compliance and hematocrit on wall shear stress in a model of the entire coronary arterial tree. *J Appl Physiol*; DOI: 10.1152/jappphysiol.91013.2008
- 151** Griendling KK, FitzGerald GA (2003): Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB
- 152** Phillips L et al. (2009): Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg*; DOI: 10.1080/08941930802709470
- 153** Wu MY et al. (2018): Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*; DOI: 10.1159/000489241
- 154** Mayhew TP et al. (1995): Muscular adaptation to concentric and eccentric exercise at equal power levels. *Med Sci Sports Exerc*; 27(6):868-73
- 155** Dickhuth HH et al. (2004): Ausdauersport und kardiale Adaptation (Sporthertz). *Herz*; DOI: 10.1007/s00059-004-2582-4
- 156** Salie R et al. (2019): Cardioprotective Effects of Beta3-Adrenergic Receptor ( $\beta$ 3-AR) Pre-, Per-, and Post-treatment in Ischemia-Reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther*; DOI: 10.1007/s10557-019-06861-5
- 157** Ferrera R et al. (2009): One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther*; DOI: 10.1007/s10557-009-6176-5
- 158** Schwarz ER et al. (2000): What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat? *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*; DOI: 10.1023/A:1018770711705
- 159** Yoshikawa H et al. (1973): Effect of acute anemia on experimental myocardial ischemia. *The American Journal of Cardiology*; DOI: 10.1016/S0002-9149(73)80061-X

- 160** Saltin B, Astrand PO (1967): Maximal oxygen uptake in athletes. *J Appl Physiol*; DOI: 10.1152/jappl.1967.23.3.353
- 161** Wilkerson DK et al. (1988) Limits of cardiac compensation in anemic baboons. *Surgery*; 103(6):665–670
- 162** Jan KM, Chien S. (1977): Effect of hematocrit variations on coronary hemodynamics and oxygen utilization. *Am J Physiol*; DOI: 10.1152/ajpheart.1977.233.1.H106
- 163** Spahn DR et al. (1993): Acute isovolemic hemodilution and blood transfusion. Effects on regional function and metabolism in myocardium with compromised coronary blood flow. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*; 10.1016/S0022-5223(19)34196-0
- 164** Geha AS (1976): Coronary and cardiovascular dynamics and oxygen availability during acute normovolemic anemia. *Surgery*; 80(1):47-53
- 165** Maxwell SRJ, Lip GYH (1997): Reperfusion injury: A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *International Journal of Cardiology*; DOI: 10.1016/S0167-5273(96)02854-9
- 166** Vaidya Y et al. (2020): Myocardial Stunning and Hibernation. *StatPearls*; Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- 167** Eitzman D et al. (1992): Clinical outcome of patients with advanced coronary artery disease after viability studies with positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*; DOI: 10.1016/0735-1097(92)90008-B
- 168** Dörge H et al. (1998): Pathophysiologie von Hibernation, Stunning und Ischemic Preconditioning. *Der Internist*; DOI: 10.1007/s001080050230
- 169** Heusch G. (1998): Hibernating myocardium. *Physiological Reviews*; DOI: 10.1152/physrev.1998.78.4.1055
- 170** Matsuzaki M et al. (1983): Sustained regional dysfunction produced by prolonged coronary stenosis: gradual recovery after reperfusion. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.68.1.170
- 171** Guth BD et al. (1993): Time course and mechanisms of contractile dysfunction during acute myocardial ischemia. *Circulation*; 87(5 Suppl):IV35-42.
- 172** Schulz R et al. (1992): Recruitment of an inotropic reserve in moderately ischemic myocardium at the expense of metabolic recovery. A model of short-term hibernation. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.70.6.1282
- 173** Förstermann U, Sessa WC (2012): Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*; DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304
- 174** Kubes P et al. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.88.11.4651
- 175** Kurose I et al. (1994): Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.74.3.376
- 176** Förstermann U et al. (1994): Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*; DOI: 10.1161/01.HYP.23.6.1121
- 177** Sharp BR et al. (2002): Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; DOI: 10.1152/ajpheart.00855.2001
- 178** Kanno S et al. (2000): Attenuation of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Superinduction of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.101.23.2742
- 179** Das DK et al. (1998): Coordinated Role of Vasoactive Intestinal Peptide and Nitric Oxide in Cardioprotection. *Annals NY Acad Sci*; DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb11190.x
- 180** Mizuno T et al. (1998): L-Arginine, a nitric oxide precursor, attenuates ischemia-reperfusion injury by inhibiting inositol-1,4,5-triphosphate. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*; DOI: 10.1016/S0022-5223(98)70376-9

- 181** Weyrich AS et al. (1992): The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.86.1.279
- 182** Ohmori H et al. (1998): Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation*; DOI: 10.1097/00007890-199809150-00005
- 183** Brady AJ et al. (1993): Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol*; DOI: 10.1152/ajpheart.1993.265.1.H176
- 184** Balligand JL et al. (1993): Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.90.1.347
- 185** Hendgen-Cotta UB et al. (2008): Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.0801336105
- 186** Shiva S et al. (2007): Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med*; DOI: 10.1084/jem.20070198
- 187** Webb A et al. (2004): Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.0402927101
- 188** Gonzalez FM et al. (2008): Nitrite anion provides potent cytoprotective and antiapoptotic effects as adjunctive therapy to reperfusion for acute myocardial infarction. *Circulation*; DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.748814
- 189** Xie L et al. (2019): In vivo gum arabic-coated tetrahydrobiopterin protects against myocardial ischemia reperfusion injury by preserving eNOS coupling. *Life Sciences*; DOI: 10.1016/j.lfs.2019.01.026
- 190** Ferdinandy P et al. (2000): Peroxynitrite Is a Major Contributor to Cytokine-Induced Myocardial Contractile Failure. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.87.3.241
- 191** Flögel U et al. (1999): Contribution of NO to ischemia-reperfusion injury in the saline-perfused heart: a study in endothelial NO synthase knockout mice. *J Mol Cell Cardiol*; DOI: 10.1006/jmcc.1998.0921
- 192** Ihnken K et al. (1995): Studies of hypoxemic/reoxygenation injury: Without aortic clamping. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*; DOI: 10.1016/S0022-5223(95)70003-X
- 193** Patel VC et al. (1993): Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun*; DOI: 10.1006/bbrc.1993.1809
- 194** Wang P, Zweier JL (1996): Measurement of Nitric Oxide and Peroxynitrite Generation in the Postischemic Heart. *J. Biol. Chem.*; DOI: 10.1074/jbc.271.46.29223
- 195** Barry WH (1991): Calcium and ischemic injury. *Trends in Cardiovascular Medicine*; DOI: 10.1016/1050-1738(91)90022-7
- 196** Kostic MM, Schrader J (1992): Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.70.1.208
- 197** Depre C et al. (1995): Protection Against Ischemic Injury by Nonvasoactive Concentrations of Nitric Oxide Synthase Inhibitors in the Perfused Rabbit Heart. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.92.7.1911
- 198** Naseem S et al. (1995): Sustain inhibition of nitric oxide by NG-nitro-L-arginine improves myocardial function following ischemia/reperfusion in isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*; DOI: 10.1016/S0022-2828(08)80038-7
- 199** Boisguerin P et al. (2011): Systemic delivery of BH4 anti-apoptotic peptide using CPPs prevents cardiac ischemia-reperfusion injuries in vivo. *J Control Release*; DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.037

- 200** Ono M et al. (2005): BH4 peptide derivative from Bcl-xL attenuates ischemia/reperfusion injury thorough anti-apoptotic mechanism in rat hearts. *Eur J Cardiothorac Surg*; DOI: 10.1016/j.ejcts.2004.09.025
- 201** Masano T et al. (2008): Beneficial Effects of Exogenous Tetrahydrobiopterin on Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Rats. *Circ J*; DOI: 10.1253/circj.CJ-08-0072
- 202** van der Meer P et al. (2004): Erythropoietin improves left ventricular function and coronary flow in an experimental model of ischemia-reperfusion injury. *Eur J Heart Fail*; DOI: 10.1016/j.ejheart.2004.03.012
- 203** Wright GL et al. (2004): Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*; DOI: 10.1096/fj.03-1289fje
- 204** Lipšic E et al. (2004): Timing of Erythropoietin Treatment for Cardioprotection in Ischemia/Reperfusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; DOI: 10.1097/01.fjc.0000140209.04675.c3
- 205** van der Meer P et al. (2005): Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*; DOI: 10.1016/j.jacc.2005.03.044
- 206** Chattopadhyay A et al. (2000): Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochemical Pharmacology*; DOI: 10.1016/S0006-2952(99)00277-4
- 207** Smith K (2003): The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovascular Research*; DOI: 10.1016/S0008-6363(03)00468-1
- 208** Ruschitzka FT et al. (2000): Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.97.21.11609
- 209** Sterin-Borda L et al. (2003): Erythropoietin improves cardiac contractility in post-hypoxic mice. *Br J Haematol*; DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04239.x
- 210** Tada H et al. (2006): Endogenous erythropoietin system in non-hematopoietic lineage cells plays a protective role in myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiovascular Research*; DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.05.010
- 211** Ott I et al. (2010): Erythropoietin in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized, double-blind trial. *Circ Cardiovasc Interv*; DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.109.904425
- 212** Voors AA et al. (2010): A single dose of erythropoietin in ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*; DOI: 10.1093/eurheartj/ehq304
- 213** Cleland JGF et al. (2009): Clinical trials update from the American College of Cardiology 2009: ADMIRE-HF, PRIMA, STICH, REVERSE, IRIS, partial ventricular support, FIX-HF-5, vagal stimulation, REVIVAL-3, pre-RELAX-AHF, ACTIVE-A, HF-ACTION, JUPITER, AURORA, and OMEGA. *Eur J Heart Fail*; DOI: 10.1093/eurjhf/hfp071
- 214** Najjar SS et al. (2011): Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial. *JAMA*; DOI: 10.1001/jama.2011.592
- 215** Krogh A (1919): The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation. *J Physiol (Lond)*; DOI: 10.1113/jphysiol.1919.sp001844
- 216** Anaya-Prado R et al. (2002): Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research*; DOI: 10.1006/jsre.2002.6385
- 217** Braunwald E, Kloner RA (1982): The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.66.6.1146

- 218** Bolli R (1990): Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.82.3.723
- 219** Fox KAA (1992): Reperfusion injury: laboratory phenomenon or clinical reality? *Cardiovascular Research*; DOI: 10.1093/cvr/26.7.656
- 220** Charlat MI et al. (1987): Evidence for a pathogenetic role of xanthine oxidase in the "stunned" myocardium. *Am J Physiol*; DOI: 10.1152/ajpheart.1987.252.3.H566
- 221** Westlin W, Mullane KM (1989): Alleviation of myocardial stunning by leukocyte and platelet depletion. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.80.6.1828
- 222** Engler R, Covell JW (1987): Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15-minute ischemia in the dog. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.61.1.20
- 223** Bolli R et al. (1989): Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.65.3.607
- 224** Bolli R (1988): Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol*; DOI: 10.1016/0735-1097(88)90381-6
- 225** Farber NE et al. (1988): Evidence for a role of iron-catalyzed oxidants in functional and metabolic stunning in the canine heart. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.63.2.351
- 226** Murry CE et al. (1986): Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.74.5.1124
- 227** Garlid KD et al. (1997): Cardioprotective Effect of Diazoxide and Its Interaction With Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels : Possible Mechanism of Cardioprotection. *Circulation Research*; DOI: 10.1161/01.RES.81.6.1072
- 228** Cai Z et al. (2003): Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.0000078635.89229.8A
- 229** Dhalla N (2000): Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research*; DOI: 10.1016/S0008-6363(00)00078-X
- 230** Jenkins D et al. (1995): Ischaemic preconditioning in a model of global ischaemia: Infarct size limitation, but no reduction of stunning. *J Mol Cell Cardiol*; DOI: 10.1016/S0022-2828(95)90590-1
- 231** Cimen MYB (2008): Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*; DOI: 10.1016/j.cca.2007.12.025
- 232** Biswal S et al. (2019): Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. *Hematology*; DOI: 10.1080/10245332.2018.1498441
- 233** Park JL, Lucchesi BR (1999): Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *The Annals of Thoracic Surgery*; DOI: 10.1016/S0003-4975(99)01073-5
- 234** Patterson CE, Rhoades RA (1988): Protective Role of Sulfhydryl Reagents in Oxidant Lung Injury. *Experimental Lung Research*; DOI: 10.3109/01902148809064189
- 235** Le CT et al. (1993): Buthionine sulfoximine reduces the protective capacity of myocytes to withstand peroxide-derived free radical attack. *J Mol Cell Cardiol*; DOI: 10.1006/jmcc.1993.1062
- 236** Shiomi T et al. (2004): Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*; DOI: 10.1161/01.CIR.0000109701.77059.E9

- 237** Toussaint O et al. (1993): Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity. *Toxicology*; DOI: 10.1016/0300-483X(93)90001-9
- 238** Hoshida S (1994): Ebselen protects against ischemia-reperfusion injury in a canine model of myocardial infarction. *Am J Physiol*; DOI: 10.1152/ajpheart.1994.267.6.H2342
- 239** Cohen G, Hochstein P (1963): Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. *Biochemistry*; DOI: 10.1021/bi00906a038
- 240** Abe J-i, Berk BC (1998): Reactive Oxygen Species as Mediators of Signal Transduction in Cardiovascular Disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*; DOI: 10.1016/S1050-1738(97)00133-3



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich fachlich aber auch emotional in der Erarbeitung und der Vollendung meines Promotionsvorhabens unterstützt haben und dessen Umsetzung ermöglicht haben.

Frau Prof. Dr. Dr. rer. nat. Miriam Cortese-Krott danke ich für die Möglichkeit unter Ihrer Betreuung das Promotionsvorhaben durchgeführt zu haben. Durch Ihre fachliche Unterstützung und vielfältigen Ideengebung, wurde mir ein kritischer Zugang zur Thematik eröffnet, welcher durch bereichernden und konstruktiven Austausch mich ermutigte und motivierte meine Arbeiten zu präzisieren und zu komplementieren.

Frau Dr. med. Viktoria Kuhn möchte ich für die herzliche Unterstützung und die Einführung ins Projekt danken. Ihre Vorversuche haben meine Experimente erst ermöglicht und in konstruktiver Zusammenarbeit war es möglich auch komplexere Untersuchungen durchzuführen. Desweiteren danke ich für die Durchsicht der Arbeit und die emotionale Unterstützung.

Herr Prof. Dr. med Kelm danke ich für die Möglichkeit, dass ich die Versuche im kardiovaskulären Labor durchführen durfte.

Mein großer Dank geht an Stefanie Becher, welche durch unerbittliche mühevollen Geduld und Verständnis mich in den praktischen Arbeiten anlernte und immer ein offenes Ohr für jede Art von Belangen hatte.

Dem Sonderforschungsbereich 1116 der deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für das umfassende Stipendium, welches finanziell aber vor allem interkulturell meine fachlichen Kompetenzen förderte und im Austausch neue Aspekte des wissenschaftlichen Arbeitens ermöglichte.

Der Arbeitsgruppe des kardiovaskulären Labor des Universitätsklinikums Düsseldorf danke ich für die freundliche Unterstützung und fachliche Expertise, mit welcher sie mich unterstützt hat.