

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

**Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die erythrozytäre  
Funktion im Ischämie/Reperfusionsschaden am murinen Ex vivo-  
Modell**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Johanna Nölle

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Teile diese Arbeit wurden veröffentlicht:

als Posterbeitrag:

**Johanna Nölle**, Johanna M. Müssig, M.D., Luise Möllhoff, Sema Kaya, Malte Kelm, M.D., Christian Jung, M.D., PhD., *Effect of cardiovascular risk factors on the erythrocrine function in the setting of ischemia-reperfusion injury in a Langendorff-based ex vivo assay*. April 2019, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

als Paper:

Johanna M. Muessig, Luise Moellhoff, **Johanna Noelle**, Sema Kaya, Leonie Hidalgo Pareja, Maryna Masyuk, Michael Roden, Malte Kelm, Christian Jung, *Poor glycemie control impairs the cardioprotective effects of red blood cells on myocardial ischemia/reperfusion injury, Nitric oxide*, 2020 Jan 22;97:1-10.

Johanna M. Muessig, MD, Sema Kaya, MD, Luise Moellhoff, **Johanna Noelle**, Leonie Hidalgo Pareja, Maryna Masyuk, MD, Norbert Gerdes, PhD, John Pernow, MD, PhD, Malte Kelm, MD, and Christian Jung, MD, PhD, *A Model of Blood Component–Heart Interaction in Cardiac Ischemia–Reperfusion Injury using a Langendorff-Based Ex Vivo Assay*, J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2020 Mar;25(2):164-173

## **Zusammenfassung**

**Einleitung:** Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Während eines Myokardinfarkts entsteht sowohl durch die Ischämie als auch durch die Reperfusion ein Myokardschaden (I/R-Schaden). Aktuelle Studien konnten zeigen, dass Erythrozyten einen protektiven Effekt auf die ventrikuläre Funktion und die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion (I/R) haben. Diabetes mellitus ist ein häufiger kardiovaskulärer Risikofaktor. Ergebnisse aktueller Studien zeigen einen negativen Einfluss des Diabetes und einer schlechten Langzeitglukoseeinstellung auf die protektive Funktion der Erythrozyten.

**Hypothese:** Unsere Hypothese ist, dass eine schlechte Langzeitglukoseeinstellung des Diabetes mellitus zu einer Verschlechterung der erythrozytären Funktion im I/R führt und der HbA1c-Wert der Probanden mit der Infarktgröße muriner Herzen in einem *ex-vivo* I/R Modell korreliert.

**Zielsetzung:** Das Ziel dieser Arbeit war es, weiter zu differenzieren, ob das Alter, das Vorliegen eines Diabetes mellitus und die Langzeitblutzuckereinstellung verantwortlich für die Verschlechterung der kardioprotektiven Funktion von Erythrozyten im kardialen I/R-Schaden ist und inwieweit sich der HbA1c-Wert auf das Ausmaß der Infarktgröße auswirkt.

**Methoden:** Die Koronararterien muriner Herzen wurden im Langendorff Perfusor mit Krebs-Henseleit Puffer (KHB) und humanen Erythrozyten verschiedener Probandengruppen zu Beginn einer 40-minütigen Globalischämie beladen. Dabei unterschieden sich die Probandengruppen in Alter, des Vorliegens eines Diabetes mellitus und der Einstellung des Diabetes. Nach 60 Minuten Reperfusion wurden der linksventrikuläre Druck und der koronare Fluss dokumentiert und nach 120 Minuten wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung ermittelt.

**Ergebnisse:** Erythrozyten der jungen, gesunden Probanden zeigten einen deutlichen kardioprotektiven Effekt mit Reduktion der Infarktgröße und verbesserter Erholung der linksventrikulären Funktion nach 60-minütiger Reperfusion im Vergleich zu KHB und zu den Erythrozyten der alten, schlecht eingestellten Diabetiker. Das Patientenalter zeigte hingegen keinen Einfluss auf die kardioprotektive Funktion der Erythrozyten gemessen an der Infarktgröße und der Erholung der LV-Funktion. Nach Zugabe von Erythrozyten alter Diabetiker mit einem HbA1c < 7,5% konnte kein Unterschied in der erythrozytären Funktion im Vergleich zu jungen, gesunden Probanden festgestellt werden. Dahingegen wurde die

kardioprotektive Funktion von Erythrozyten durch eine schlechte Langzeitglukoseeinstellung (HbA1c > 7,5%) aufgehoben.

**Zusammenfassung und Schlussfolgerung:** Unsere Studie zeigt, dass eine schlechte Einstellung des Diabetes mellitus ausschlaggebend für eine Verschlechterung der kardioprotektiven Funktion humaner Erythrozyten im kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden ist und der HbA1c-Wert der Probanden mit der Infarktgröße der murinen Herzen im *ex-vivo* Assay korreliert. Dahingegen ist die erythrozytäre kardioprotektive Funktion im Alter und bei einem gut eingestellten Diabetes genauso gut, wie bei jungen, gesunden Probanden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz der guten Einstellung eines Diabetes mellitus und sind Grundlage für zukünftige Studien, die den dahinterstehenden Pathomechanismus näher untersuchen.

## **Abstract**

**Introduction:** Cardiovascular diseases are among the leading causes of death worldwide. During a myocardial infarction, both ischemia and reperfusion result in myocardial damage (called I/R injury). Current studies have shown that red blood cells (RBC) have a protective effect on the ventricular function and the infarct size during I/R. Diabetes mellitus is a common cardiovascular risk factor. The results of current studies show a negative influence of diabetes and a poor long-term blood glucose control on the protective function of RBC.

**Hypothesis:** The hypothesis is that a poor long-term glucose control in patients with diabetes mellitus is the reason for a deterioration in erythrocyte function in I/R and that the HbA1c value of the subjects correlates with the infarct size of the murine hearts.

**Objective:** The aim was to further investigate whether the age, the presence of diabetes mellitus or the long-term blood glucose control are responsible for the deterioration of the cardioprotective function of RBC in I/R injury and to what extent the HbA1c value of subjects increases the infarct size of the murine hearts.

**Methods:** The coronary system of isolated murine hearts in a Langendorff system were loaded with Krebs- Henseleit buffer (KHB) and human RBC from various test groups before 40 minutes of global ischemia. The groups of subjects differed in terms of age, the presence of diabetes mellitus and the blood glucose control. After 60 minutes of reperfusion the left ventricular pressure and the coronary flow were documented and after 120 minutes the infarct size was determined by TTC staining.

**Results:** RBC of young, healthy subjects showed a cardioprotective effect with a reduction of the infarct size and an improved recovery of the left ventricular (LV) function after 60 minutes of reperfusion compared to KHB and RBC of old patients with diabetes mellitus and a poor glycemic control. The patients age showed no influence on the cardioprotective function of RBC as measured by the infarct size and the recovery of the LV function. After adding RBC from old diabetics with an HbA1c < 7.5% no difference could be found in RBC function compared to young healthy subjects. In contrast the cardioprotective function of RBC was abolished by poor long-term blood glucose control (HbA1c > 7.5%).

**Summary and Conclusion:** Our study shows that poor glycemic control in patients with diabetes mellitus is the reason for the deterioration of the cardioprotective function of RBC in cardiac I/R injury and that the HbA1c value of subjects correlates with the infarct size of the murine heart. On the other hand the RBC function remains just as good in old subjects

without and with diabetes mellitus with satisfying blood glucose control as in young healthy subjects. These results underline the importance of a good glycemic control in diabetes mellitus and are the basis for future studies that investigate the underlying pathomechanism in more detail.

# Abkürzungsverzeichnis

±dP/dt	Maximale und minimale erste Ableitung des LVDP über die Zeit	LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
AGEs	Advanced glycation end products	MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
AMI	Akuter Myokardinfarkt	MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
ATP	Adenosintriphosphat	Na <sup>+</sup>	Natriumionen
AV	Atrioventrikulär	NaCl	Natriumchlorid
BGA	Blutgasanalyse	NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
BMI	Body mass index	NADPH	Nikotinamidadenin-dinukleotidphosphat
Bpm	Beats per minute	NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen	NF-κB	Nuclear factor-kappa B
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid	NO	Stickstoffmonoxid
cGluc	Glukosekonzentration	Nor-NOHA	N <sup>ω</sup> -hydroxy-nor-L-arginine
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	NOX	NADPH-Oxidase
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
cTnI	Kardiales Troponin I	O <sub>2</sub>	Sauerstoff
cTnT	Kardiales Troponin T	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidion
DAG	Diacylglycerol	OH	Hydroxylradikal
DM	Diabetes mellitus	ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit
DPP-4	Dipeptidyl-Peptidase-4	pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
EKG	Elektrokardiogramm	PCI	Perkutane Koronarintervention
eNOS	Endotheliale NO-Synthase	PKC	Proteinkinase C
ESC	European Society of Cardiology	RAGE	Receptor for advanced glycation end products
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate	RBC	<i>Red blood cells</i>
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen	RIVA	Ramus interventricularis anterior
H <sub>2</sub> O	Wasser	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	RV	Rechter Ventrikel
Hb	Hämoglobin	SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
HbA1c	Hämoglobin A1c	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
I/R	Ischämie/Reperfusion	SOD1	Superoxiddismutase
K <sup>+</sup>	Kaliumionen	STEMI	ST-Hebungsinfarkt
KCl	Kaliumchlorid	TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat		
KHB	Krebs-Henseleit Puffer		
KHK	Koronare Herzkrankheit		
LDH	Laktatdehydrogenase		
L-NAME	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginine methyl ester		
LV	Linker Ventrikel		
LVDP	Linksventrikulär entwickelter Druck		

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Der Myokardinfarkt .....	1
1.2	Der kardiale Ischämie/Reperfusionsschaden.....	2
1.3	Kardiovaskuläre Risikofaktoren .....	5
1.4	Die erythrozytäre Funktion im kardialen I/R-Schaden .....	7
1.5	Der Langendorff-Perfusor .....	9
1.6	Zielsetzung.....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1	Material.....	15
2.1.1	Geräte .....	15
2.1.2	Verbrauchs- und sonstige Materialien.....	15
2.1.3	Arzneimittel, Chemikalien, Gase .....	16
2.1.4	Programme.....	17
2.1.5	Tiere .....	17
2.1.6	Tierbedarf .....	18
2.2	Methoden .....	18
2.2.1	Probengewinnung.....	18
2.2.2	Langendorff-Transfermodell.....	21
2.2.3	Bestimmung der Infarktgröße .....	27
2.2.4	Blutgasanalyse (BGA) .....	29

2.3	Statistik.....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1	Patientencharakteristika .....	31
3.2	Effekt von Erythrozyten junger, gesunder Probanden auf den kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden).....	33
3.3	Einfluss von Erythrozyten junger, gesunder Probanden und von Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes auf den kardialen I/R-Schaden .....	37
3.4	Auswirkung von Erythrozyten alter und junger Probanden ohne und mit medikamentös gut und schlecht eingestelltem Diabetes mellitus auf den kardialen I/R-Schaden .....	42
3.5	Korrelation des HbA1c-Wertes der älteren Probanden mit der Infarktgröße der murinen Herzen nach kardialen I/R-Schaden.....	48
3.6	Glukosekonzentrationen in aufbereiteten Proben von jungen, gesunden Probanden und alten Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes mellitus .....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
4.1	Einfluss des Alters auf die erythrozytäre Funktion .....	51
4.2	Einfluss von Diabetes mellitus auf die erythrozytäre Funktion.....	52
4.3	Limitationen der Arbeit.....	57
4.4	Zusammenfassung und Ausblick .....	58
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schemazeichnung des Langendorff-Perfusors .....	22
Abb. 2: Versuchsaufbau des Langendorff-Perfusors im kardiologischen Labor der Heinrich-Heine-Universität .....	23
Abb. 3: Detailaufnahme des Mäuseherzens im Langendorff-Perfusor.....	24
Abb. 4: Übersicht über die zeitliche Abfolge des Langendorff - Versuchs .....	27
Abb. 5: Beispiel eines TTC-gefärbten Schnittes eines Mäuseherzens .....	29
Abb. 6: Größeres Infarktareal nach Zugabe von KHB (Kontrolle KHB) als nach Zugabe von Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40J) .....	34
Abb. 7: Die kardioprotektive Wirkung von Erythrozyten auf den kardialen Ischämie/ Reperfusionsschaden .....	35
Abb. 8: Größeres Infarktareal nach Zugabe von Erythrozyten alter Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes mellitus.....	38
Abb. 9: Verlust der kardioprotektiven Funktion in Erythrozyten von alten Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes mellitus.....	40
Abb. 10: Einfluss von Erythrozyten verschiedener Probandengruppen auf die Infarktgröße .....	43
Abb. 11: Einfluss von Erythrozyten verschiedener Probandengruppen auf die hämodynamischen Funktionsparameter der murinen Herzen im Langendorff-Transfermodell.....	45
Abb. 12: Kein Unterschied in der Erholung der koronaren Flussrate .....	46
Abb. 13: Der Langzeitblutzuckerwert älterer Probanden mit und ohne Diabetes mellitus korreliert mit der Infarktgröße der murinen Herzen.....	48
Abb. 14: Kein Unterschied der Glukosekonzentration in den aufbereiteten Blutproben .....	49

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte .....	15
Tabelle 2: Übersicht über das Verbrauchs- und sonstige Material .....	15
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Arzneimittel, Chemikalien und Gase ....	16
Tabelle 4: Übersicht über genutzte Computerprogramme.....	17
Tabelle 5: Junge, gesunde Probanden (Kontrolle < 40 J, n = 8).....	19
Tabelle 6: Junge Diabetiker (DM < 40 J, n = 6).....	19
Tabelle 7: Alte Probanden ohne Diabetes mellitus (Kontrolle > 73 J, n = 7).....	19
Tabelle 8: Alte Diabetiker mit einem HbA1c < 7,5% (DM HbA1c < 7,5, n = 7).....	20
Tabelle 9: Alte Diabetiker mit einem HbA1c > 7,5% (DM HbA1c > 7,5, n = 8).....	20
Tabelle 10: Zusammensetzung des <i>Krebs-Henseleit-Buffers</i> (KHB) .....	21
Tabelle 11: Patientencharakteristika der Probanden unter 40 Jahren. ....	31
Tabelle 12: Patientencharakteristika der Probanden über 73 Jahren. ....	32
Tabelle 13: Übersicht über die Medikamenteneinnahme der Probanden. ....	32
Tabelle 14: Vergleich der <i>Baseline</i> -Werte der murinen Herzen vor dem Beladen mit KHB (Kontrolle KHB) oder Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J). ....	36
Tabelle 15: Vergleich der <i>Baseline</i> -Werte der murinen Herzen vor dem Beladen mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J) und alter Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes mellitus (DM HbA1c > 7,5). ....	41
Tabelle 16: Vergleich der <i>Baseline</i> -Werte der murinen Herzen vor dem Beladen mit KHB (Kontrolle KHB) und Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J), junger Diabetiker (DM < 40 J), alter Patienten mit medikamentös gut eingestelltem (DM HbA1c < 7,5) und schlecht eingestelltem (DM HbA1c > 7,5) und ohne (Kontrolle > 73 J) Diabetes mellitus.....	47

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Myokardinfarkt

Trotz substantieller Verbesserung der Prognose durch die interventionelle Rekanalisation bleibt der akute Myokardinfarkt (AMI) einer der häufigsten Gründe für Mortalität und Morbidität weltweit [1]. In Deutschland stellte der Myokardinfarkt 2017 die zweithäufigste Todesursache nach einer chronischen ischämischen Herzkrankheit dar [2]. Beim AMI ist eine akute myokardiale Ischämie die Ursache für die Myokardschädigung, die definitionsgemäß mit einer Erhöhung des im Serum nachweisbaren Troponins über die 99. Perzentile des oberen Referenzwertes einhergeht [3]. Die Klassifikation des Myokardinfarkts beinhaltet fünf verschiedene Typen [4]. Während es sich beim Typ 1 um den typischen Herzinfarkt durch eine atherosklerotische Plaqueruptur eines Koronarthrombus handelt, handelt es sich beim Typ 2 um ein Sauerstoffdefizit und beim Typ 3 um den Herztod [4]. Der Myokardinfarkt Typ 4 ist mit einer perkutanen Koronarintervention (PCI) und der Typ 5 mit einem Bypass assoziiert [4]. Die häufigste Ursache ist allerdings die atherosklerotische Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombosierung [1, 5]. Dabei rupturiert meist ein instabiler Plaque mit dünner fibröser Kappe innerhalb einer Koronararterie, der viele inflammatorische Zellen wie Makrophagen enthält. Durch die Ruptur wird prothrombotischer Inhalt freigesetzt, der zur Thrombozytenaktivierung führt und eine koagulatorische Kaskade nach sich zieht. So kommt es zur Thrombosierung und Embolisation. Das Ausmaß des Schadens in Form von Nekrose der Kardiomyozyten wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dazu zählen das Ausmaß und die Dauer des Verschlusses, die Menge an beteiligtem Myokard, das Vorhandensein von Kollateralen und die adäquate Reperfusion als Behandlungsstrategie [1]. Das Hauptsymptom eines AMI ist Angina pectoris, welche sich durch ein retrosternales Druckgefühl auszeichnet, das auch in den linken Arm, Hals oder Kiefer ausstrahlen kann. Diagnostisch sollte schnellstmöglich ein Elektrokardiogramm (EKG) erfolgen, in dem dann zwischen einem AMI mit oder ohne ST-Streckenhebung unterschieden werden kann (STEMI = ST-Hebungsinfarkt, NSTEMI = Nicht-ST-Hebungsinfarkt) [6, 7]. In beiden Fällen sind erhöhte Serummarker nachweisbar. Im Vordergrund stehen hier das kardiale Troponin I (cTnI) und das kardiale Troponin T (cTnT), die beide Komponenten des kontraktiven Apparates der myokardialen Zellen darstellen und bei myokardialen Schäden freigesetzt werden [3]. Das Therapieregime unterscheidet sich beim STEMI und NSTEMI. Beim NSTEMI soll zunächst eine Risikostratifizierung erfolgen, die dann über das weitere Vorgehen entscheidet und gegebenenfalls auch das Zeitfenster bis zur invasiven

Koronarangiographie und Revaskularisation mittels perkutaner Koronarintervention (PCI) bestimmt [7]. Dahingegen soll die Reperfusionstherapie beim STEMI schnellstmöglich erfolgen. Die primäre PCI soll innerhalb von zwölf Stunden nach Symptombeginn und spätestens zwei Stunden nach Diagnosestellung erfolgen, ist dies nicht möglich, soll eine sofortige Fibrinolyse durchgeführt werden [6]. Durch die primäre PCI konnte eine Reduktion der 30-Tage-, 1-Jahres- und 5-Jahres-Mortalität erzielt werden [8]. So stellt die frühe und erfolgreiche Reperfusion die effektivste Strategie dar, die Infarktgröße zu reduzieren und das *Outcome* zu verbessern [9]. Allerdings kann die Wiederherstellung des Blutflusses selbst auch Schäden am Myokard verursachen [9, 10].

## 1.2 Der kardiale Ischämie/Reperfusionsschaden

Während eines AMI verursachen sowohl die Ischämie als auch die Reperfusion einen Schaden am Myokard, was als kardialer Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) bezeichnet wird [11]. Es wird davon ausgegangen, dass die Reperfusion etwa die Hälfte des Myokardschadens nach einer Ischämie und Reperfusion ausmacht [9, 11]. Bisher gibt es noch keine effektive Therapie, den Reperfusionsschaden einzugrenzen [11]. Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge während einer Ischämie und Reperfusion kann zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien beitragen [12].

Etwa 20 Minuten nach Einsetzen der Ischämie beginnt der Zelltod der Kardiomyozyten erst im Subendokard, dann transmural und schließlich im Epikard [13]. Durch die Hypoxie wird das Myokard verschiedenen biochemischen und metabolischen Veränderungen unterzogen [11]. Es kommt zum Aussetzen der oxidativen Phosphorylierung mit folgender ATP Depletion und Inhibition der kardialen Kontraktilität [11]. Im ischämischen Gewebe, in dem die ATP-Konzentration in der Zelle unter 100  $\mu\text{mol/l}$  beträgt, aber auch größer als null sind, entstehen Kontrakturen vom Rigor-Typ [14]. Der absolute ATP-Mangel führt dann zu einem Zustand, in dem die Verkürzung der Myofibrillen bestehen bleibt, da die Querbrücken zwischen Aktin und Myosin nicht mehr gelöst werden können. Daraus resultieren zum einen zytoskelettale Defekte, die die Kardiomyozyten fragiler und anfällig für mechanische Schäden machen und zum anderen ein Anstieg des enddiastolischen Druckes und Abfall der ventrikulären Compliance [14]. Aufgrund der Hypoxie kommt es zu einem Wechsel in einen anaeroben Stoffwechsel mit Akkumulation von Laktat und Azidose des Myokards [11]. Um dieser entgegenzuwirken, wird der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher hochreguliert, der Natriumionen im Austausch mit Wasserstoffionen in die Kardiomyozyten hinein befördert [15]. Zusätzlich werden die Natriumionen nicht mehr durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aus der Zelle heraus transportiert, da das benötigte ATP fehlt. Insgesamt führt die resultierende

intrazelluläre Natrium-Ansammlung zur gegenläufigen Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, worauf wiederum eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überlastung folgt, die Hyperkontraktionen induziert, die mit Rupturen der Muskelfasern und somit dem Zelltod einhergehen können [16, 17].

Es gibt vier verschiedene Formen des kardialen Reperfusionsschadens [11]. Reversibel sind dabei durch die Reperfusion induzierte Arrhythmien, die zwar sehr gefährlich, aber auch meist selbstlimitierend oder einfach zu behandeln sind [9, 18], und myokardiales *Stunning*, worunter man eine kontraktile Dysfunktion durch oxidativen Stress und eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überlast im myokardialen Apparat versteht [11, 19]. Die mikrovaskuläre Obstruktion ist eine der beiden irreversiblen Formen des kardialen Reperfusionsschadens, die bereits 1966 von Krug et al. als Störung der myokardialen Durchblutung des ischämischen Gebiets nach Reperfusion beschrieben wurde [20]. Gründe für das sogenannte „*No-reflow*“-Phänomen sind Schäden an den Kapillaren mit verschlechterter vasodilatatorischer Funktion, eine externe Kompression der Kapillaren durch Schwellung von Kardiomyozyten, Mikroembolisation, Mikrothrombosen und die Freisetzung vasomotorischer und thrombotischer Substanzen [10, 11, 21, 22]. Die Folgen der mikrovaskulären Obstruktion können eine größere Infarktgröße, eine niedrige Ejektionsfraktion, ein ungünstiges linksventrikuläres *Remodeling* und ein schlechteres klinisches *Outcome* sein [11, 22, 23]. Bei der zweiten Form des irreversiblen Reperfusionsschadens handelt es sich um den letalen Reperfusionsschaden, der als Nekrose von Kardiomyozyten, die vor der Reperfusion noch vital waren, definiert ist [11, 24]. Im Weiteren soll auf die Pathophysiologie, die hinter dem letalen Reperfusionsschaden steht, eingegangen werden. Ein wichtiger Mechanismus ist der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration [9]. Sobald erneut ATP zur Verfügung steht, funktioniert die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) wieder und kann  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zurück ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) befördern [24]. Durch die Ansammlung von Calcium während der Ischämie ist es allerdings möglich, dass die SERCA für den Abtransport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol nicht ausreicht, sodass es zu einem oszillierenden Transport vom SR ins Zytosol und zurück kommen kann [24]. Erst durch die Ausschleusung aus der Zelle, die abhängig von einem vorwärts funktionierenden  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist, kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dann neutralisiert werden [25]. Die Reperfusion führt zur Reoxygenierung der Zellen und damit auch zu erneuter ATP-Bildung, was zur Wiederaufnahme der Funktion des kontraktile Apparats der Kardiomyozyten führt [14]. Bei gleichzeitiger intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überlastung resultieren dann unkontrollierte Kontraktionen und Kontrakturen, die das Myokard schädigen [14]. Diese schwerwiegenden Kontrakturen gehen mit einer spezifischen Form der Nekrose einher, die „*contraction band necrosis*“ genannt wird [26].

Das Sauerstoff-Paradoxon beschreibt einen myokardialen Schaden, der durch die Reoxygenierung des ischämischen Gewebes verursacht wird [9]. Entstehende reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie das Superoxidion ( $O_2^-$ ), das Hydroxylradikal (OH) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reagieren mit ungesättigten Fettsäuren, wodurch es zur Bildung von Fettsäure-Radikalen kommen kann, die wiederum das Sarkolemm schädigen und membrangebundene Enzyme inhibieren [10]. Es kommt zur Störung der zellulären Integrität, was einerseits zu Schäden an den mitochondrialen Membranen führt, worauf weiterer ischämischer Schaden folgen kann und was andererseits auch den  $Ca^{2+}$ -Transport über die Zellmembran einschränkt, wodurch die Neutralisierung der Ionen-Konzentration von Calcium noch weiter beeinträchtigt wird [10].

Auch Stickstoffmonoxid (NO) wird als einer der wichtigen Faktoren während des I/R-Schadens angesehen [12, 27]. Bisher bleibt die Rolle von NO allerdings umstritten, es scheint sowohl protektive als auch schädigende Effekte zu geben [28]. In physiologischen Mengen wirkt NO über seine vasodilatative Wirkung, die Inhibition von Plättchenaggregation und die Inhibition der Adhäsion von Neutrophilen und Thrombozyten kardioprotektiv [12]. Durch oxidativen Stress, der während der Reperfusion entsteht, kann die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) herabgesetzt werden. Dies führt zur Reduktion der kardioprotektiven Effekte von NO wie die Inhibition der Neutrophilen-Akkumulation, die Inaktivierung des Superoxid-Radikals und der Verbesserung des koronaren Blutflusses [9]. Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass die NO-Konzentration während der Ischämie deutlich erhöht ist [29]. Dadurch, dass NO mit Superoxid zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) reagiert, was zu den reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies gehört, kann es wiederum zu weiteren Gewebsschäden kommen [29]. Der anaerobe Stoffwechsel während der ischämischen Phase führt zur deutlichen Absenkung des pH-Wertes intrazellulär aber auch im Interstitium [24]. Der kontraktile Apparat wird durch die herrschende Azidose inhibiert, was der Entstehung von Kontrakturen vorbeugt [24]. Durch die Reperfusion wird zunächst der extrazelluläre pH-Wert schnell normalisiert, wodurch ein  $H^+$ -Gradient zwischen intra- und extrazellulärem Raum entsteht, der zur Aktivierung des  $Na^+/H^+$ -Austauschers und des  $Na^+/HCO_3^-$ -Symporters führt [30]. Der resultierende  $Na^+$ -Einstrom kann erneut zur Umkehr des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers führen, was wieder die  $Ca^{2+}$ -Überlastung fördert und somit Kontrakturen begünstigt [24].

Die schnelle Erholung des pH-Wertes, die  $Ca^{2+}$ -Überlastung und die Bildung von ROS induzieren die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (MPTP) [17]. Dabei handelt es sich um einen unselektiven Kanal der inneren Mitochondrienmembran,

deren Öffnung zu einer Depolarisierung der Membran mit Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und folgender ATP-Depletion führt [11]. Dies wirkt verstärkend auf die Zellnekrose [12]. Weiterhin kommt es durch die Öffnung der MPTP zu einer Schwellung der Mitochondrien bis hin zur Membranruptur, wodurch proapoptotische Signalmoleküle freigesetzt werden, die die Apoptose einleiten können [12, 31]. Ein niedriger pH-Wert, wie auch während der Ischämie, inhibiert die Öffnung der MPTP [31].

Auch das Calpain-System scheint in die Entstehung des I/R-Schadens involviert zu sein. Calpaine sind eine Familie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger nicht-lysosomaler Cysteinproteinasen, die physiologisch in ihrer inaktiven Form im Zytosol fast aller Zellen vorkommen. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht verstanden. Es wird davon ausgegangen, dass es durch den Calcium-Anstieg und durch die pH-Normalisierung nach Einsetzen der Reperfusion zur Aktivierung des Calpainsystems kommt. Aktiviertes Calpain hat zahlreiche Substrate, die den Zellzyklus, die Apoptose und Zelldifferenzierung beeinflussen und sich negativ auf die Funktion der Kardiomyozyten auswirken [12].

Die Entstehung einer Entzündungsreaktion spielt eine weitere Rolle in der Pathophysiologie des I/R-Schadens [32]. Aufgrund von Chemokinen wandern neutrophile Granulozyten in die Infarktzone, wo sie Gefäße obstruieren, ROS freisetzen und umliegendes Gewebe abbauen können [9].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die pathophysiologischen Zusammenhänge bei der Entstehung des I/R-Schadens komplex, vielseitig und noch nicht bis ins letzte Detail verstanden sind.

### **1.3 Kardiovaskuläre Risikofaktoren**

Die häufigste Ursache eines akuten Myokardinfarktes ist die atherosklerotische Plaqueruptur [1]. Die Manifestation der Atherosklerose in den Koronargefäßen wird als koronare Herzerkrankung (KHK) bezeichnet [4]. Zur Entstehung dieser Gefäßerkrankung tragen viele Risikofaktoren bei, die gleichzeitig auch Risikofaktoren für die Entwicklung eines Herzinfarktes darstellen. Bei den Risikofaktoren, die die Wahrscheinlichkeit einen AMI zu erleiden erhöhen, wird zwischen modifizierbaren und nicht modifizierbaren Risikofaktoren unterschieden. Ein steigendes Lebensalter, das Geschlecht und eine genetische Prädisposition gehören zu den nicht modifizierbaren, während Rauchen, Alkoholkonsum, körperliche Inaktivität, eine ungünstige Ernährungsweise, arterielle Hypertension, Diabetes mellitus, Dyslipidämien und das metabolische Syndrom zu den modifizierbaren Risikofaktoren gehören [5]. Auch das Risiko nach einem AMI zu versterben steigt bei vorliegenden Risikofaktoren wie steigendem Alter, Rauchen, arterieller

Hypertonie, Diabetes mellitus, peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK), einem Schlaganfall in der Vorgeschichte, chronischer Niereninsuffizienz, einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), chronischen Lebererkrankungen und Krebs in der Krankengeschichte [33].

Patienten mit Diabetes mellitus erleiden häufiger einen AMI als Patienten im gleichen Alter ohne Diabetes [34]. Bei Diabetikern zählen kardiovaskuläre Erkrankungen zu den wichtigsten Komplikationen und sind für 50-80% der frühen Todesfälle verantwortlich [35]. Auch das *Outcome* nach einem AMI ist bei Diabetikern schlechter als bei Nicht-Diabetikern [36]. So ist die Mortalität während des Krankenhausaufenthalts und das Risiko für Komplikationen nach einem AMI wie Herzinsuffizienz, Vorhofflimmern, Überleitungsstörungen und Angina pectoris unter Diabetikern erhöht [35]. Dabei ist eine Hyperglykämie einer der wichtigsten prognostischen Prädiktoren für die langzeit- und kurzfristige Mortalität [37]. Sie ist mit einem erhöhten Risiko nach einem AMI im Krankenhaus zu versterben, sowie mit dem „*No-reflow*“-Phänomen assoziiert [22].

Makro- und mikrovaskuläre Komplikationen bei Diabetikern sind vor allem auf eine lange Exposition gegenüber einer Hyperglykämie zurückzuführen [38]. Das Ungleichgewicht zwischen der Bioverfügbarkeit von NO und der Produktion von ROS und die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion sind Gründe für die veränderten Gefäßfunktionen durch die hohen Glukoselevel [38]. Verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren, unter anderem ein steigendes Lebensalter, Diabetes mellitus und Hyperglykämie, induzieren eine endotheliale Dysfunktion, die wiederum Atherosklerose begünstigt [39, 40]. Eine endotheliale Dysfunktion stellt aber auch einen unabhängigen Risikofaktor für kardiale Ereignisse wie ein AMI dar [39]. Charakterisiert wird die endotheliale Dysfunktion durch eine geringere Bioverfügbarkeit von NO und ein Ungleichgewicht zwischen relaxierenden und konstringierenden Faktoren der Gefäßwand [39, 41]. Bei älteren Probanden [42] und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 [43, 44] ist das Enzym Arginase 1 im Endothel hochreguliert [41]. Dadurch, dass Arginase 1 L-Arginin zu L-Ornithin und Urea verstoffwechselt, steht weniger L-Arginin als Substrat für die endotheliale NO-Synthase (eNOS) zur Verfügung und es resultiert eine herabgesetzte NO-Bioverfügbarkeit [41]. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Erkrankungen sind darüber hinaus mit einer erhöhten Produktion von ROS assoziiert [45]. Verschiedene Enzyme in der Gefäßwand wie NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase und Enzyme der mitochondrialen Atmungskette können potenziell ROS bilden [45]. ROS trägt zur Entkopplung der eNOS bei, sodass anstelle von NO Superoxid gebildet wird und noch mehr ROS entsteht [45]. Die Reaktion von NO und Superoxid führt zur Entstehung von Peroxinitrit, was vermehrt unter pathologischen Bedingungen wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und der koronaren

Herzkrankheit gebildet wird und ein starkes Oxidationsmittel darstellt [46].

Verschiedene weitere Mechanismen tragen zu einem Hyperglykämie-induzierten endothelialen Schaden bei. Dazu zählen die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) durch Diacylglycerol (DAG), ein erhöhter Fluss über den Hexosaminweg, die intrazelluläre Bildung von AGEs (advanced glycation end products), ein erhöhter Fluss über den Polyol-Weg und die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) [47]. Auch all diese Mechanismen sind unabhängig voneinander mit einer Überproduktion von Superoxid durch die mitochondriale Elektronentransportkette assoziiert [47]. So wird angenommen, dass die Formation von ROS durch eine Hyperglykämie zu einer endothelialen Dysfunktion, einer herabgesetzten Bioverfügbarkeit von NO und Prostacyclin und einer erhöhten Synthese von vasokonstriktorischen Prostanoiden und Endothelin führt, was wiederum die Bildung eines atherosklerotischen Plaques begünstigt [47].

Da der optimale Zielwert der Langzeitblutglukose und das therapeutische Regime Teil der aktuellen Forschung sind, empfehlen Fachgesellschaften derzeit eine enge, aber nicht zu strenge Einstellung des Blutzuckers [35]. In der kürzlich veröffentlichten ESC Leitlinie wird zur Reduktion mikrovaskulärer Komplikationen ein HbA1c-Wert von 7,0% für jüngere Patienten ohne Risiko für Hypoglykämien empfohlen [48]. Für ältere Patienten mit eingeschränkter Lebenserwartung, Komorbiditäten und Risiko für Hypoglykämien wird eine individuelle Anpassung des Ziel-HbA1c, zum Beispiel unter 8,0%, empfohlen [48].

## **1.4 Die erythrozytäre Funktion im kardialen I/R-Schaden**

Bis vor Kurzem konzentrierten sich die meisten Studien zur Kardioprotektion im kardialen I/R-Schaden auf die Rolle der Kardiomyozyten. Mittlerweile gibt es Evidenz dafür, dass auch zirkulierende Zellen, wie Thrombozyten und Erythrozyten, in die Vorgänge während einer Ischämie und Reperfusion involviert sind [49, 50]. Yang et al. zeigten bereits 1996, dass die Perfusion isolierter Rattenherzen mit Erythrozyten-haltigen Perfusionslösungen zur Abschwächung der myokardialen Dysfunktion nach I/R führt [51]. Bekannt als Hauptfunktion der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff ( $O_2$ ) und Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) zwischen Lunge und peripherem Gewebe [52]. Durch Interaktion mit dem Endothel sind Erythrozyten aber auch in die Regulation des kardiovaskulären Systems involviert [49, 53, 54]. Zu den Mechanismen gehören die Bereitstellung einer NO-Bioaktivität und Adenosintriphosphat (ATP), die wichtige kardiovaskuläre Wirkungen, wie eine Vasodilatation, erzielen [49, 55]. Es wurde gezeigt, dass Erythrozyten das isolierte Herz über einen NO-Synthase abhängigen Mechanismus vor I/R-Schäden schützen [49,

51, 56]. Anschließend wurde gezeigt, dass die Bereitstellung der NO-Bioaktivität durch die erythrozytäre NO-Synthase eine kardioprotektive Wirkung am isolierten Herzen hat [57]. Für lange Zeit wurden Endothelzellen als Hauptquelle einer eNOS abhängigen Produktion von NO und von Arginase-Aktivität gesehen [46, 58]. Kürzlich wurde allerdings auch eine eNOS in Erythrozyten nachgewiesen, die zur systemischen Bioverfügbarkeit von NO beiträgt [59]. Ebenfalls gibt es in Erythrozyten eine Expression des Enzyms Arginase 1, das die NO-Bildung reziprok über den Verbrauch von L-Arginin reguliert, was ein gemeinsames Substrat der Arginase und NO-Synthase darstellt [57].

Bei Patienten mit KHK ist sowohl die Expression als auch die Aktivität der erythrozytären eNOS erniedrigt und es besteht eine Korrelation zu dem Grad der endothelialen Dysfunktion [60]. Dies wiederum zeigt, dass die NO Aktivität der Erythrozyten eine Relevanz für die Erkrankung darstellt [60].

Zur Aufrechterhaltung ihrer physiologischen Funktion sind Erythrozyten mit enzymatischen als auch nicht-enzymatischen antioxidativen Systemen ausgestattet [55]. Dazu gehören hohe Konzentrationen von antioxidativen Molekülen (Glutathion, Vitamin C, Vitamin E), Quellen reduzierter Redox-Äquivalente (NADH, NADPH) und antioxidative Enzyme (Superoxiddismutase 1 (SOD1), Katalase, Glutathionperoxidase, Thioredoxin), die der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vorbeugen sollen [55]. Weiterhin haben Erythrozyten die Eigenschaft extrazelluläre Antioxidantien zu reduzieren, was sie zu einem idealen Puffersystem für ROS macht, wodurch sie zur systemischen Homöostase der Balance zwischen Reduktions- und Oxidationsreaktionen beitragen [55].

Erythrozyten scheinen auch über die Freisetzung von ATP unter hypoxischen Bedingungen in die Regulation des Gefäßtonus involviert zu sein [61].

Die Erythrozyten aus Probandengruppen verschiedenen Alters weisen Unterschiede der rheologischen Eigenschaften auf [62]. Ein höheres Lebensalter scheint mit einer herabgesetzten Verformbarkeit von Erythrozyten assoziiert zu sein [52]. Da sowohl oxidativer Stress [63] als auch Arginase [64] mit einem höheren Lebensalter in Verbindung gebracht werden, lässt sich annehmen, dass diese Veränderungen zur einer herabgesetzten Verformbarkeit führen [52].

Die steigende endotheliale Dysfunktion im zunehmenden Alter lässt sich durch verschiedene Mechanismen erklären, zu denen eine herabgesetzte endotheliale NO Bioverfügbarkeit, eine erhöhte Produktion vasokonstriktorischer Faktoren durch das Endothel und oxidativer Stress gehören [65].

Erythrozyten von Patientin mit Diabetes mellitus Typ 2 weisen verschiedene Veränderungen gegenüber Erythrozyten gesunder Menschen auf [66]. Dazu gehören eine geringere Verformbarkeit mit Änderungen im Zytoskelett der Erythrozyten, sowie

Änderungen der Morphologie und eine erhöhte Adhäsion an Endothelzellen [66-69]. Auf molekularer Ebene ist die Bindung des Band 3 Protein in Erythrozyten an den RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) von Endothelzellen verantwortlich [52, 67]. In Experimenten am Langendorff-Perfusor, verschlechterten Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 den myokardialen I/R-Schaden im Vergleich zu Erythrozyten gesunder Probanden [70]. Ähnlich wie bei der endothelialen Dysfunktion wurden in Erythrozyten von Mäusen und von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine erhöhte Arginase-Aktivität als auch eine vermehrte Produktion von ROS nachgewiesen, die den kardialen I/R-Schaden verschlimmern [70]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine endotheliale Dysfunktion induzieren, was durch Arginase-Inhibition wieder aufgehoben werden kann [71]. Auch die nicht-selektive Inhibition der erythrozytären eNOS mit L-NAME ( $N^{\omega}$ -nitro-L-arginine methyl ester) führte in Versuchen am Langendorff-Perfusor zur verbesserten kardialen Erholung bei Erythrozyten von Diabetikern, nicht aber bei Erythrozyten gesunder Probanden [70]. So reduzierte der NOS-Inhibitor L-NAME ebenfalls die ROS Produktion in Erythrozyten von Diabetikern, nicht aber von gesunden Probanden [70].

Mahdi et al. zeigten, dass eine gute Blutzuckereinstellung die schädigenden Effekte der Erythrozyten von Diabetikern auf die kardiale Funktion nach 60 minütiger Reperfusion nach globaler Ischämie in einem Ex-vivo Modell verbesserte [66]. Weiterhin weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass die durch Erythrozyten von Diabetikern induzierte endotheliale Dysfunktion nicht durch optimierte Glukoseeinstellung verbessert werden kann und dass die Arginase-Aktivität abhängig von der Blutzuckerkontrolle ist [66]. Mit steigender Glukosekonzentration steigt bei Diabetikern die Aggregation und sinkt die Verformbarkeit der Erythrozyten [72]. Weiterhin wurde auch eine steigende Adhäsion an Endothelzellen mit steigendem HbA1c-Wert bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 nachgewiesen [73]. Im Gegensatz zu gesunden Erythrozyten in hypoxischen Bedingungen, findet keine Vasodilatation peripherer Gefäße unter Einfluss von Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 statt, was auf eine verminderte Freisetzung von ATP zurückzuführen ist [74].

## 1.5 Der Langendorff-Perfusor

Die Methode der Perfusion isolierter Herzen entstand bereits im 19. Jahrhundert [75, 76]. Als Meilenstein für die Forschung an der Herzphysiologie entwickelten Elias Cyon und Carl Ludwig 1866 ein Modell, bei dem Froschherzen mit Kaninchenserum perfundiert wurden [76]. Das Froschherz besitzt im Gegensatz zu den Herzen von Säugetieren nur eine

Herzkammer, insgesamt also drei Herzbinnenräume (zwei Vorhöfe und eine Kammer) [76]. Das Fehlen eines Koronarsystems erleichterte die Isolierung und Aufrechterhaltung der Funktion der Froschherzen [77]. Dabei erfolgt die Versorgung des Herzens mit Nährstoffen und Sauerstoff beim Frosch über Diffusion aus den Herzkammern [75]. Den weiteren Schritt zur Isolation von Säugetierherzen machte H. Newell Martin, indem er den Ramus interventricularis (RIVA) der linken Koronararterie und die Arteria carotis bei Hunden und Katzen kanülierte [78]. Über einen Kymographen konnten so gleichzeitig die Drücke aus beiden Arterien aufgezeichnet werden, wobei auffiel, dass sich die Änderung der Drücke in beiden Arterien abhängig von dem Druck in der Aorta ähnelte [78]. In Martins Modell fließt das Blut vom linken Vorhof in den linken Ventrikel, weiter in die Aorta, von der aus es zwei Möglichkeiten gibt: Ein Teil des Bluts fließt Richtung Arteria carotis und Arteria subclavia, wo der Druck mittels Manometer über eine Kanüle gemessen wird. Der andere Teil durchströmt die Koronararterien und fließt dann weiter in den Koronarsinus, dann in den rechten Vorhof, die rechte Kammer und in die Gefäße der Lunge. Hier wird das Blut oxygeniert und fließt zurück in den linken Vorhof [78]. Die Methode der isolierten, perfundierten Säugetierherzen wurde nach Oscar Langendorff benannt [75], der 1895 seine Erkenntnisse in seiner Schrift „Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen“ veröffentlichte [79]. Seine Versuche führte er vor allem an Katzenherzen, aber auch an Herzen von Kaninchen und Hunden durch [79]. Trotz zahlreicher Modifizierungen und Verbesserungen [77] bleibt der grundsätzliche Aufbau und das Funktionsprinzip bis heute bestehen [80]. Die aufsteigende Aorta des isolierten Säugetierherzens wird kanüliert und in eine Apparatur eingebracht, in der es retrograd perfundiert wird. Durch den Perfusionsdruck bleibt die Aortenklappe geschlossen und die Koronararterien werden durchströmt, die Perfusionsflüssigkeit fließt dann über den Koronarsinus in den eröffneten rechten Vorhof, aus dem eine freie Drainage möglich ist. Das Herz arbeitet folglich ohne Inhalt [79, 80]. Als Perfusionsflüssigkeit nutzte Langendorff das Blut, am besten desselben Tieres oder der gleichen Tierart. Allerdings stellte er auch fest, dass sich fremdes Blut verwenden ließ, zum Beispiel von Rindern, Schweinen oder Schafen [79]. Nach Defibrinierung des Bluts wurde es durch Glaswolle gefiltert und gewärmt [79]. In der aktuellen Forschung wird meistens ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer als kristalloide Perfusionslösung genutzt, deren Erstbeschreiber Krebs und Henseleit 1932 waren [80]. Bereits 1882 und 1883 untersuchte Sydney Ringer die Zusammensetzung lebenserhaltender Salze des Blutes, um die Perfusion isolierter Froschherzen mit einer rein salzhaltigen Lösung ohne Blut gewährleisten zu können [75, 77]. Während seiner Forschung fand er heraus, dass eine Perfusionslösung bestehend aus Natriumchlorid, Kalziumchlorid, Kaliumchlorid und Natriumhydrogencarbonat bei den isolierten Herzen zu einem kräftigen und anhaltenden

Herzschlag führte [81-83]. Er beleuchtete die Rolle von Kalziumionen für die Kontraktion des Herzens [75, 84] und zeigte, dass Kalium den Herzschlag verlangsamt und abschwächt [83]. Zur Weiterentwicklung trugen Rusch, ein Schüler Langendorffs und Locke bei, die die Lösung dem Serum eines Säugetieres anpasste und Dextrose hinzufügte, wodurch die Säugetierherzen über mehrere Stunden stabil schlugen [77, 78]. Isolierte Herzen, die mit einem kristalloiden Puffer perfundiert werden, sind kostengünstig, einfach und weit verfügbar [76]. Auch die Oxygenierung der kristalloiden Lösungen erfolgt lediglich über die Begasung mit einem Gas bestehend aus 95% Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), das für einen physiologischen pH bei 37°C benötigt wird [76]. Auf der anderen Seite weisen sie auch Limitationen aufgrund artifiziiell hoher Flussraten und niedriger Sauerstoff Dissoziationsraten im Herzgewebe auf [76, 85]. Weiterhin können keine Interaktionen zwischen Blutzellen und Kardiomyozyten oder Endothelzellen untersucht werden [50]. Aus diesen Gründen wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, um eine Vollblut-Perfusion isolierter Herzen [85, 86] oder eine Perfusion mit angereichertem KHB mit Erythrozyten oder Thrombozyten [51, 85, 87, 88] zu etablieren. Allerdings ist solch eine Perfusion deutlich komplexer [86]. Bei konventioneller Oxygenierung würde das Blut anfangen zu schäumen. Daher bleiben zwei andere Möglichkeiten, dass Blut adäquat zu oxygenieren, entweder mittels Membranoxygenierung oder mittels einer parabiotischen Präparation, bei der das Blut über ein Spendertier oxygeniert wird [85]. Das größte Problem der kontinuierlichen Perfusion mit Erythrozyten ist die Hämolyse [80]. Aber auch die Menge des benötigten Bluts spielt eine limitierende Rolle [50]. So führten Yang et al. Versuche durch, bei denen das Koronarsystem muriner Herzen zu Beginn einer Globalischämie mit murinem Blut beladen wurde und im Anschluss mit KHB reperfundiert wurde [57, 70]. Zur Beurteilung der Interaktion von Blutzellen mit Kardiomyozyten oder Endothelzellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen hat die Langendorff-Methode den Vorteil, keinen hormonellen, immunologischen und neurologischen Einflüssen ausgesetzt zu sein [50].

Bei der Perfusion isolierter Herzen handelt es sich um eine unverzichtbare Methode, die große Teile zur Entwicklung des heutigen Verständnisses der Herzphysiologie beigetragen hat [80]. Bis heute bleibt sie ein wichtiger Bestandteil in der Forschung zur kardiovaskulären Physiologie, Pharmakologie und Toxikologie [89]. Die Effekte der Vagusstimulation, das Alles-oder-Nichts-Prinzip, die absolute Refraktärzeit und der Ausgangspunkt der kardialen Automatizität im Vorhof und dem atrioventrikulären Übergang wurde schon an den isolierten Froschherzen beobachtet [75]. 1871 beschrieb Bowditch das Treppe Phänomen, nachdem die Kontraktilität des Herzens bei ansteigender Herzfrequenz zunimmt [89]. Langendorff wies nach, dass das Herz, solange die Koronarien durchblutet werden, auch ohne Füllung

schlagen kann [79]. Außerdem zeigte er, dass Muskarin eine ähnliche Wirkung wie die Vagusstimulation hat, Atropin einen gegenteiligen Effekt bewirkt und eine Kaliumchlorid-Lösung einen Herzstillstand hervorruft [79]. Selbst der Frank-Starling Mechanismus wurde anfänglich an isolierten Froschherzen durch Otto Frank 1895 entdeckt [89]. Das isolierte, perfundierte Säugetierherz erlaubt die Forschung an inotropen, chronotropen und koronarvaskulären Effekten verschiedener Interventionen ohne den Einfluss von Hormonen, dem peripheren Gefäßsystem und dem Nervensystem [89].

Zur Perfusion der isolierten Herzen gibt es zwei verschiedene Modi, die fluss- oder druckkonstante Perfusion [85]. Während die flusskonstante Perfusion über eine Rollpumpe gewährleistet wird und dadurch eine weitere Konstante im Experiment besteht, können autoregulatorische Mechanismen nicht mehr greifen [85]. Gerade bei pathologischen Geschehen, wie einer Ischämie, ist daher die druckkonstante Perfusion unbedingt zu bevorzugen [76]. Ein konstanter Perfusionsdruck kann entweder über die Höhe einer Wassersäule oder über druckkontrollierte Pumpsysteme mithilfe eines Feedbackmechanismus aufrechterhalten werden [80].

In der original Langendorff-Apparatur wurde die lineare Verkürzung der Herzachse aufgezeichnet, um Aussagen über die Kontraktionskraft des Herzens treffen zu können [79]. 1904 entwickelten Gottlieb und Magnus den linksventrikulären Ballon, der meist auch bei den aktuellen Experimenten mit dem Langendorff-Perfusor zur Druckmessung genutzt wird [89]. Dabei handelt es sich um einen meist mit destilliertem Wasser gefüllten Ballon, der über den eröffneten linken Vorhof in den linken Ventrikel eingeführt wird und mit einem Druckaufnehmer und einem Computersystem für Datenakquisition verbunden ist [89]. Als Messparameter zur Beurteilung der kardialen Funktion werden dort die Herzfrequenz, der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und die maximale und minimale erste Ableitung des LVDP über die Zeit ( $\pm dP/dt$ ) dargestellt [80, 89]. Die koronare Flussrate kann entweder über ein Durchflussmessgerät oder manuell über das Volumen, das über eine bestimmte Zeit aus dem rechten Vorhof tropft, bestimmt werden, wobei die zweite Methode anfällig für Messungenauigkeiten ist [80]. Das Effluat, das nach Passage des Koronarsystems aus dem rechten Vorhof tropft, kann auch noch für weitere Analysen, wie beispielsweise die Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)- Aktivität verwendet werden [90]. Um valide Ergebnisse zu erzielen, müssen die experimentellen Bedingungen konstant gehalten werden. Dazu gehören beispielsweise die Größe des Ballons und deren richtige Platzierung, keine Verzögerung in der Präparation und Perfusion des Herzens und eine Perfusionslösung mit ständig gleicher Zusammensetzung, gleichem pH-Wert und gleicher Temperatur [89]. Dass die Temperatur einen großen Einfluss auf die Kontraktilität des Herzens hat, beschrieb auch

schon Langendorff [79]. Je kälter die Perfusionsflüssigkeit ist, desto langsamer schlägt das Herz [79]. Vor allem im Setting einer Ischämie und Reperfusion sollte die Temperatur der Perfusionslösung und des Herzens daher konstant gehalten werden [80]. Dazu kann zum einen der Behälter mit der Perfusionslösung in ein erwärmtes Wasserbad gestellt werden und zum anderen sollte sich das Herz in einer Wärmekammer befinden, die mit erwärmtem rezirkulierendem Wasser umspült wird [76]. Weiterhin beobachtete bereits Langendorff, dass weitere Bedingungen für ein gutes Gelingen wichtig sind. Dazu zählen frisches Blut, keine Schädigungen am Herzen, keine Verunreinigungen, keine Gerinnsel und eine luftblasenfreie Perfusion [79]. Ein weiterer Faktor, der einbezogen werden sollte, ist die Herzfrequenz, die bei isolierten Herzen deutlich unterhalb der physiologischen Frequenz *in vivo* liegt [85]. Während die physiologische Herzfrequenz einer Maus bei 580-600 *beats per minute* (bpm) liegt, schlägt das isolierte Mäuseherz nur mit 380-420 bpm [80]. Der Grund dafür ist die Versorgung des Sinusknotens und des atrioventrikulären (AV)-Knotens über extrakardiale Gefäße, die bei der Exzision des Herzens durchtrennt werden [85]. Je nach Forschungsgebiet und Studienprotokoll sollte also eine elektrische Stimulation über einen Schrittmacher in Betracht gezogen werden, da sich eine erniedrigte Herzfrequenz auch auf die kardiale Kontraktilität auswirken kann [85].

Die Präparation von Säugetierherzen wurde an vielen verschiedenen Tieren durchgeführt, zu denen Hunde, Katzen, Schweine, aber auch Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse und Ratten zählen [80, 85]. Am meisten genutzt und am besten charakterisiert ist dabei die Präparation des isolierten Rattenherzens [76]. Da in der Forschung an genmanipulierten Tieren die Maus das Standard-Modell darstellt, wird seit vielen Jahren auch das Mäuseherz in der Langendorff-Apparatur genutzt, um kardiovaskuläre Erkrankungen weiter zu untersuchen [91].

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Alters, der Erkrankung Diabetes mellitus und der Blutzuckereinstellung von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 auf die erythrozytäre Funktion im kardialen I/R-Schaden näher zu untersuchen. Bereits bekannt ist, dass Erythrozyten eine wichtige Rolle im kardialen I/R-Schaden spielen und dass die erythrozytäre Funktion von älteren Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus weniger protektiv ist als die erythrozytäre Funktion junger, gesunder Probanden oder nach Verbesserung der Blutzuckereinstellung. Nach aktuellem Kenntnisstand bleibt bisher noch unerforscht, inwieweit die Infarktgröße des Mäuseherzens im Langendorff-Perfusor durch die Erythrozyten verschiedener Probandengruppen abhängig vom Alter und vom HbA1c-

Wert beeinflusst wird.

Die Auswirkung der kardiovaskulären Risikofaktoren Alter, Diabetes mellitus und Hyperglykämie auf die erythrozytäre Funktion sollen in einer klinisch-experimentellen Studie untersucht werden. Dabei sollen aufbereitete Erythrozyten verschiedener Probandengruppen in murine Herzen im Langendorff-Perfusor geladen werden.

Die Ergebnisse sollen einen wichtigen Beitrag zur translationalen Medizin leisten. Denkbar wäre ein Ergebnis, das die Grundlage für weitere Untersuchungen zu neuen Therapiemöglichkeiten eines akuten Myokardinfarktes darstellt. Speziell sollen Patientengruppen identifiziert werden, die von neuen Therapieoptionen profitieren können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
ABL800 FLEX Blutgasanalysator	Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dänemark
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Einhängethermostat E100	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda
Farbkamera HV-C20AMP	Hitachi, Tokyo, Japan
Feinwaage	Sartorius Lab Instruments GmbH Co.KG, Göttingen
HSE Stimulator P	Hugo Sachs Elektronik, March
IKAMAG RET Magnetrührer und - Schüttler	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Kaltlichtquelle Mikroskop KL1500LCD	Leica Microsystems, Wetzlar
Laborwaage	Sartorius Lab Instruments GmbH Co.KG, Göttingen
Langendorff-Perfusor (Apparatus Isolated Heart, Size 1)	Hugo Sachs Elektronik, March
Leica MZ6 Stereomikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Manometer	Bosch + Sohn, Jungingen
MIKRO 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Millipore Milli-Q Reference Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore, Darmstadt
Nikon SMZ645 Mikroskop	Nikon, Tokyo, Japan
Pipettierhilfe Eppendorf Research 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Eppendorf Research 10ml	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Umlaufkühler UK 12/600	Behr Labor Technik, Düsseldorf
Wasserbad, Immersion Thermostat Lauda E100	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda
WTW - pH-Meter	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim

#### 2.1.2 Verbrauchs- und sonstige Materialien

Tabelle 2: Übersicht über das Verbrauchs- und sonstige Material

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 ml Eppendorfgefäß (weiß/braun)	Eppendorf AG, Hamburg

2 ml Eppendorfgefäß	Eppendorf AG, Hamburg
3M™ Durapore™ Kunstseidenpflaster	3M Deutschland GmbH, Neuss
3-Wege-Hahn (Discofix C)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aortenkanüle	Hugo Sachs Elektronik, March
BD Eclipse™ Needle 25G x 5/8	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
BD Microlance™ 3 20G 1½	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
BD Vacutainer Safety-Lok 21 G x ¾“ x 12“	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
BD Vacutainer® Heparinröhrchen, Lithium-Heparin, 6ml	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Deckgläser (24 x 60 mm)	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde
Einmal – Feindosierungsspritze mit integrierter Kanüle (Omnican F)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
ES-Kompressen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Faden Seraflex 5/0	SERAG Wiessner, Naila
Membranfilter 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Mikrotom Klingen Typ A 22	FEATHER, Japan
Objektträger (76 x 26 x 1 mm)	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde
Perfusor	Infors AG, Basel, Schweiz
Pipettenspitzen 1000 µl TipOne® Filterspitze	Starlab International GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen 10ml	Eppendorf AG, Hamburg
Präparationsbesteck	Fine Science Tools (FST) GmbH, Heidelberg
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

### 2.1.3 Arzneimittel, Chemikalien, Gase

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Arzneimittel, Chemikalien und Gase**

Name	Hersteller
2,3,5 – Triphenyltetrazoliumchlorid (C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Carbogen Lab	Linde AG, Pullach
D – (+) – Glukose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Flüssiger Stickstoff	Linde AG, Pullach
Heparin – Natrium Injektionslösung 25.000 i.E.	Rotexmedica, Trittau
Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, KMF Laborchemie Hands GmbH, Lohmar

Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Ketanest 25 mg/ml 1:10	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Kodan Tinktur forte, farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rompun 2%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen

## 2.1.4 Programme

**Tabelle 4: Übersicht über genutzte Computerprogramme**

Programm	Hersteller
DISKUS - Mikroskopische Dokumentation	Hilgers, Königswinter
DISKUS.view - Mikroskopische Diskussion	Hilgers, Königswinter
EndNote Version X9.1, 2018	Clarivate Analytics, Philadelphia, Pennsylvania, USA
GraphPad PRSIM® Version 6.01, 2012	GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, USA
lox 2.4.5.6., 2008	Emka Technologies, Paris, Frankreich
Microsoft Office 365 MSO	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

## 2.1.5 Tiere

Die Versuchstiere wurden von Janvier Labs aus Saint-Berthevin, Frankreich, erworben. Als Versuchstiere wurden C57BL/6 Wildtypmäuse verwendet, die zwischen 9-15 Wochen alt waren und deren mittleres Körpergewicht  $26 \pm 5$  g betrug. Futter und Wasser stand den Tieren durchgehend frei zur Verfügung. Nach dem Erwerb bei dem kommerziellen Züchter Janvier wurden die Mäuse in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf gemäß den nationalen und internationalen Tierschutz-Richtlinien und Standards für mindestens sieben Tage gehalten, bis sie in den Versuch eintraten. Die Organisationsnummer der Tiere lautete O 51/16. Die Berechtigung zur Tötung der Mäuse wurde am 21.02.2017 ausgestellt.

### **2.1.6 Tierbedarf**

Die Berechnung der benötigten Fallzahl für die geplante Studie basiert auf vorläufigen Daten aus unserem Labor, welche im Zusammenhang mit anderen Studien erhoben wurden. Bei einer erwarteten biologisch relevanten Effektstärke von  $d = 1,7$ , einem Signifikanzniveau von 0,05 und einer Power von 0,8 ergibt sich zur statistischen Absicherung eine nötige Gruppengröße von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. Bei insgesamt 6 verschiedenen Gruppen ergibt sich ein Gesamtbedarf von 42 Tieren.

## **2.2 Methoden**

Der Einfluss des Alters, der Erkrankung Diabetes mellitus und der Langzeitblutglukosekonzentration auf die erythrozytäre Funktion im kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden wurde am Langendorff-Transfermodell untersucht. Dazu wurden humane Erythrozyten in das Koronarsystem muriner Herzen eingebracht, welche einer globalen Ischämie und Reperfusion unterzogen wurde. Währenddessen wurden Funktionsparameter aufgezeichnet und im Anschluss die Infarktgröße bestimmt. Alle Versuche wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki sowie der geltenden Tierschutz EU-Richtlinie 2010 durchgeführt. Das Ethikvotum wurde am 10.08.2017 mit der Studiennummer 5903R und der Registrierungs-ID 2017034183 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ausgestellt.

### **2.2.1 Probengewinnung**

#### **2.2.1.1 Rekrutierung von Probanden**

Insgesamt wurde die erythrozytäre Funktion fünf verschiedener Probandengruppen miteinander verglichen. Die jungen, gesunden Probanden und die jungen Diabetiker (20 – 35 Jahre) wurden unter Studierenden und Mitarbeitern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf rekrutiert. Die älteren Probanden (> 73 Jahre) ohne und mit Diabetes mellitus kamen von den kardiologischen Stationen des Universitätsklinikums Düsseldorf. Dabei wurden die Diabetiker über 73 Jahre noch nach ihrem HbA1c-Wert > 7,5% und < 7,5% unterteilt. Die Probanden wurden durch eine Prüffärztin ausführlich aufgeklärt und willigten schriftlich in die Blutentnahme ein.

### 2.2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Um die Gruppen vergleichbar zu machen, wurden Ein- und Ausschlusskriterien formuliert. Übersichtshalber werden diese in den Tabellen 5-9 aufgeführt.

**Tabelle 5: Junge, gesunde Probanden (Kontrolle < 40 J, n = 8)**

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"><li>• Männliche und weibliche Probanden ohne Lungen-, Herz/Kreislauf- und Stoffwechsel-Erkrankungen in der Vorgeschichte</li><li>• Alter zwischen 18 und 40 Jahren</li><li>• Keine regelmäßige Medikamenteneinnahme (außer Anti-Baby-Pille)</li><li>• Schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie</li></ul>
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alter &lt; 18 Jahre oder &gt; 40 Jahre</li><li>• Lungen-, Herz/Kreislauf- und Stoffwechselerkrankungen in der Vorgeschichte</li><li>• Regelmäßige Einnahme von Medikamenten für Herz, Lunge und Stoffwechsel</li><li>• Fehlende Einwilligung zur Studienteilnahme</li><li>• Fehlende Bereitschaft und Fähigkeit an der Studie teilzunehmen</li></ul>

**Tabelle 6: Junge Diabetiker (DM < 40 J, n = 6)**

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alter zwischen 18 und 40 Jahren</li><li>• Männliche und weibliche Patienten mit medikamentös behandelten Diabetes mellitus</li><li>• Schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie</li></ul>
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alter &lt; 18 Jahren oder &gt; 40 Jahren</li><li>• Kein medikamentös behandelter Diabetes mellitus</li><li>• Fehlende Einwilligung zur Studienteilnahme</li><li>• Fehlende Bereitschaft und Fähigkeit an der Studie teilzunehmen</li></ul>

**Tabelle 7: Alte Probanden ohne Diabetes mellitus (Kontrolle > 73 J, n = 7)**

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alter &gt;73 Jahre</li><li>• Männliche und weibliche Probanden ohne Diabetes mellitus</li><li>• Schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie</li></ul>
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vorliegen eines Diabetes mellitus</li><li>• Alter &lt; 73 Jahre</li><li>• Fehlende Einwilligung zur Studienteilnahme</li><li>• Fehlende Bereitschaft und Fähigkeit an der Studie teilzunehmen</li></ul>

**Tabelle 8: Alte Diabetiker mit einem HbA1c < 7,5% (DM HbA1c < 7,5, n = 7)**

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alter &gt; 73 Jahre</li> <li>• Vorliegen eines medikamentös behandelten Diabetes mellitus Typ II</li> <li>• HbA1c &lt; 7,5%</li> <li>• Schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie</li> </ul>
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HbA1c &gt; 7,5%</li> <li>• Alter &lt; 73 Jahre</li> <li>• Kein medikamentös behandelter Diabetes mellitus</li> <li>• Fehlende Einwilligung zur Studienteilnahme</li> <li>• Fehlende Bereitschaft und Fähigkeit an der Studie teilzunehmen</li> </ul>

**Tabelle 9: Alte Diabetiker mit einem HbA1c > 7,5% (DM HbA1c > 7,5, n = 8)**

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alter &gt; 73 Jahre</li> <li>• Vorliegen eines medikamentös behandelten Diabetes mellitus Typ II</li> <li>• HbA1c &gt; 7,5%</li> <li>• Schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie</li> </ul>
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HbA1c &lt; 7,5%</li> <li>• Alter &lt; 73 Jahre</li> <li>• Kein medikamentös behandelter Diabetes mellitus</li> <li>• Fehlende Einwilligung zur Studienteilnahme</li> <li>• Fehlende Bereitschaft und Fähigkeit an der Studie teilzunehmen</li> </ul>

### 2.2.1.3 Blutentnahme und Aufbereitung

Den Probanden wurden je zwei Heparinröhrchen (10-12 ml) Blut aus einer peripheren Vene abgenommen. Anschließend wurde das Blut ins Labor transportiert und auf Eis gelagert, bis es weiterverarbeitet wurde. Das Vollblut wurde in vier 2 ml - Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert, die zuvor mit Heparin benetzt wurden, und bei 4°C und 830 g für zehn Minuten in der Zentrifuge 5417R (Eppendorf Ag, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand (das Plasma inklusive des *Buffy White Coats*, bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten) wurde abpipettiert und die Erythrozyten mit *Krebs-Henseleit Buffer* (KHB) aufgefüllt und durch Invertieren gemischt. Der erneute Zentrifugiervorgang mit gleicher Einstellung der Zentrifuge war der erste Waschgang. Anschließend wurde der Überstand wieder abpipettiert, die Erythrozyten erneut mit KHB aufgefüllt, das Eppendorfgefäß invertiert und wieder zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschgang wurde durch Verdünnung mit KHB ein 40%iger Hämatokrit eingestellt. So wurden in einem 1,5 – ml – Eppendorfgefäß

auf 400 µl Erythrozyten 600 µl KHB gegeben. Bis zur Erwärmung vor dem Laden der aufbereiteten Erythrozyten in das Mäuseherz wurden die Proben auf Eis gelagert.

## 2.2.2 Langendorff-Transfermodell

### 2.2.2.1 Herstellung von modifiziertem Krebs-Henseleit Puffer (KHB)

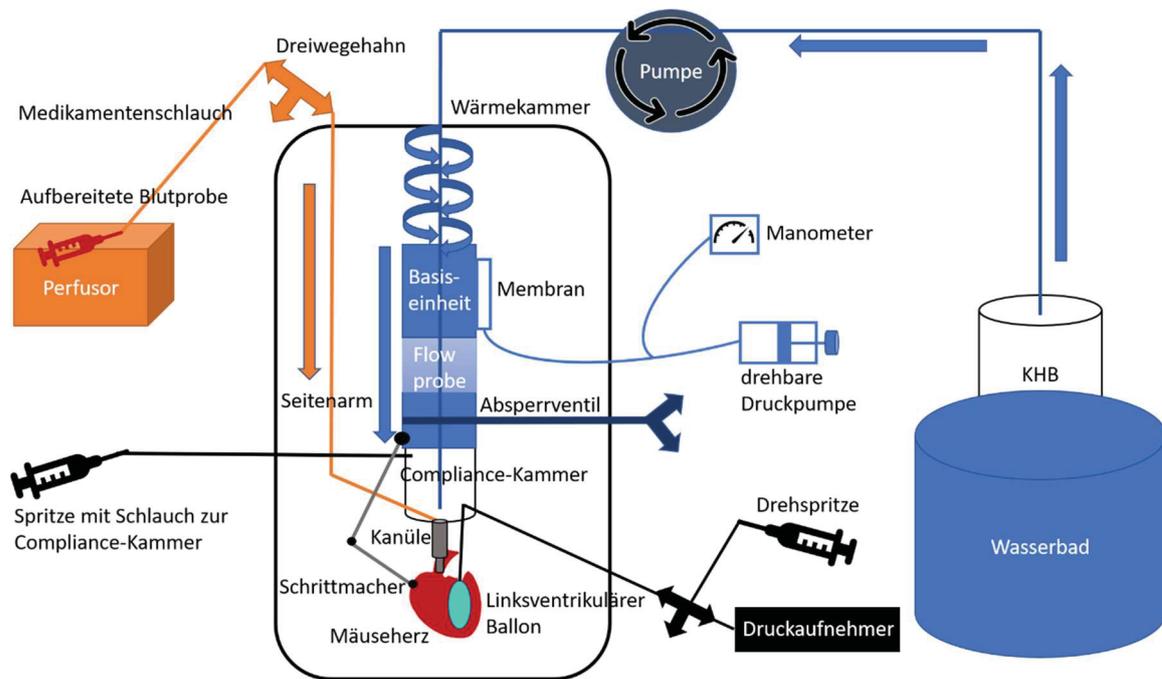
Zur Herstellung des modifizierten Krebs-Henseleit Puffers (KHB) wurden 118 mM Natriumchlorid (NaCl), 4,7 mM Kaliumchlorid (KCl), 0,8 mM Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>), 25 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>), 1,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 5,0 mM Glukose und 110,0 mM Pyruvat mithilfe des IKAMAG RET Magnetrührers in Millipore-gefiltertem H<sub>2</sub>O gelöst. Währenddessen wurde die Lösung mit Carbogen, bestehend aus 95% Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), für 15 Minuten begast, sodass sich ein pH von 7,4 einstellte. Erst im Anschluss wurden 2,5 mM Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) hinzugegeben, um der Bildung von Kalziumpräzipitationen vorzubeugen. Da der KHB frei von Staubpartikeln sein sollte, wurde die Lösung durch ein 0,45 µm Vakuum Filter System gefiltert. KHB konnte maximal zwei Tage bei 4°C gelagert werden.

**Tabelle 10: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Buffers (KHB)**

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

### 2.2.2.2 Aufbau und Vorbereitung des Langendorff-Perfusors

Der Aufbau des Langendorff-Perfusors ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. In Abbildung 2 sieht man ein Foto mit Beschriftung der einzelnen Komponenten der Langendorff-Apparatur und in Abbildung 3 ist eine Detailaufnahme des Mäuseherzens im Perfusor abgebildet.



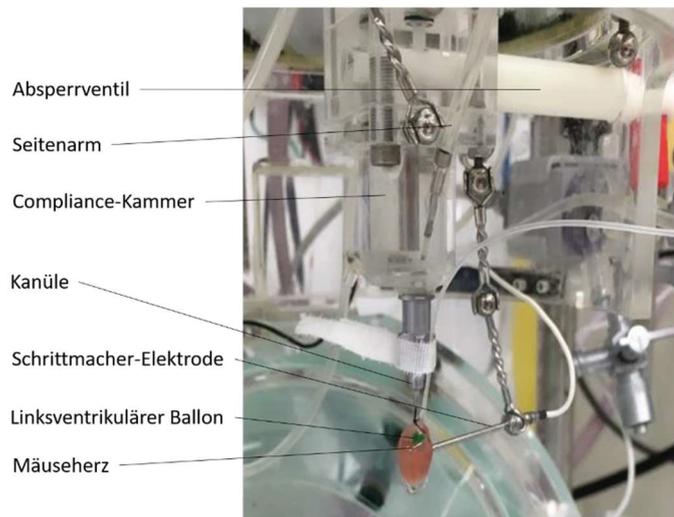
**Abb. 1: Schemazeichnung des Langendorff-Perfusors.** Über die Rollpumpe wurde der im Wasserbad erwärmte KHB in das Schlauchsystem der Wärmekammer gepumpt. Über den Seitenarm wurde die aufbereitete Blutprobe in das Herz eingebracht.

Der KHB wurde im Wasserbad (Lauda GmbH & Co. KG, Lauda), das mithilfe eines Einhängethermostats (E100, Lauda GmbH & Co. KG, Lauda) auf eine Temperatur von 38,5°C gebracht wurde, erwärmt und über eine Fritte mit Carbogen (bestehend aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) oxygeniert (zur besseren Übersicht wurde diese in die Schemazeichnung nicht eingezeichnet). Anschließend wurde der erwärmte KHB über die Rollpumpe in das Schlauchsystem der Wärmekammer gepumpt, wo es nach der Passage der Schläuche mit einer Temperatur von 37°C ankam. Das Mäuseherz befand sich innerhalb dieser Wärmekammer, um Temperaturschwankungen, die den Versuch beeinflussen könnten, vorzubeugen. Das Herzstück der Langendorff-Anlage war der Aortenblock, welcher sich ebenfalls innerhalb der Wärmekammer befand. Der Aortenblock bestand aus der Basis-einheit, der *Flow probe*, dem Absperrventil und der Compliance-Kammer. Die Teflonmembran, die drehbare Druckpumpe und das Manometer bildeten die Einheit, die die druckkonstante Perfusion gewährleistete. Über das Manometer ließ sich der Aortendruck manuell einstellen. Über die *Flow probe* wurde der Fluss gemessen. Am Absperrventil ließ sich die Flussrichtung des KHB einstellen. Dabei gab es zwei Möglichkeiten: Entweder floss KHB Richtung Compliance-Kammer und Herz oder über einen Überlauf zurück in den KHB-Vorrat im Wasserbad (übersichtshalber wurde der Überlauf nicht eingezeichnet). Die Compliance-Kammer konnte über eine Spritze gespült und gefüllt werden und diente dazu, eine gleichmäßige und luffreie Perfusion zu

gewährleisten. Direkt darunter wurde die Kanüle mit anhängendem Mäuseherz eingebracht. Über den eröffneten linken Vorhof wurde ein wassergefüllter Ballon (Eigenbau) durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt. Der mit dem Ballon verbundene Druckaufnehmer leitete die gemessenen Druckwerte an das Computersystem weiter, das den entwickelten linksventrikulären Druck (LVDP) und den enddiastolischen linksventrikulären Druck (LVEDP) registrierte und aus diesen Werten die Ableitung der maximalen Kontraktions- ( $+dP/dt$ ) und Relaxationsgeschwindigkeit ( $-dP/dt$ ) in mmHg/s und die Herzfrequenz bestimmen konnte. Die gemessenen und berechneten Parameter wurden mit der Dokumentations-Software IOX (Emka Technologies, Paris, Frankreich) auf einem Monitor angezeigt und konnten dann zur weiteren Auswertung verwendet werden. Die in einer Spritze befindliche aufbereitete Blutprobe wurde in den Perfusor eingebracht und mit dem Medikamentenschlauch verbunden. Über einen Dreiwegehahn war dieser mit dem Seitenarm verbunden, der direkt oberhalb der Kanüle endete und somit direkt zum Herzen führte.



**Abb. 2: Versuchsaufbau des Langendorff-Perfusors im kardiologischen Labor der Heinrich-Heine-Universität.** Die einzelnen Bestandteile der Langendorff-Apparatur (Hugo Sachs Elektronik, March) werden im Text näher erläutert.



**Abb. 3: Detailaufnahme des Mäuseherzens im Langendorff-Perfusor.**

Zur Vorbereitung wurde 1 l KHB im Wasserbad auf 38,5°C erwärmt und mit Carbogen für mindestens 20 Minuten begast. Nach zehn Minuten wurde die Pumpe des Langendorff-Perfusors angestellt und die Compliance-Kammer mithilfe einer Spritze gespült und gefüllt. Auch der Medikamentenschlauch, der über einen Dreiwegehahn mit dem Seitenarm verbunden war, musste mit KHB durchgespült und befüllt werden. Um druckkonstante Bedingungen zu schaffen, wurde der Aortendruck über das Manometer auf 100 mmHg eingestellt. Zur Vorbereitung des Versuchsbogens wurden der Versuchsname, das Datum, der Nullfluss, das Gewicht und der Genotyp der Maus und Informationen über die verwendeten Erythrozyten dokumentiert.

### **2.2.2.3 Präparation der murinen Herzen**

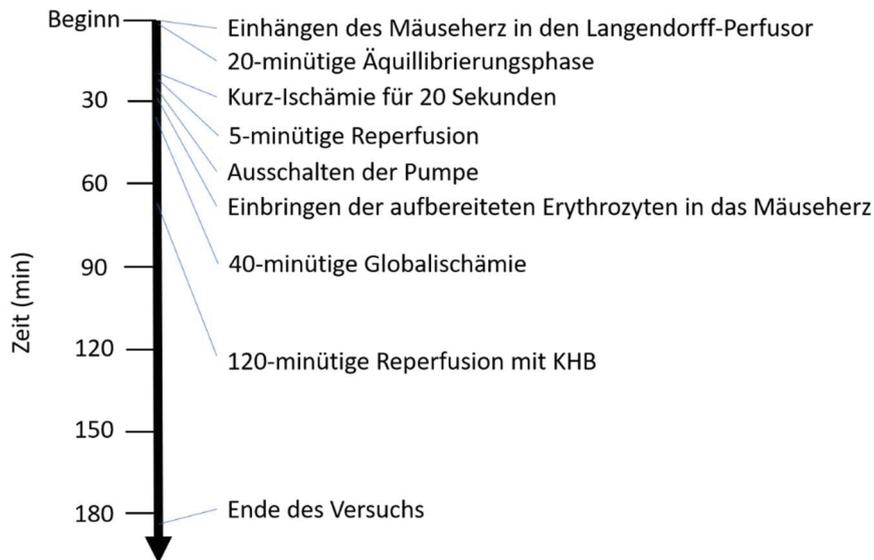
Vor der Durchführung der Präparation wurden die Mäuse mit 50 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin (Pfizer) und 40 mg/kg KG Xylazin (Bayer) intraperitoneal narkotisiert. Mit dem Zwischenzehenreflex wurde geprüft, ob die Narkose ausreichend tief war. Dabei wurde der Maus in die Haut zwischen den Zehen gekniffen. Wenn sie das Bein reflexartig anzog, war die Narkose noch nicht tief genug, fand keine Reaktion statt, konnte mit dem Eingriff begonnen werden. Zwei Minuten vor Präparationsbeginn wurden 1000 IE Heparin intraperitoneal injiziert, um koronare Thromboembolien zu verhindern. Nachdem der Brustbereich der Maus rasiert wurde, wurde die Maus auf den Präparationstisch geklemmt. Zunächst wurde ein vertikaler Hautschnitt über dem Sternum vorgenommen, dann ein waagerechter Schnitt unterhalb des Sternums. Nach Einschnitt des Diaphragmas wurden zwei Entlastungsschnitte links und rechts in Richtung der Achseln getätigt, sodass sich das Brustbein nach oben klappen ließ. Der Gefäßstrang mit Aorta und Vena cava inferior wurde

unterhalb des Herzens mit der Pinzette gefasst und mit der Schere durchtrennt. Indem mit der Schere direkt entlang der Wirbelkörper geschnitten wurde, konnte das Thorax-Organpaket inklusive Herz und Lungen vollständig herausgenommen werden. Unmittelbar im Anschluss wurde das Paket aus Herz, Lungen, Thymus, Trachea und Ösophagus in 4°C kaltes Perfusat (KHB) in die Kaltschale des Umlaufkühlers UK 12/600 (Behr Labor Technik, Düsseldorf) gelegt. Die Lungen wurden abgeschnitten. Anschließend wurden unter dem Mikroskop (Nikon SMZ645, Tokyo, Japan) die beiden Vorhöfe eröffnet. Thymus, Trachea und Ösophagus wurden entfernt und die Aorta freipräpariert. Diese wurde dann proximal des Abgangs des Truncus brachiocephalicus abgetrennt und mithilfe von zwei Pinzetten auf die Aortenkanüle (Hugo Sachs Elektronik, March), die vorher entlüftet werden musste, aufgezogen. Mit dem Seraflex 5/0 Faden (SERAG Wiessner, Naila) wurde die Aorta ascendens in einer Nut auf der Kanüle festgeknotet. Insgesamt durfte die Zeit der Präparation acht Minuten nicht überschreiten.

#### **2.2.2.4 Durchführung an der Langendorff-Anlage**

Bevor die Kanüle mit dem Mäuseherz in den Langendorff-Perfusor gesteckt wurde, wurde das Absperrventil so gedreht, dass die Perfusionslösung Richtung Herz floss. Einige Tropfen sollten auf die Kanüle fließen, bevor sie aufgesteckt wurde, damit eine luftfreie Perfusion gewährt werden konnte. Die Aortenklappe blieb aufgrund des Druckes geschlossen, während die rechte und linke Koronararterie perfundiert wurden. Sobald das Herz wieder anfang zu schlagen, wurde im Computerprogramm IOX 2.4.5.6. (Emka Technologies, Paris, Frankreich) der Versuch gestartet. Nun wurde der wassergefüllte Ballon für die Druckmessung über den eröffneten linken Vorhof durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) konnte über die Wasserfüllung des Ballons gemessen und mittels Drehspritze kontrolliert werden. Zu Beginn des Versuchs wurde der LVEDP auf einen Wert zwischen 5 - 15 mmHg eingestellt. Außerdem wurde eine Schrittmacher-Elektrode mit der Herzoberfläche in Kontakt gebracht, um eine Frequenz von etwa 600 *bpm* (*beats per minute*) bei 2,5 V zu gewährleisten, die der natürlichen Frequenz des Mäuseherzens *in vivo* entsprach. Anschließend wurden folgende Parameter, die das Computerprogramm aufzeichnete, erstmals auf dem Versuchsbogen dokumentiert: der linksventrikuläre Druck (LVDP), die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (+dP/dt), der enddiastolische Druck (LVEDP), die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (-dP/dt), die koronare Flussrate und die Herzfrequenz. Entsprachen die Parameter den Einschlusskriterien (siehe 2.2.2.5), wurde nun die aufbereitete Blutprobe mithilfe des Thermomixers 5436 (Eppendorf AG, Hamburg)

für 25 Minuten auf 38,5°C erwärmt. Nach einer 20-minütigen Äquillibrierungsphase und erneuter Dokumentation der Parameter, wurde eine 20-sekündige Kurzischämie eingeleitet, um die Koronarreserve zu überprüfen. Dafür wurde das Absperrventil so gedreht, dass der Fluss nicht mehr Richtung Compliance-Kammer und Herz erfolgte, sondern in den Überlauf. Stieg der koronare Fluss bei der Reperfusion um mehr als 60% des Ausgangswertes, war die Koronarreserve ausreichend und nicht von einer relevanten Leckage im Bereich der Aorta ascendens auszugehen. Während der fünf-minütigen Reperfusion, wurden die erwärmten Erythrozyten in eine mit Heparin benetzte 1 ml Spritze aufgezogen, die dann in den Perfusor gesteckt wurde. Bevor das Absperrventil so gedreht wurde, dass das Herz nicht mehr perfundiert wurde, wurden die *Baseline*-Werte dokumentiert. Anschließend wurde das Herz für eine Minute mit den über 25 Minuten erwärmten aufbereiteten Erythrozyten über den Medikamentenschlauch und den Seitenarm perfundiert, sodass diese während der Ischämie in den Koronargefäßen des Mäuseherzens verweilten. Zu Beginn der 40-minütigen Globalischämie wurde die Pumpe ausgestellt und der Aortendruck auf 0 mmHg eingestellt. Zur Gewährleistung einer warmen Ischämie wurde das Mäuseherz im Langendorff-Perfusor in ein Becherglas mit erwärmten KHB eingetaucht. Fünf Minuten vor Ende der Ischämie wurde die Pumpe wieder eingeschaltet, damit bereits zu Beginn der Reperfusion warmer, frisch oxygenierter KHB in das Herz gelangte. In dieser Zeit verhinderte das zugedrehte Absperrventil eine Perfusion des Herzens. Zur zweistündigen Reperfusion wurde der Aortendruck wieder auf 100 mmHg gestellt, das Becherglas mit KHB entfernt und das Absperrventil wieder in Richtung Herz gedreht. Während der Reperfusion wurden die Messparameter zu Minute 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 120 dokumentiert. Auch wurde die Minute dokumentiert, zu der das Herz wieder mit 600 bpm schlug. Abbildung 4 zeigt einen Zeitstrahl zur Veranschaulichung des Versuchsablaufs. Nach der 120-minütigen Reperfusionsphase wurde das Absperrventil erneut gedreht und die Pumpe ausgestellt. Das Herz wurde mithilfe einer Pinzette von der Kanüle entfernt, gewogen und anschließend für mindestens eine Stunde in eine Frischhaltefolie gewickelt bei -20°C tiefgefroren.



**Abb. 4: Übersicht über die zeitliche Abfolge des Langendorff - Versuchs**

### 2.2.2.5 Ausschlusskriterien für die Mäuseherzen

Um die Versuche vergleichbar zu machen, wurden Kriterien formuliert, die die Herzen erfüllen mussten, um eingeschlossen zu werden. Die Präparationszeit der Herzen durfte acht Minuten nicht überschreiten. Die *Baseline*-Werte der Funktionsparameter mussten einen bestimmten Wert einnehmen: Der koronare Fluss sollte zwischen 1 ml/min bis 4 ml/min liegen, der linksventrikuläre Druck musste mindestens 50 mmHg betragen, während die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit mindestens 3500 mmHg/s und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit mindestens - 2500 mmHg/s betragen sollte. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck sollte zwischen 5-15 mmHg liegen. Der Spitzenfluss nach der Kurzischämie sollte sich um mindestens 60% des Ausgangswertes erhöhen. Die Herzfrequenz sollte 590 – 610 bpm mithilfe des Schrittmachers erreichen. Erreichten die murinen Herzen in der Langendorff-Anlage die Kriterien nicht, wurden sie von der Auswertung ausgeschlossen.

### 2.2.3 Bestimmung der Infarktgröße

#### 2.2.3.1 Herstellung der Triphenyltetrazoliumchlorid Farblösung (TTC)

Um die Infarktgröße zu ermitteln, wurden die Mäuseherzen mit einer TTC-Farblösung angefärbt. Zur Herstellung der Farblösung wurden zunächst zwei Pufferlösungen hergestellt. Für die Herstellung des basischen Puffers 1 wurden 14,2 g Di-

Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) auf 1 l Millipore-gefiltertes Wasser gegeben, für die des sauren Puffers 2 wurden 6 g Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) auf 0,5 l Millipore-gefiltertes Wasser gegeben. Um die Pufferlösung fertigzustellen, wurden anschließend 80% des basischen Puffers und 20% des sauren Puffers vermischt. Ein pH von 7,4 musste durch Zumischen des jeweiligen Puffers eingestellt werden. Der TTC-Puffer konnte in einem braunen geschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur gelagert werden. Um die 1%ige TTC-Farblösung herzustellen, wurden 100 mg TTC-Pulver mit 10 ml des Puffergemisches verrührt, bis sich das TTC aufgelöst hatte. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Lösung musste diese umgehend in lichtgeschützte Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt werden, 0,5 ml pro Gefäß, die dann im Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg) auf 38°C erwärmt wurden. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit wurde die Farblösung für jeden Versuch neu hergestellt.

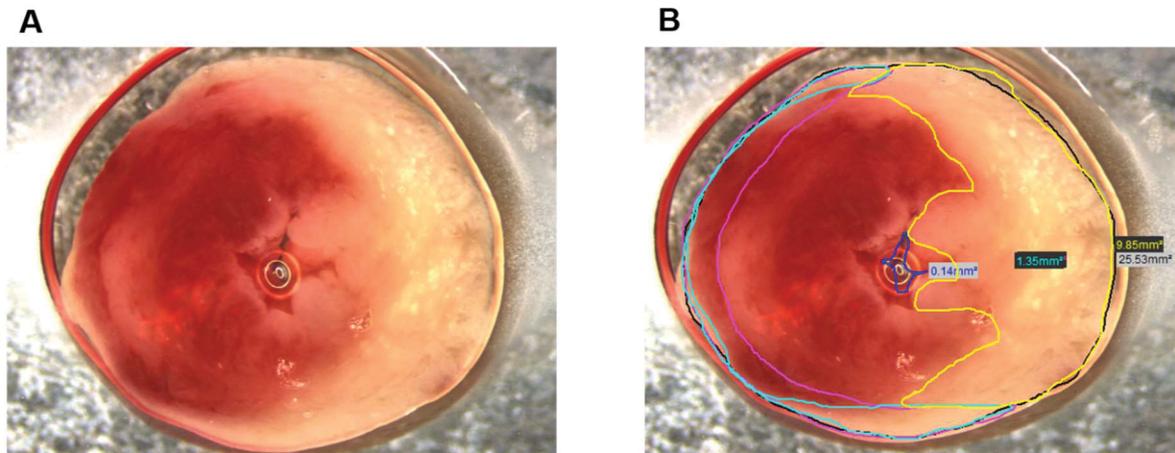
### **2.2.3.2 Färbung der Mäuseherzen**

Das bei -20°C tiefgefrorene Herz wurde mithilfe einer Rasierklinge in sechs ein Millimeter dicke transversale Scheiben geschnitten, die anschließend gewogen und in je ein braunes Eppendorf Reaktionsgefäß mit TTC-Lösung gegeben wurden. Im Heizblock wurden die Scheiben dann für mindestens zwei Minuten bei 38°C inkubiert. Das TTC durchdringt die Zellmembran und bindet an intrazelluläre Dehydrogenasen vitaler Zellen mit konservierten NADPH als Reduktionspotential [92]. In der Zelle wird TTC als Wasserstoffakzeptor durch die Dehydrogenasen und Coenzyme reduziert, sodass ein roter unlöslicher Formazan-Niederschlag entsteht. Das vitale Gewebe erscheint rot. Da die Zellmembran der nicht vitalen Zellen nicht mehr intakt ist, werden Enzyme und Coenzyme ausgewaschen und das Infarktareal bleibt hell [80].

### **2.2.3.3 Ausmessen des Infarktareals**

Die gefärbten Schnitte des Mäuseherzens wurden auf einem Objektträger platziert und mit einem Deckglas abgedeckt. Mit einer *live* Kamera (Farbkamera HV-C20AMP, Hitachi, Tokyo, Japan) wurde von jedem Schnitt ein Bild in voller Auflösung erzeugt. Das Programm DISKUS (Mikroskopische Dokumentation, Königswinter) zeigte die erzeugten Bilder dann digital an (Abbildung 5 (A)). Mithilfe von DISKUS.view (Mikroskopische Diskussion, Königswinter) wurde das Infarktareal planimetrisch bestimmt (Abbildung 5 (B)) und die ausgemessenen Areale in eine vorgedruckte Tabelle eingetragen. Dabei wurden die Gesamtfläche, die Fläche des rechten Ventrikelmyokards, und jeweils die infarzierte Fläche des rechten und linken Ventrikels bestimmt. Unter Einbezug der Gesamtfläche, der

Fläche des rechten und linken Ventrikels, der Infarktflächen des rechten und linken Ventrikels und des Gewichts des jeweiligen Schnittes wurde anschließend der prozentuale Anteil des Infarktes am Gesamtgewebe mithilfe von Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) ermittelt.



**Abb. 5: Beispiel eines TTC-gefärbten Schnittes eines Mäuseherzens**

(A) Auf dem Foto sieht man einen TTC-gefärbten Schnitt eines Mäuseherzens, welches im Langendorff-Perfusor mit KHB beladen wurde. (B) Hier wurde mittels DISKUS.view das Infarktareal in mm<sup>2</sup> ausgemessen. Umrandet sind die Gesamtfläche in schwarz, der rechte Ventrikel in violett, die linksventrikuläre Infarktfläche in gelb und die rechtsventrikuläre Infarktfläche in türkis.

#### **2.2.4 Blutgasanalyse (BGA)**

Um nachzuweisen, dass sich die Glukosekonzentrationen in den aufbereiteten Proben nicht unterschieden, wurde eine Blutgasanalyse der aufbereiteten Blutproben der jungen, gesunden Probanden und der alten, schlecht eingestellten Diabetiker durchgeführt. Dazu wurden jeweils die aufbereiteten Blutproben (siehe 2.2.1.3) 25 Minuten im Thermomixer 5436 (Eppendorf Ag, Hamburg) auf 38°C erwärmt und in eine 1 ml - Spritze, die mit Heparin benetzt wurde, gefüllt. Anschließend wurde das Blut am Blutgasanalysator (ABL800 FLEX, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dänemark) der experimentellen Anästhesie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf analysiert und so die Glukosekonzentration (cGluc) bestimmt.

## 2.3 Statistik

Für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism (Version 6.01, Graphpad Software, Kalifornien, USA) verwendet. Da der LVEDP zu Beginn des Versuchs auf 5-15 mmHg eingestellt wurde, wurde der LVEDP nach 60 Minuten Reperfusion direkt miteinander verglichen. Bei den anderen Parametern (LVDP, +dP/dt, -dP/dt und koronare Flussrate) wurde die prozentuale Erholung nach 60-minütiger Reperfusion im Vergleich zu den *Baseline*-Werten vor der Ischämie bestimmt. Die ermittelte Infarktgröße wurde als prozentualer Anteil vom Gesamtgewebe angegeben. Von den ermittelten Ergebnissen der Langendorff-Versuche, der TTC-Färbungen, als auch der Glukosekonzentrationen wurde jeweils der Mittelwert (MW) mit der entsprechenden Standardabweichung (SD) berechnet. Wurden zwei Gruppen untereinander verglichen, wurde ein t-Test angewandt. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte die Auswertung mit einer Varianzanalyse (*one-way ANOVA*). Als *post-hoc* Test wurde der *Tukey's multiple comparison* Test angewandt. Unterschiede zwischen nominalen Variablen (Geschlecht) wurden mittels Kreuztabelle und Chi-Quadrat Test berechnet. Für die Korrelation zwischen der Infarktgröße und dem HbA1c-Wert wurde eine lineare Regression angewandt. Betrag der p-Wert weniger als 0,05, wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientencharakteristika

In dieser Arbeit wurde die erythrozytäre Funktion einer Kontrollgruppe und vier verschiedener Patientengruppen untersucht. Die Kontrollgruppe (Kontrolle < 40 J) bestand aus gesunden männlichen und weiblichen Probanden unter 40 Jahren ohne Vorerkrankung und ohne regelmäßige Medikamenteneinnahme mit Ausnahme der Antibabypille. Unter den Patientengruppen gab es eine Gruppe junger Diabetiker unter 40 Jahren (DM < 40 J) und drei Patientengruppen über 73 Jahren, darunter eine Gruppe ohne Diabetes mellitus (Kontrolle > 73 J) und zwei Gruppen mit Diabetes mellitus. Von den alten Diabetikern war eine Gruppe medikamentös gut eingestellt (DM HbA1c < 7,5) und eine schlecht eingestellt (DM HbA1c > 7,5). Als *Cut-off* für eine gute oder schlechte Blutzuckereinstellung wurde der HbA1c-Wert 7,5% gewählt. In Tabelle 11, 12 und 13 sind die Charakteristika der Probanden dargestellt. Um valide Ergebnisse zu generieren, die tatsächlich auf die untersuchten Parameter, Alter, Diabetes mellitus und die Langzeitblutzuckereinstellung zurückzuführen sind, sollten möglichst viele Störfaktoren ausgeschlossen werden. Deshalb wurden die Probanden so gewählt, dass sich das Alter, das Geschlecht, der *Body Mass Index* (BMI), die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) zur Beurteilung der Nierenfunktion und der Hämoglobin – Wert (Hb) zwischen den Gruppen nicht unterschieden. Auch die Medikation der Probanden und das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit (KHK) wurden berücksichtigt. Die Gruppen der alten Probanden unterschieden sich nur in dem Langzeitblutglukosewert (HbA1c) ( $5,1 \pm 0,6$  % (Kontrolle > 73 J) vs.  $6,6 \pm 0,5$  % (DM HbA1c < 7,5) vs.  $8,2 \pm 0,7$  % (DM HbA1c > 7,5),  $p < 0,0001$ ).

**Tabelle 11: Patientencharakteristika der Probanden unter 40 Jahren.**

	<b>Kontrolle &lt; 40 J</b>	<b>DM &lt; 40 J</b>	<b>p-Wert</b>
n=	8	6	
Alter (Jahre)	$25 \pm 3$	$25 \pm 5$	0,8
Männlich (n, %)	3 (38%)	2 (33%)	0,87
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	$23 \pm 2$	$23 \pm 3$	0,9
HbA1c (%)		$6,4 \pm 0,9$	

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Zur statistischen Auswertung des Alters und des BMIs wurde ein t-Test angewandt. Die statistische Auswertung des Geschlechteranteils wurde mittels Chi-Quadrat berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen. Kontrolle < 40 J = junge, gesunde Probanden, DM < 40 J = junge Diabetiker.

**Tabelle 12: Patientencharakteristika der Probanden über 73 Jahren.**

	Kontrolle > 73 J	DM HbA1c < 7.5	DM HbA1c >7.5	p-Wert
n=	7	7	8	
Alter (Jahre)	83 ± 4	78 ± 4	80 ± 4	0,09
Männlich (n, %)	3 (43%)	2 (29%)	6 (75%)	0,18
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25 ± 2	24 ± 3	26 ± 4	0,4
GFR (ml/min)	43 ± 12	46 ± 19	55 ± 19	0,4
HbA1c (%)	5,1 ± 0,6	6,6 ± 0,5	8,2 ± 0,7	<0,0001
Hb (g/dl)	11,9 ± 2,2	10,4 ± 1,4	12,3 ± 1,8	0,14
KHK (n)	7	5	6	

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD). Zur statistischen Auswertung des Alters, des BMIs, der GFR, des HbA1c und des Hb-Wertes wurde eine *one-way* ANOVA durchgeführt. Der p-Wert beim Anteil männlicher Probanden wurde statistisch mit einem Chi-Quadrat Test berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen. Weiterhin wird aufgeführt, wie viele Probanden eine koronare Herzkrankheit (KHK) hatten. Kontrolle > 73 J = alte Probanden ohne Diabetes, DM HbA1c < 7,5 = alte, gut eingestellte Diabetiker, DM HbA1c > 7,5 = alte, schlecht eingestellte Diabetiker.

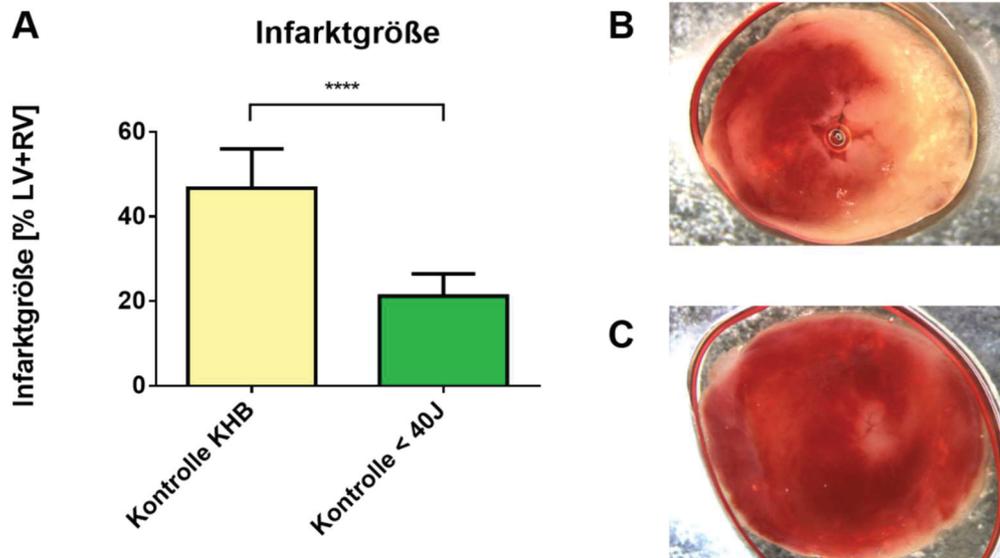
**Tabelle 13: Übersicht über die Medikamenteneinnahme der Probanden.**

	Kontrolle > 73 J	DM HbA1c < 7.5	DM HbA1c >7.5
n=	7	7	8
ASS	86%	0	38%
Clopidogrel	57%	29%	25%
Ticagrelor	14%	0	0
Heparin	14%	29%	0
Marcumar	43%	71%	25%
Apixaban	0	14%	13%
Rivaroxaban	0	14%	38%
Insulin	0	43%	100%
Metformin	0	14%	50%
DPP-4-Inhibitoren	0	43%	0

Dargestellt wird jeweils der prozentuale Anteil der Probanden aus der Gruppe, die das jeweilige Medikament einnehmen. Kontrolle > 73 J = Alte Probanden über 73 Jahre ohne Diabetes, DM HbA1c < 7,5 = Alte Diabetiker über 73 Jahre mit einem HbA1c-Wert unter 7,5%, DM HbA1c > 7,5 = Alte Diabetiker über 73 Jahre mit einem HbA1c-Wert über 7,5%.

### **3.2 Effekt von Erythrozyten junger, gesunder Probanden auf den kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden)**

Um die Wirkung von Erythrozyten auf den kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) zu untersuchen, wurden zunächst die postischämischen Funktionsparameter nach 60-minütiger Reperfusion sowie die Infarktgröße der Mäuseherzen miteinander verglichen, die während der 40-minütigen Ischämie im Langendorff-Perfusor mit KHB (Kontrolle KHB, n = 6) oder mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J, n = 8) beladen wurden. Zu den gemessenen hämodynamischen Parametern gehörten als Kontraktionsparameter der linksventrikuläre Druck (LVDP) und die maximale positive Druckänderung über die Zeit (+dP/dt), als Relaxationsparameter der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und die maximale negative Druckänderung über die Zeit (-dP/dt) und die koronare Flussrate. Bei Betrachtung der Ergebnisse ließ sich feststellen, dass die Erythrozyten junger, gesunder Probanden einen protektiven Effekt auf das Myokard im Rahmen des I/R-Schadens haben. Die Infarktgröße wurde nach einer 120-minütigen Erholungsphase ermittelt und als prozentualer Anteil am Gesamtgewebe des Mäuseherzens angegeben. Nach Zugabe der Erythrozyten junger, gesunder Probanden war die Infarktgröße signifikant kleiner als nach Zugabe von KHB ( $21,2 \pm 5,3\%$  vs.  $46,7 \pm 9,3\%$ ,  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 6).

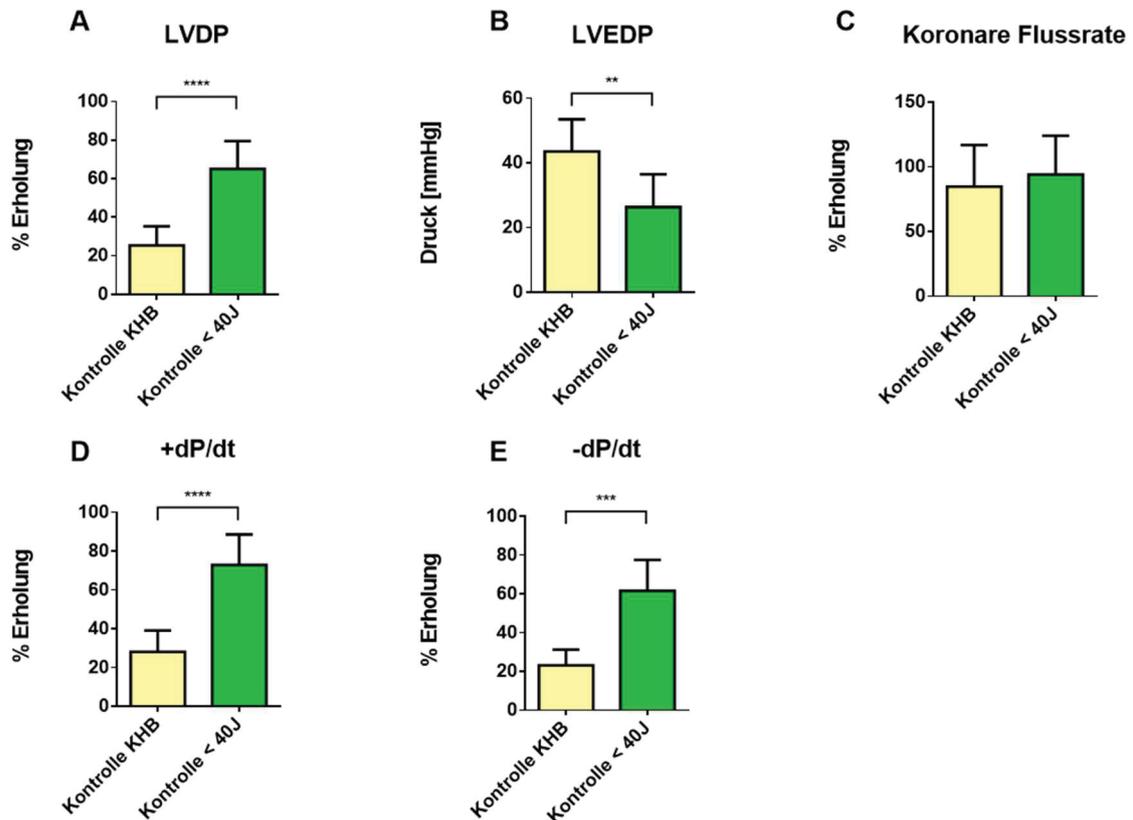


**Abb. 6: Größeres Infarktareal nach Zugabe von KHB (Kontrolle KHB) als nach Zugabe von Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40J)**

(A) Nach Zugabe von KHB (Kontrolle KHB) in das Koronarsystem muriner Herzen im Langendorff-Perfusor zu Beginn einer 40-minütigen Globalischämie ist der Infarkt des Mäuseherzens nach 120-minütiger Reperfusion mit KHB signifikant größer als nach Zugabe von Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J), ungepaarter t-Test: \*\*\*\* $p < 0,0001$ . In der Abbildung sind die Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Kontrolle KHB:  $n = 6$ , Kontrolle < 40 J:  $n = 8$ . LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel. Die Infarktgröße wurde nach 120-minütiger Reperfusion mittels TTC-Färbung ermittelt. (B) Repräsentativer Schnitt aus der Mitte eines Mäuseherzens nach Zugabe von KHB. Vitales Gewebe wird rot angefärbt, das weiße Gewebe entspricht dem Infarktareal. (C) Repräsentativer Schnitt aus der Mitte eines Mäuseherzens nach Zugabe humaner Erythrozyten junger, gesunder Probanden.

Auch die Funktionsparameter des linken Ventrikels zeigten einen kardioprotektiven Effekt nach Zugabe von Erythrozyten junger, gesunder Probanden im Vergleich zu den KHB-behandelten Herzen (Abbildung 7). Der LVDP,  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$  und die koronare Flussrate werden als prozentuale Erholung nach 60-minütiger Reperfusion angegeben. Dabei wurde aus den Werten nach 60 Minuten Reperfusion der Anteil von den *Baseline*-Werten in Prozent berechnet. Nach Zugabe von Erythrozyten junger, gesunder Probanden war die Erholung des LVDP signifikant größer als nach Zugabe von KHB ( $64,8 \pm 13,6\%$  vs.  $25,5 \pm 9,2\%$ ,  $p < 0,0001$ ). Im Vergleich zu den KHB-behandelten Herzen war die Erholung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit nach Zugabe von den Erythrozyten signifikant größer ( $73 \pm 15\%$  vs.  $28 \pm 10\%$ ,  $p < 0,0001$ ). Auch die Erholung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit war nach Zugabe der Erythrozyten signifikant größer ( $62 \pm 15\%$  vs.  $23 \pm 7\%$ ,  $p = 0,0002$ ). Nur die Erholung der koronaren Flussrate zeigte

keinen Unterschied nach Zugabe von KHB oder den Erythrozyten ( $84,7 \pm 29,7\%$  vs.  $94,0 \pm 28,2\%$ ,  $p = 0,59$ ). Der linksventrikuläre enddiastolische Druck nach 60-minütiger Reperfusion wurde als absoluter Wert ermittelt und war nach Zugabe der Erythrozyten signifikant kleiner als nach Zugabe von KHB ( $26,4 \pm 9,5$  mmHg vs.  $43,5 \pm 9,2$  mmHg,  $p = 0,009$ ).



**Abb. 7: Die kardioprotektive Wirkung von Erythrozyten auf den kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden**

Die Koronarien muriner Herzen im Langendorff-Perfusor wurden zu Beginn einer 40-minütigen Ischämie mit KHB (Kontrolle KHB,  $n = 6$ ) oder mit humanen Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J,  $n = 8$ ) beladen. Der LVDP, +dP/dt, -dP/dt und die koronare Flussrate werden als prozentualer Anteil von den *Baseline*-Werten nach 60-minütiger Reperfusion mit KHB angegeben, während der LVEDP als absoluter Wert in mmHg aufgeführt wird. Im Vergleich zu den KHB-behandelten Herzen ist nach Zugabe der Erythrozyten junger, gesunder Probanden (A) Der linksventrikuläre Druck (LVDP) signifikant größer (B) der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) signifikant kleiner (C) die koronare Flussrate gleich groß (D) die maximale positive Druckänderung über die Zeit (+dP/dt) signifikant größer (E) die maximale negative Druckänderung über die Zeit (-dP/dt) signifikant größer. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Bei einem p-Wert über 0,05 wird eine Signifikanz der Ergebnisse angenommen. Signifikante Ergebnisse werden dargestellt: \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ .

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse durch Unterschiede in den *Baseline*-Werten der murinen Herzen vor dem Beladen mit KHB oder Erythrozyten beeinflusst wurden, wurden diese statistisch ausgewertet und in Tabelle 14 dargestellt. Dabei wurde festgestellt, dass der *Baseline*-Wert der koronaren Flussrate bei den Herzen, die mit KHB beladen wurden signifikant größer war, als bei den Herzen, die mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden beladen wurden ( $3,9 \pm 0,6$  vs.  $2,5 \pm 0,8$ ,  $p = 0,004$ ), die anderen *Baseline*-Parameter jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zeigten. In der Diskussion wird dies nochmal aufgegriffen und erläutert.

**Tabelle 14: Vergleich der *Baseline*-Werte der murinen Herzen vor dem Beladen mit KHB (Kontrolle KHB) oder Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J).**

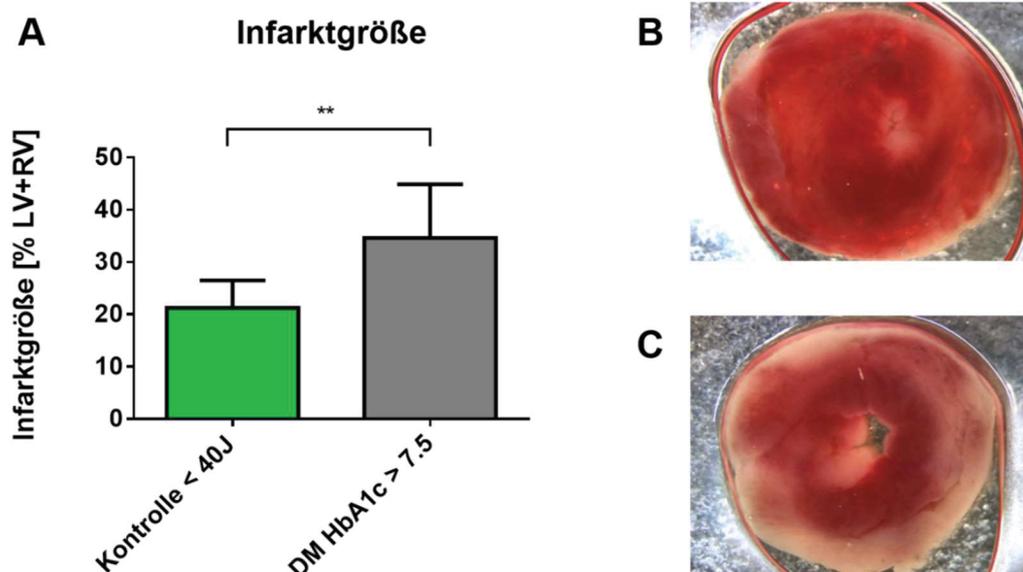
	Kontrolle KHB	Kontrolle < 40 J	p-Wert
n=	7	8	
	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD	
<b>Koronare Flussrate</b>			
Baseline (ml/min)	$3,9 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,8$	0,004
Erholung 60min (ml/min)	$3,3 \pm 1,2$	$2,3 \pm 0,8$	
% Erholung 60min (%)	$84,7 \pm 29,7$	$94,0 \pm 28,2$	
<b>Linksventrikulärer Druck</b>			
Baseline (mmHg)	$96,0 \pm 20,3$	$80,3 \pm 9,8$	0,08
Erholung 60min (mmHg)	$24,5 \pm 10,6$	$50,9 \pm 6,7$	
% Erholung 60min (%)	$25,5 \pm 9,2$	$64,8 \pm 13,6$	
<b>Kontraktionsgeschwindigkeit</b>			
Baseline (mmHg/s)	$3896 \pm 810$	$3361 \pm 433$	0,14
Erholung 60min (mmHg/s)	$1088 \pm 445$	$2406 \pm 380$	
% Erholung 60min (%)	$28 \pm 10$	$73 \pm 15$	
<b>Relaxationsgeschwindigkeit</b>			
Baseline (mmHg/s)	$-3165 \pm 793$	$-2542 \pm 398$	0,08
Erholung 60min (mmHg/s)	$-715 \pm 255$	$-1523 \pm 218$	
% Erholung 60min (%)	$23 \pm 7$	$62 \pm 15$	

Die *Baseline*-Werte der murinen Herzen vor Beginn der 40-minütigen Ischämie sowie die absoluten und prozentualen Erholungswerte nach 60-minütiger Reperfusion sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test angewandt, statische Signifikanz wurde ab einem p-Wert < 0,05 angenommen.

Zusammenfassend zeigte sich eine starke protektive Funktion humaner Erythrozyten auf das Myokard während der kardialen Ischämie und Reperfusion der murinen Herzen im Langendorff-Perfusor.

### **3.3 Einfluss von Erythrozyten junger, gesunder Probanden und von Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes auf den kardialen I/R-Schaden**

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob Erythrozyten alter Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus über ein vergleichbares kardioprotektives Potential wie Erythrozyten junger, gesunder Probanden verfügen. Dazu wurden Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J, n = 8) und alter, medikamentös schlecht eingestellter Diabetiker mit einem HbA1c-Wert über 7,5% (DM HbA1c > 7,5, n = 8) vor einer 40-minütigen Ischämie in das murine Herz im Langendorff-Perfusor geladen. Wie im vorangehenden Teil wurden als Messparameter wieder die Infarktgröße und verschiedene Funktionsparameter des linken Ventrikels nach 60-minütiger Reperfusion miteinander verglichen. Zu diesen zählen der linksventrikuläre Druck (LVDP), die maximale positive und negative Druckentwicklung über die Zeit ( $\pm dP/dt$ ), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und die koronare Flussrate. Die Ergebnisse zeigten, dass ein hohes Alter sowie ein medikamentös schlecht eingestellter Diabetes zu einem Verlust der protektiven Funktion humaner Erythrozyten während einer kardialen Ischämie und Reperfusion führten. Die Infarktgröße nach Zugabe der Erythrozyten schlecht eingestellter Diabetiker ist signifikant größer als nach Zugabe der Erythrozyten junger, gesunder Probanden ( $34,6 \pm 10,2\%$  vs.  $21,2 \pm 5,3\%$ ,  $p = 0,005$ ) (Abbildung 8).

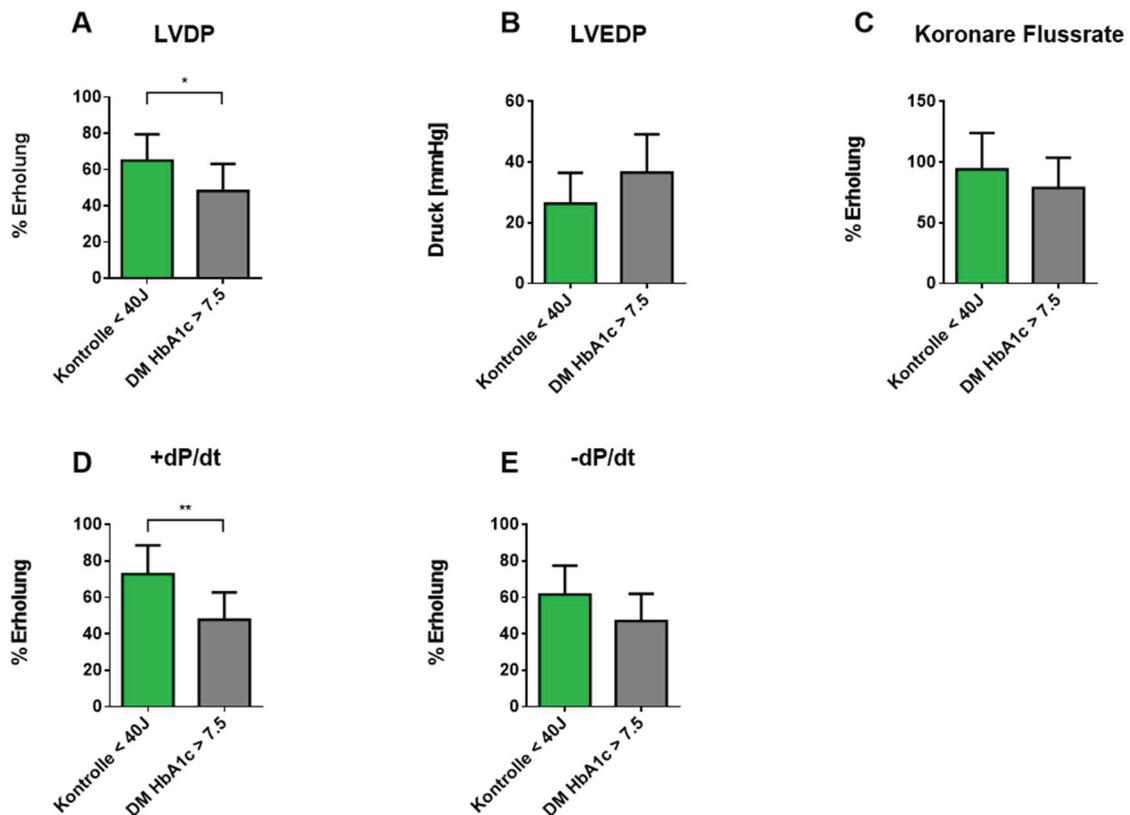


**Abb. 8: Größeres Infarktareal nach Zugabe von Erythrozyten alter Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes mellitus.**

(A) Nach Zugabe von Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J, n = 8) in murine Herzen zu Beginn einer 40-minütigen Globalischämie ist der Infarkt des Mäuseherzens nach 120 Minuten Reperfusion mit KHB signifikant kleiner als nach Zugabe von Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker (DM HbA1c > 7,5, n = 8), ungepaarter t-Test: \*\*p < 0,01. LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel. In die Abbildung sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Infarktgröße wurde nach 120-minütiger Reperfusion mittels TTC-Färbung ermittelt. (B) Repräsentativer Schnitt aus der Mitte eines Mäuseherzens nach Zugabe humaner Erythrozyten junger, gesunder Probanden. Vitales Gewebe wird rot angefärbt, das weiße Gewebe entspricht dem Infarktareal. (C) Repräsentativer Schnitt aus der Mitte eines Mäuseherzens nach Zugabe humaner Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker

Ebenso zeigten die Funktionsparameter der murinen Herzen im Langendorff-Perfusor eine Verschlechterung der protektiven Funktion nach Zugabe der Erythrozyten der alten, schlecht eingestellten Diabetiker im Vergleich zu den Herzen, die mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden beladen wurden (Abbildung 9). Nach Zugabe der Erythrozyten der alten, schlecht eingestellten Diabetiker war die prozentuale Erholung des linksventrikulären Drucks nach 60-minütiger Reperfusion im Vergleich zu den *Baseline*-Werten signifikant kleiner als nach Zugabe der Erythrozyten der jungen, gesunden Probanden ( $48,3 \pm 14,1\%$  vs.  $64,8 \pm 13,6\%$ , p = 0,04). Im Vergleich zu den murinen Herzen, die mit Erythrozyten der alten, schlecht eingestellten Diabetiker beladen wurden, war die prozentuale Erholung der +dP/dt im Vergleich zu den *Baseline*-Werten signifikant größer nach Zugabe der Erythrozyten der jungen, gesunden Probanden ( $49 \pm 15\%$  vs.  $73 \pm 15\%$ , p = 0,004). Der LVEDP nach 60 Minuten Reperfusion zeigte nach Zugabe der Erythrozyten schlecht

eingestellter Diabetiker eine Tendenz, größer zu sein als bei den Herzen, die mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden beladen wurden ( $36,6 \pm 11,8$  mmHg vs.  $26,4 \pm 9,5$  mmHg,  $p = 0,09$ ). Bei den Mäuseherzen, die mit Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker beladen wurden, zeigte die prozentuale Erholung der  $-dP/dt$  im Vergleich zu den *Baseline*-Werten eine Tendenz, kleiner zu sein ( $47 \pm 14\%$  vs.  $62 \pm 15\%$ ,  $p = 0,08$ ). Auch hier zeigte die prozentuale Erholung der koronaren Flussrate keinen Unterschied zwischen den Herzen, die mit Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker beladen wurden und denen, die mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden beladen wurden ( $78,8 \pm 23,4\%$  vs.  $94,0 \pm 28,2\%$ ,  $p = 0,29$ ).



**Abb. 9: Verlust der kardioprotektiven Funktion in Erythrozyten von alten Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes mellitus.**

Murine Herzen wurden im Langendorff-Perfusor zu Beginn einer 40-minütigen Ischämie mit humanen Erythrozyten von jungen, gesunden Probanden (Kontrolle < 40 J, n = 8) oder alten Patienten mit medikamentös schlecht eingestellten Diabetes mellitus (DM HbA1c > 7,5, n = 8) beladen. Der linksventrikuläre Druck (LVDP), die maximale positive und negative Druckentwicklung über die Zeit ( $\pm dP/dt$ ) und die koronare Flussrate werden als prozentuale Erholung nach 60-minütiger Reperfusion im Vergleich zu den *Baseline*-Werten angegeben. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) wird als absoluter Wert in mmHg beschrieben. Im Vergleich zu den murinen Herzen, die mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden beladen wurden, war nach Zugabe der Erythrozyten der alten, schlecht eingestellten Diabetiker (A) der LVDP signifikant kleiner (B) der LVEDP tendenziell größer (C) die koronare Flussrate gleich groß (D) der +dP/dt signifikant kleiner (E) der -dP/dt tendenziell kleiner. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test angewandt. Signifikante Ergebnisse werden ab einem p-Wert unter 0,05 angenommen und in der Abbildung dargestellt: \*\*p < 0,01, \*p < 0,05.

In Tabelle 15 werden die *Baseline*-Werte der murinen Herzen vor dem Beladen mit den Erythrozyten aufgeführt, um zu zeigen, dass sich diese zwischen den Gruppen nicht unterscheiden und aus diesem Grund keinen Einfluss auf die Ergebnisse nehmen.

**Tabelle 15: Vergleich der *Baseline*-Werte der murinen Herzen vor dem Beladen mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J) und alter Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes mellitus (DM HbA1c > 7,5).**

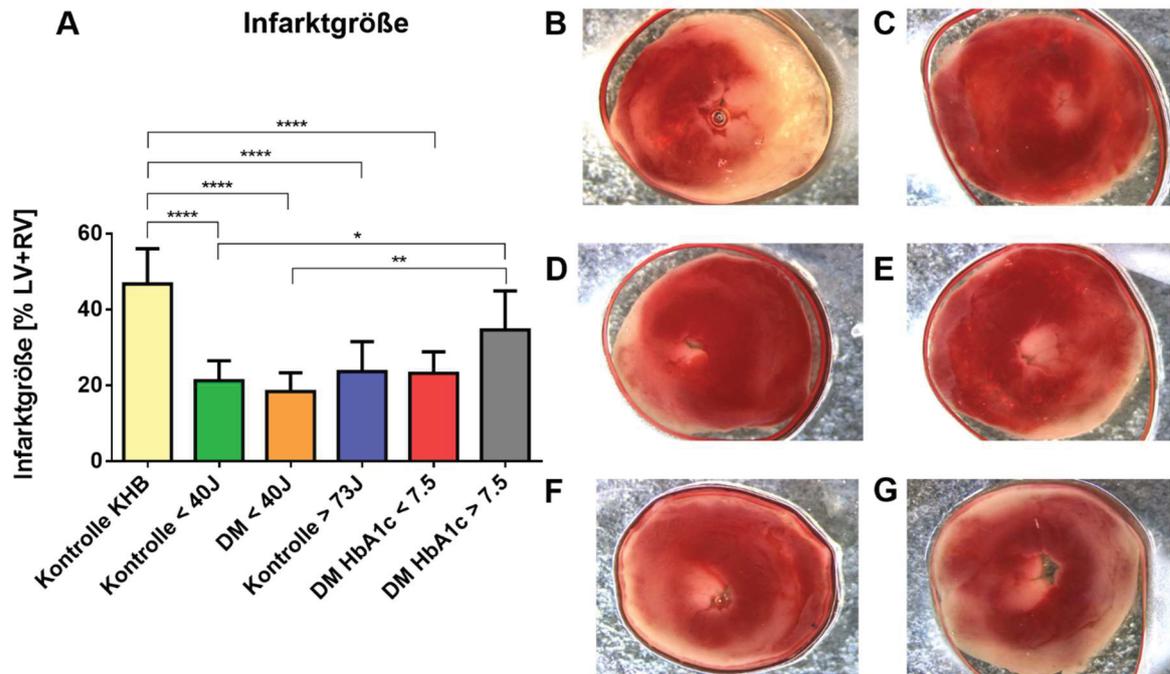
	Kontrolle < 40 J	DM HbA1c > 7,5	p-Wert
n=	8	8	
	MW ± SD	MW ± SD	
<b>Koronare Flussrate</b>			
Baseline (ml/min)	2,5 ± 0,8	2,4 ± 0,8	0,8
Erholung 60min (ml/min)	2,3 ± 0,8	1,8 ± 0,5	
% Erholung 60min (%)	94,0 ± 28,2	78,8 ± 23,4	
<b>Linksventrikulärer Druck</b>			
Baseline (mmHg)	80,3 ± 9,8	74,5 ± 10,3	0,27
Erholung 60min (mmHg)	50,9 ± 6,7	36,4 ± 12,7	
% Erholung 60min (%)	64,8 ± 13,6	48,3 ± 14,1	
<b>Kontraktionsgeschwindigkeit</b>			
Baseline (mmHg/s)	3361 ± 433	3435 ± 773	0,82
Erholung 60min (mmHg/s)	2406 ± 380	1677 ± 627	
% Erholung 60min (%)	73 ± 15	49 ± 15	
<b>Relaxationsgeschwindigkeit</b>			
Baseline (mmHg/s)	-2542 ± 398	-2262 ± 459	0,21
Erholung 60min (mmHg/s)	-1523 ± 218	-1069 ± 389	
% Erholung 60min (%)	62 ± 15	47 ± 14	

Die *Baseline*-Werte der murinen Herzen vor Beginn der 40-minütigen Ischämie sowie die absoluten und prozentualen Erholungswerte nach 60-minütiger Reperfusion sind als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test angewandt, statische Signifikanz wurde ab einem p-Wert < 0,05 angenommen.

Bei Zusammenschau der Ergebnisse ließ sich feststellen, dass Alter und ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus einen negativen Einfluss auf die protektive Funktion von Erythrozyten während einer kardialen Ischämie und Reperfusion haben.

### **3.4 Auswirkung von Erythrozyten alter und junger Probanden ohne und mit medikamentös gut und schlecht eingestelltem Diabetes mellitus auf den kardialen I/R-Schaden**

Nachdem bereits gezeigt wurde, dass Alter und ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus einen negativen Einfluss auf die protektive Funktion von Erythrozyten im I/R-Schaden haben, steht in diesem Kapitel im Vordergrund, ob die Verschlechterung der erythrozytären Funktion am ehesten auf das Alter, das Vorliegen des Diabetes mellitus oder eine schlechte Langzeitblutzuckereinstellung zurückzuführen ist. Zur Klärung dieser Frage wurde die Wirkung von Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J, n = 8) auf den I/R-Schaden muriner Herzen im Langendorff-Perfusor mit der Wirkung von Erythrozyten junger Patienten mit Diabetes mellitus (DM < 40 J, n = 6) sowie von Erythrozyten alter Patienten mit gut eingestelltem (DM HbA1c < 7,5, n = 7), schlecht eingestelltem (DM HbA1c > 7,5, n = 8) und ohne Diabetes mellitus (Kontrolle > 73 J, n = 7) verglichen. Als Referenzgruppe wurden Mäuseherzen zu Beginn der 40-minütigen Ischämie mit KHB (Kontrolle KHB) beladen. Als messbare Parameter wurde zum einen die Infarktgröße als prozentualer Anteil am Gesamtgewebe und zum anderen die Funktionsparameter der murinen Herzen bestimmt. Die Infarktgröße der KHB-behandelten Herzen war nach 120-minütiger Reperfusion signifikant größer als das Infarktareal der murinen Herzen, die mit Erythrozyten von jungen, gesunden Probanden ( $46,6 \pm 9,3\%$  vs.  $21,22 \pm 5,26\%$ ,  $p < 0,0001$ ), von jungen Diabetikern ( $46,6 \pm 9,3\%$  vs.  $18,36 \pm 4,94\%$ ,  $p < 0,0001$ ), von alten Probanden ohne Diabetes ( $46,6 \pm 9,3\%$  vs.  $23,61 \pm 7,91\%$ ,  $p < 0,0001$ ) und von alten, gut eingestellten Diabetikern ( $46,6 \pm 9,3\%$  vs.  $23,16 \pm 5,65\%$ ,  $p < 0,0001$ ) beladen wurden. Nach Zugabe der Erythrozyten der alten, schlecht eingestellten Diabetiker ließ sich bei der Infarktgröße kein Unterschied zu den KHB-behandelten Herzen feststellen ( $34,62 \pm 10,23\%$  vs.  $46,6 \pm 9,3\%$ ,  $p > 0,05$ ). Auch war die Infarktgröße nach Zugabe von Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker signifikant größer als bei den murinen Herzen, die mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden ( $34,62 \pm 10,23\%$  vs.  $21,22 \pm 5,26\%$ ,  $p < 0,05$ ) und Erythrozyten junger Diabetiker ( $34,62 \pm 10,23\%$  vs.  $34,62 \pm 10,23\%$ ,  $p < 0,01$ ) beladen wurden.

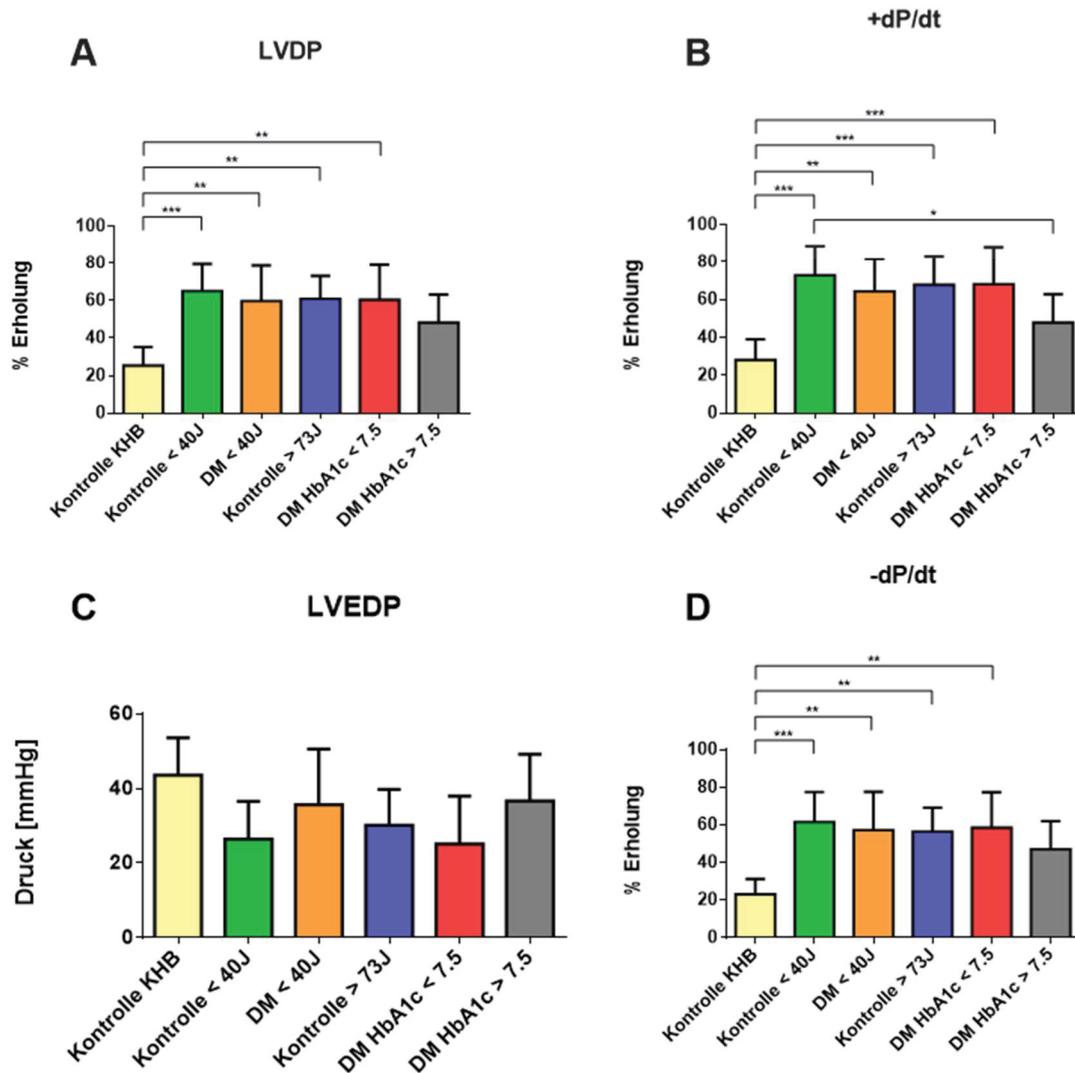


**Abb. 10: Einfluss von Erythrozyten verschiedener Probandengruppen auf die Infarktgröße**

Vor Beginn einer 40-minütigen Ischämie wurden die Koronarien der Mäuseherzen im Langendorff-Perfusor mit KHB (Kontrolle KHB) oder Erythrozyten von jungen, gesunden Probanden (Kontrolle < 40 J), jungen Diabetikern (DM < 40 J), alten Probanden ohne Diabetes (Kontrolle > 73 J), alten Patienten mit medikamentös gut (DM HbA1c < 7,5) und schlecht eingestellten Diabetes mellitus (DM HbA1c > 7,5) beladen. Die Infarktgröße wurde nach 120-minütiger Reperfusion mittels TTC-Färbung ermittelt. (A) In der Abbildung sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die *one-way* ANOVA diente als statistischer Test. Signifikante Unterschiede werden abgebildet: \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p > 0,01$ , \* $p < 0,05$ . (B) – (G) Je ein repräsentativer Schnitt eines Mäuseherzens nach Zugabe von (B) KHB, (C) Erythrozyten junger, gesunder Probanden, (D) Erythrozyten junger Diabetiker, (E) Erythrozyten alter Probanden ohne Diabetes, (F) Erythrozyten alter, gut eingestellter Diabetiker, (G) Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker. Vitales Herzmuskelgewebe wird rot angefärbt, das Infarktareal bleibt hell.

In der Abbildung 11 werden die Funktionsparameter der murinen Herzen inklusive der Signifikanzen dargestellt. Die Erholung des linksventrikulären Druckes der Mäuseherzen nach 60-minütiger Reperfusion im Vergleich zu den *Baseline*-Werten war nach Zugabe von KHB signifikant niedriger als nach Zugabe von Erythrozyten junger, gesunder Probanden ( $25,5 \pm 9,2\%$  vs.  $64,8 \pm 13,6\%$ ,  $p < 0,001$ ), junger Diabetiker ( $25,5 \pm 9,2\%$  vs.  $59,6 \pm 17,4\%$ ,  $p < 0,01$ ), alter Probanden ohne Diabetes ( $25,5 \pm 9,2\%$  vs.  $60,7 \pm 11,4\%$ ,  $p < 0,01$ ) und alter, gut eingestellter Diabetiker ( $25,5 \pm 9,2\%$  vs.  $60,3 \pm 17,3\%$ ,  $p < 0,01$ ).

Nur nach Zugabe der Erythrozyten der alten, schlecht eingestellten Diabetiker zeigte sich kein Unterschied in der prozentualen Erholung des linksventrikulären Druckes im Vergleich zu den KHB-Herzen ( $48,3 \pm 14,1\%$  vs.  $25,5 \pm 9,2\%$ ,  $p > 0,05$ ). Als weiterer Parameter für die Kontraktion des linken Ventrikels wurde die prozentuale Erholung der maximalen positiven Druckentwicklung über die Zeit (+dP/dt) nach 60-minütiger Reperfusion im Vergleich zu den *Baseline*-Werten bestimmt. Dabei ließ sich feststellen, dass die Erholung vom +dP/dt nach Zugabe von KHB signifikant kleiner war als nach Zugabe von Erythrozyten junger, gesunder Probanden ( $28 \pm 10\%$  vs.  $72 \pm 15\%$ ,  $p < 0,001$ ), junger Diabetiker ( $28 \pm 10\%$  vs.  $64 \pm 16\%$ ,  $p < 0,01$ ), alter Probanden ohne Diabetes mellitus ( $28 \pm 10\%$  vs.  $68 \pm 14\%$ ,  $p < 0,001$ ) und alter, gut eingestellter Diabetiker ( $28 \pm 10\%$  vs.  $68 \pm 19\%$ ,  $p < 0,001$ ). Auch hier konnte kein Unterschied bei der Erholung des +dP/dt zwischen den KHB-Herzen und den murinen Herzen, die mit Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker ( $28 \pm 10\%$  vs.  $49 \pm 9\%$ ,  $p > 0,05$ ) beladen wurden, festgestellt werden. Weiterhin gab es einen signifikanten Unterschied bezüglich der Erholung des +dP/dt bei den murinen Herzen, die mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden und alter, schlecht eingestellter Diabetiker beladen wurden ( $72 \pm 15\%$  vs.  $49 \pm 9\%$ ,  $p < 0,05$ ). Als Relaxationsparameter wurden der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) als absoluter Wert nach 60 Minuten Reperfusion und die maximale negative Druckentwicklung über die Zeit (-dP/dt) als prozentualer Anteil der *Baseline*-Werte nach 60-minütiger Reperfusion gemessen und dokumentiert. In Abbildung 11 ist zu sehen, dass die murinen Herzen nach Zugabe von KHB tendenziell einen höheren LVEDP entwickelten als nach Zugabe der Erythrozyten junger, gesunder Probanden ( $43,5 \pm 9,2$  mmHg vs.  $26,4 \pm 9,5$  mmHg,  $p > 0,05$ ), alter Probanden ohne Diabetes ( $43,5 \pm 9,2$  mmHg vs.  $30,1 \pm 8,9$  mmHg,  $p > 0,05$ ) und alter, gut eingestellter Diabetiker ( $43,5 \pm 9,2$  mmHg vs.  $25,1 \pm 11,8$  mmHg,  $p > 0,05$ ). Dahingegen zeigte der LVEDP keinen Unterschied zwischen den KHB-Herzen und der Mäuseherzen, die mit Erythrozyten junger Diabetiker ( $43,5 \pm 9,2$  mmHg vs.  $35,7 \pm 13,5$  mmHg,  $p > 0,05$ ) und alter, schlecht eingestellter Diabetiker ( $43,5 \pm 9,2$  mmHg vs.  $36,6 \pm 11,8$  mmHg,  $p > 0,05$ ) beladen wurden. Bei Betrachtung der -dP/dt ließ sich feststellen, dass die prozentuale Erholung bei den KHB-behandelten Herzen signifikant kleiner war als nach Zugabe von Erythrozyten junger, gesunder Probanden ( $23 \pm 7\%$  vs.  $62 \pm 15\%$ ,  $p < 0,001$ ), junger Diabetiker ( $23 \pm 7\%$  vs.  $57 \pm 19\%$ ,  $p < 0,01$ ), alter Probanden ohne Diabetes ( $23 \pm 7\%$  vs.  $56 \pm 12\%$ ,  $p < 0,01$ ) und alter, gut eingestellter Diabetiker ( $23 \pm 7\%$  vs.  $59 \pm 17\%$ ,  $p < 0,01$ ). Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den murinen Herzen festgestellt werden, die mit KHB oder Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker ( $23 \pm 7\%$  vs.  $47 \pm 14\%$ ,  $p > 0,05$ ) beladen wurden.

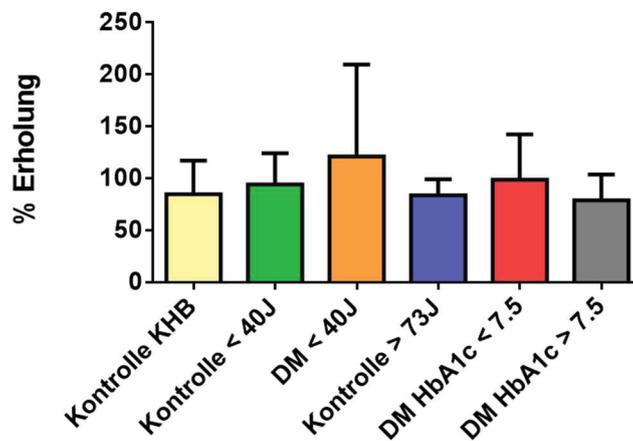


**Abb. 11: Einfluss von Erythrozyten verschiedener Probandengruppen auf die hämodynamischen Funktionsparameter der murinen Herzen im Langendorff-Transfermodell**

Die Koronarien der Mäuseherzen wurden zu Beginn einer 40-minütigen Ischämie mit KHB (Kontrolle KHB,  $n = 6$ ) oder Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J,  $n = 8$ ), junger Diabetiker (DM < 40 J,  $n = 6$ ), alter Probanden ohne Diabetes (Kontrolle > 73 J,  $n = 7$ ), alter, medikamentös gut eingestellter Diabetiker (DM HbA1c < 7,5,  $n = 7$ ) oder alter, medikamentös schlecht eingestellter Diabetiker (DM HbA1c > 7,5,  $n = 8$ ) beladen. Der linksventrikuläre Druck (LVDP) und die maximale positive und negative Druckentwicklung über die Zeit ( $\pm dP/dt$ ) werden als prozentualer Anteil von den *Baseline*-Werten nach 60-minütiger Reperfusion angegeben, während der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) als absoluter Wert in mmHg aufgeführt wird. In den Abbildungen sind die Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede werden bei einem  $p$ -Wert unter 0,05 angenommen, in den Graphen sind sie folgendermaßen abgebildet: \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  (*one-way ANOVA*).

Der einzige Parameter, bei dem auch graphisch keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar war, war die koronare Flussrate. Nach 60-minütiger Reperfusion zeigten sich keine Unterschiede in der prozentualen Erholung im Vergleich zu den *Baseline*-Werten zwischen den murinen Herzen, die mit KHB ( $84,7 \pm 29,7\%$ ,  $p > 0,05$ ) oder Erythrozyten junger, gesunder Probanden ( $94,0 \pm 28,2\%$ ,  $p > 0,05$ ), junger Diabetiker ( $120,9 \pm 80,8\%$ ,  $p > 0,05$ ), alter Probanden ohne Diabetes ( $83,6 \pm 14,3\%$ ,  $p > 0,05$ ), alter, gut eingestellter Diabetiker ( $98,8 \pm 40,1\%$ ,  $p > 0,05$ ) oder alter, schlecht eingestellter Diabetiker ( $78,8 \pm 23,4\%$ ,  $p > 0,05$ ) beladen wurden (Abbildung 12).

### Koronare Flussrate



**Abb. 12: Kein Unterschied in der Erholung der koronaren Flussrate**

Die Koronarien der Mäuseherzen wurden zu Beginn einer 40-minütigen Ischämie mit KHB (Kontrolle KHB,  $n = 6$ ) oder Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J,  $n = 8$ ), junger Diabetiker (DM < 40 J,  $n = 6$ ), alter Probanden ohne Diabetes (Kontrolle > 73 J,  $n = 7$ ), alter, medikamentös gut eingestellter Diabetiker (DM HbA1c < 7,5,  $n = 7$ ) oder alter, medikamentös schlecht eingestellter Diabetiker (DM HbA1c > 7,5,  $n = 8$ ) beladen. Die koronare Flussrate wurde als prozentualer Anteil von den *Baseline*-Werten nach 60-minütiger Reperfusion bestimmt. In den Graphen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (*one-way ANOVA*:  $p = 0,56$ ).

Um zu zeigen, dass nicht bereits unterschiedliche *Baseline*-Werte der murinen Herzen vor dem Beladen mit den Erythrozyten die Ergebnisse beeinflussten, wurden diese statistisch ausgewertet und werden in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Vergleich der *Baseline*-Werte der murinen Herzen vor dem Beladen mit KHB (Kontrolle KHB) und Erythrozyten junger, gesunder Probanden (Kontrolle < 40 J), junger Diabetiker (DM < 40 J), alter Patienten mit medikamentös gut eingestelltem (DM HbA1c < 7,5) und schlecht eingestelltem (DM HbA1c > 7,5) und ohne (Kontrolle > 73 J) Diabetes mellitus.

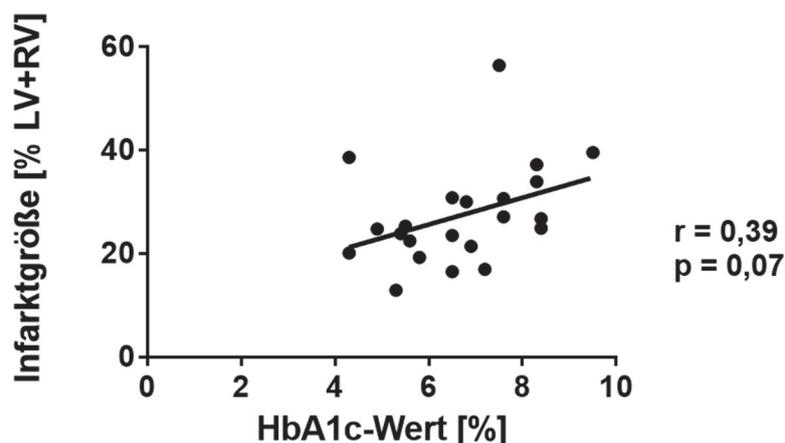
n=	Kontrolle KHB	Kontrolle < 40 J		Kontrolle > 73 J		DM HbA1c < 7,5		DM HbA1c > 7,5		p-Wert zwischen allen Gruppen
		7	8	6	7	7	8	7	8	
	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	
<b>Koronare Flussrate</b>										
	3,9 ± 0,6	2,5 ± 0,8	2,5 ± 1,3	2,9 ± 0,5	2,4 ± 1,0	2,4 ± 0,8	0,15			
Erholung 60min (ml/min)	3,3 ± 1,2	2,3 ± 0,8	2,2 ± 0,6	2,4 ± 0,5	2,1 ± 0,6	1,8 ± 0,5				
% Erholung 60min (%)	84,7 ± 29,7	94,0 ± 28,2	120,9 ± 80,8	83,6 ± 14,3	98,8 ± 40,1	78,8 ± 23,4				
<b>Linksventrikulärer Druck</b>										
Baseline (mmHg)	96,0 ± 20,3	80,3 ± 9,8	76,0 ± 16,1	81,9 ± 11,3	80,4 ± 15,7	74,5 ± 10,3	0,12			
Erholung 60min (mmHg)	24,5 ± 10,6	50,9 ± 6,7	43,3 ± 10,1	50,0 ± 13,1	48,0 ± 15,3	36,4 ± 12,7				
% Erholung 60min(%)	25,5 ± 9,2	64,8 ± 13,6	59,6 ± 17,4	60,7 ± 11,4	60,3 ± 17,3	48,3 ± 14,1				
<b>Kontraktionsgeschwindigkeit</b>										
Baseline (mmHg/s)	3896 ± 810	3361 ± 433	3214 ± 652	3528 ± 502	3218 ± 650	3435 ± 773	0,45			
Erholung 60min (mmHg/s)	1088 ± 445	2406 ± 380	2030 ± 586	2423 ± 750	2192 ± 773	1677 ± 627				
% Erholung 60min (%)	28 ± 10	73 ± 15	64 ± 16	68 ± 14	68 ± 19	49 ± 15				
<b>Relaxationsgeschwindigkeit</b>										
Baseline (mmHg/s)	-3165 ± 793	-2542 ± 398	-2279 ± 575	-2566 ± 491	-2461 ± 640	-2262 ± 459	0,08			
Erholung 60min (mmHg/s)	-715 ± 255	-1523 ± 218	-1214 ± 281	-1464 ± 484	-1404 ± 452	-1069 ± 389				
% Erholung 60min (%)	23 ± 7	62 ± 15	57 ± 19	56 ± 12	59 ± 17	47 ± 14				

Die *Baseline*-Werte der murinen Herzen vor Beginn der 40-minütigen Ischämie sowie die absoluten und prozentualen Erholungswerte nach 60-minütiger Reperfusion sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde eine *one-way* ANOVA angewandt, statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die kardioprotektive Funktion von Erythrozyten im kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden durch eine schlechte Blutzuckereinstellung aufgehoben wurde. Weder das Alter noch das Vorliegen eines Diabetes mellitus wirkten sich negativ auf die untersuchten Parameter während und nach Myokardinfarkt aus.

### 3.5 Korrelation des HbA1c-Wertes der älteren Probanden mit der Infarktgröße der murinen Herzen nach kardialen I/R-Schaden

Zur weiteren Analyse, inwieweit sich der HbA1c-Wert der älteren Probanden auf die Infarktgröße auswirkt, wurde die Korrelation zwischen HbA1c-Wert der Patienten und der Infarktgröße muriner Herzen untersucht. Dazu wurden die Erythrozyten der Probanden über 73 Jahre mit und ohne Diabetes mellitus zu Beginn einer 40-minütigen Ischämie in das Koronarsystem muriner Herzen im Langendorff-Perfusor geladen, das anschließend einer 120-minütigen Reperfusion mit KHB unterzogen wurde. Anschließend wurde die Infarktgröße der Mäuseherzen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass der HbA1c-Wert tendenziell mit der Infarktgröße korreliert ( $r = 0,39$ ,  $p = 0,07$ ).

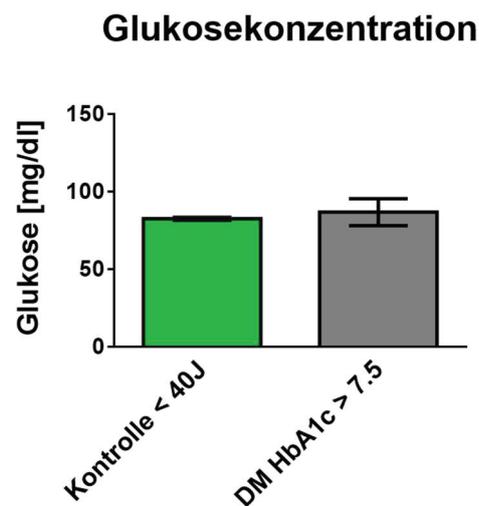


**Abb. 13:** Der Langzeitblutzuckerwert älterer Probanden mit und ohne Diabetes mellitus korreliert mit der Infarktgröße der murinen Herzen.

Der HbA1c-Wert der Probanden über 73 Jahre, deren Erythrozyten zu Beginn einer 40-minütigen Ischämie in die Koronarien muriner Herzen im Langendorff-Perfusor geladen wurden, korreliert mit der Infarktgröße der Mäuseherzen nach einer 120-minütigen Reperfusion mit KHB.

### 3.6 Glukosekonzentrationen in aufbereiteten Proben von jungen, gesunden Probanden und alten Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes mellitus

Um auszuschließen, dass die beobachteten Ergebnisse durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen in den aufbereiteten Erythrozyten-Proben beeinflusst wurden, sollte weiterhin nachgewiesen werden, dass sich die Glukosekonzentration in den aufbereiteten Blutproben nicht unterschied. Dazu wurden Blutgasanalysen der aufbereiteten Blutproben von Erythrozyten junger, gesunder Probanden und alter Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes durchgeführt. Zwischen den aufbereiteten Blutproben der jungen, gesunden Probanden (Kontrolle < 40 J, n = 8) und der alten Patienten mit medikamentös schlecht eingestelltem Diabetes mellitus (DM HbA1c > 7,5, n = 8) zeigten sich keine Unterschiede in der Glukosekonzentration ( $82,8 \pm 0,8$  vs.  $87,0 \pm 7,1$  mg/ml,  $p = 0,36$ ) (Abbildung 13).



**Abb. 14: Kein Unterschied der Glukosekonzentration in den aufbereiteten Blutproben**

Nach Aufbereitung der Erythrozyten der jungen, gesunden Probanden (Kontrolle < 40 J) und der alten, schlecht eingestellten Diabetiker (DM HbA1c > 7,5), wurden die Proben im Blutgasanalysator analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Glukosekonzentrationen in den Proben nicht unterschieden (ungepaarter t-Test:  $p = 0,36$ ).

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, weiter zu differenzieren, ob das Alter, das Vorliegen eines Diabetes mellitus oder die Langzeitblutzuckereinstellung verantwortlich für die Verschlechterung der kardioprotektiven Funktion von Erythrozyten im kardialen I/R-Schaden ist und inwieweit sich der HbA1c-Wert auf das Ausmaß der Infarktgröße auswirkt. Als Grundlage dieser Arbeit liegen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe vor, die zeigen, dass Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker im kardialen I/R-Schaden weniger kardioprotektiv sind als Erythrozyten junger, gesunder Probanden. Weiterhin konnten Mahdi et al. zeigen, dass die postischämische Erholung muriner Herzen, deren Koronarien zu Beginn einer Ischämie mit humanen Erythrozyten von Diabetikern beladen wurden, abhängig von der Blutglukoseeinstellung war [66].

Für unsere Studie wurden sowohl Erythrozyten von jungen, gesunden Probanden als auch von vier verschiedenen Patientengruppen zu Beginn einer Ischämie in die Koronarien muriner Herzen im Langendorff-Perfusor geladen und verblieben dort für die Dauer der Ischämie. Nach einer 120-minütigen Reperfusion mit KHB wurde die Infarktgröße der murinen Herzen bestimmt. Unter den vier Patientengruppen gab es eine Gruppe junger Diabetiker und drei Gruppen kardiovaskulärer Patienten über 73 Jahre, darunter eine ohne Diabetes mellitus und zwei mit Diabetes mellitus. Von den zwei Patientengruppen mit Diabetes mellitus war eine medikamentös gut eingestellt, mit einem HbA1c unter 7,5% und eine schlecht eingestellt mit einem HbA1c-Wert über 7,5%.

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die kardioprotektive Funktion von Erythrozyten im kardialen I/R-Schaden im Vergleich zu mit KHB behandelten Kontrollen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine schlechte Blutzuckereinstellung einen negativen Effekt auf die kardioprotektive Funktion von Erythrozyten im kardialen I/R-Schaden hat. Das Vorliegen eines gut therapierten Diabetes mellitus oder das Alter der Probanden verschlechtern die erythrozytäre Funktion nicht. Darüber hinaus scheint es eine Korrelation zwischen dem HbA1c-Wert der Patienten und der Infarktgröße der murinen Herzen zu geben.

Dass Erythrozyten im kardialen I/R-Schaden eine Rolle über den Transport von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> hinaus spielen, steht im Einklang mit Ergebnissen unserer und anderer Arbeitsgruppen [50, 51, 53, 66]. Auch Yang et al. und Mahdi et al. wiesen dabei eine kardioprotektive Funktion der Erythrozyten nach [51, 66].

## 4.1 Einfluss des Alters auf die erythrozytäre Funktion

In dieser Studie zeigte sich eine vergleichbare linksventrikuläre Funktion und eine vergleichbare Infarktgröße der murinen Herzen im Langendorff-Perfusor nach 40-minütiger Globalischämie gefolgt von einer 120-minütigen Reperfusion, die zu Beginn der Ischämie mit Erythrozyten alter Probanden ohne Diabetes mellitus und junger, gesunder Probanden beladen wurden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Erythrozyten junger und alter Probanden eine gleiche kardioprotektive Wirkung auf den kardialen I/R-Schaden haben und ein hohes Lebensalter allein keine negative Auswirkung auf die erythrozytäre Funktion im kardialen I/R-Schaden hat.

Erythrozyten sind für den Transport von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid zwischen Lunge und peripherem Gewebe zuständig [52]. Durch Interaktion mit dem Endothel sind Erythrozyten allerdings auch in die Regulation des kardiovaskulären Systems involviert [49, 53, 54]. Zu den zugrundeliegenden Mechanismen gehören die Bereitstellung einer NO-Bioaktivität und Adenosintriphosphat (ATP), die wichtige kardiovaskuläre Wirkungen, wie eine Vasodilatation, erzielen [49, 55]. Für eine lange Zeit wurden Endothelzellen als Hauptquelle einer eNOS-abhängigen Produktion von NO und von Arginase-Aktivität gesehen [46, 58]. Kürzlich wurde allerdings auch eine eNOS in Erythrozyten nachgewiesen, die zur systemischen Bioverfügbarkeit von NO beiträgt [59]. Ebenfalls gibt es in Erythrozyten eine Expression des Enzyms Arginase 1, das die NO-Bildung reziprok über den Verbrauch von L-Arginin reguliert, was ein gemeinsames Substrat der Arginase und NO-Synthase darstellt [57]. So weisen auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass es eine protektive Funktion der Erythrozyten über die Interaktion mit dem Endothel im kardialen I/R-Schaden gibt und ein höheres Lebensalter diese nicht verschlechtert.

Ein steigendes Lebensalter ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie ein AMI [93]. Einer der Gründe dafür ist die mit dem Alter zunehmende endotheliale Dysfunktion, die durch das Ungleichgewicht zwischen vasodilatierenden und vasokonstringierenden Faktoren zustande kommt [65]. Mit der endothelialen Dysfunktion gehen sowohl eine herabgesetzte NO-Bioverfügbarkeit, als auch vermehrter oxidativer Stress einher [65]. Ein Mangel an L-Arginin, das Substrat der eNOS, scheint eine Ursache der herabgesetzten NO-Bioverfügbarkeit zu sein [94]. Dieser Mangel kann durch eine Hochregulierung des Enzyms Arginase zustande kommen, da Arginase das gemeinsame Substrat L-Arginin zu Urea und L-Ornithin hydrolysiert [95]. Berkowitz et al. zeigten, dass Arginase 1 in den Endothelzellen von alten im Vergleich zu jungen Ratten hochreguliert ist, was zu einem vermehrten Verbrauch von L-Arginin führt. Durch den

Mangel des Substrats L-Arginin kommt es zu einer eingeschränkten Funktion der eNOS, einer verminderten Produktion von NO und somit auch zu einer endothelialen Dysfunktion [40]. Zudem wurde gezeigt, dass chronische Arginase-Inhibition den endothelialen NO-Signalweg und die L-Arginin-Ansprechbarkeit in älteren Ratten wiederherstellt [40].

Es wurde gezeigt, dass bei Patienten mit KHK sowohl die Expression als auch die Aktivität der erythrozytären eNOS erniedrigt ist und eine Korrelation zu dem Grad der endothelialen Dysfunktion besteht [60].

Auch Mahdi et al. veröffentlichen 2019 eine Studie, die zeigt, dass die endotheliale Dysfunktion mit dem Alter korreliert und dass Arginase-Inhibition mit nor-NOHA (N<sup>ω</sup>-hydroxy-nor-L-arginine) die endotheliale Funktion altersabhängig verbessert [64]. Im Gegensatz dazu deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass ein steigendes Lebensalter keine für das Ausmaß des kardialen I/R-Schaden relevante erythrozytäre Dysfunktion induziert. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Inhibition der erythrozytären Arginase keinen Effekt auf die protektive Funktion von Erythrozyten junger, gesunder Probanden im kardialen I/R-Schaden hat, was auf eine Balance zwischen der eNOS- und Arginase-Aktivität hindeutet und dazu passt, dass auch eine endotheliale Dysfunktion in jungen, gesunden Probanden nicht vorkommt [96]. Dieses Ergebnis steht allerdings im Kontrast zu Daten von Yang et al., die eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion beobachteten, wenn Erythrozyten junger, gesunder Probanden mit Arginase-Inhibitoren behandelt wurden, bevor sie in isolierte Rattenherzen gegeben wurden [57]. Unterschiedliche Setups der Versuchsreihen können für die verschiedenen Ergebnisse verantwortlich sein.

Es wäre interessant in weiteren Versuchen zu untersuchen, ob und inwieweit Arginase-Inhibition die erythrozytäre Funktion von alten Probanden im kardialen I/R-Schaden verbessert.

## **4.2 Einfluss von Diabetes mellitus auf die erythrozytäre Funktion**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von Diabetes mellitus auf die kardioprotektive Funktion von Erythrozyten im kardialen I/R-Schaden abhängig ist von der Langzeitglukoseeinstellung. Dabei war die Infarktgröße muriner Herzen im Langendorff-Perfusor nach Zugabe von Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker vergleichbar mit der Infarktgröße der Herzen, die lediglich mit KHB beladen wurden. Dahingegen war die Infarktgröße der Herzen, die mit Erythrozyten von Patienten mit gut eingestellten

Diabetes mellitus beladen wurden, vergleichbar mit der Infarktgröße der Mäuseherzen, die mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden beladen wurden. Analog dazu verhielt sich die Erholung der Funktionsparameter der murinen Herzen. Sowohl Erythrozyten junger, gesunder Probanden als auch Erythrozyten von Patienten mit gut eingestelltem Diabetes mellitus weisen also einen kardioprotektiven Effekt im myokardialen I/R Setting auf.

Bereits vor vielen Jahren wurde gezeigt, dass Erythrozyten von Diabetikern eine erhöhte Adhäsion an Endothelzellen aufweisen [97]. Der molekulare Mechanismus dahinter ist die Bindung des Band 3 Protein in Erythrozyten an den RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) von Endothelzellen [67]. Es wird angenommen, dass über eine erhöhte Interaktion von Erythrozyten mit dem Endothel oxidativer Stress induziert wird [52, 67]. Die Adhäsion von Erythrozyten an das Endothel wird durch eine Reduktion der Blutzuckerkonzentration und damit niedrige HbA1c-Level bei Typ-1-Diabetikern reduziert [73]. Daraus könnte man schließen, dass durch geringere Adhäsion bei guter Blutzuckerkontrolle weniger ROS entstehen. Dazu passen die Ergebnisse dieser Studie, die zeigen, dass die kardioprotektive Funktion von Erythrozyten gut eingestellter, junger Typ-1-Diabetiker vergleichbar ist mit der protektiven Funktion der Erythrozyten junger, gesunder Probanden.

Weiterhin scheint die Freisetzung von ATP aus Erythrozyten in hypoxischem Gewebe zu einer Vasodilatation zu führen [98]. Dieser Mechanismus scheint unter Einfluss von Erkrankungen wie Diabetes nicht mehr zu funktionieren [98].

In zellulären und experimentellen Studien zu Diabetes zeigte sich eine endotheliale Dysfunktion, gemessen an einer verminderten endothelabhängigen, NO-vermittelten Relaxation [99]. Verschiedene Gründe, wie eine Hyperglykämie, führen zu einer vaskulären Dysfunktion, die durch verschiedene Mechanismen, unter anderem durch eine erniedrigte Bioverfügbarkeit von NO und erhöhten oxidativen Stress, induziert wird [99]. Mahdi et al. zeigten, dass die endothelabhängige Relaxation bei Diabetikern unabhängig von der Blutzuckereinstellung signifikant geringer war als bei gesunden Probanden [100]. Hierbei ist anzumerken, dass die Relaxation bei Diabetikern zu Beginn und nach Optimierung des Blutzuckers gemessen wurde. Der mittlere HbA1c-Wert bei der ersten Messung betrug  $10,2 \pm 1,55 \%$  ( $88 \pm 17$  mmol/mol) und bei der zweiten Messung  $8,1 \pm 1,0 \%$  ( $65 \pm 11$  mmol/mol) [100]. Shemyakin et al. zeigten, dass Arginase-Inhibition die endotheliale Funktion bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Diabetes mellitus verbesserte [41]. In den Versuchen von Mahdi et al. verbesserte Arginase-Inhibition die

endotheliale Funktion bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 unabhängig von der glykämischen Kontrolle [100].

Zhou et al. veröffentlichen 2018 eine Studie, die zeigt, dass Erythrozyten von Diabetikern eine endotheliale Dysfunktion induzieren können [71]. Dem konnte durch Arginase-Inhibition, ROS-Einfang, NOX-Inhibition (NADPH-Oxidase = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase), und Spaltung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowohl auf erythrozytärer als auch auf endothelialer Ebene vorgebeugt werden [71]. In dieser Studie wurden auch die zugrundeliegenden Pathomechanismen untersucht. Die Arginase-Aktivität, Arginase 1-Expression, NOX2-Expression, ROS-Bildung und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion waren deutlich erhöht in den Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus [71]. Es wurde gezeigt, dass eine hochregulierte Expression der Arginase 1 in den diabetischen Erythrozyten zu einer Entkopplung der NO-Synthase führt, was eine erhöhte Produktion von ROS induziert [71]. Die Ergebnisse der Studie von Zhou et al. deuten darauf hin, dass eine erhöhte Produktion von ROS in den Erythrozyten eine erhöhte Aktivität und Expression der Arginase 1 im Endothel induziert [71]. Dies stellt einen neuen Pathomechanismus der endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit Diabetes mellitus dar [71]. Hierbei ist anzumerken, dass der mittlere HbA1c-Wert der diabetischen Patienten in dieser Studie  $8,56 \pm 1,83$  % ( $70 \pm 20$  mmol/mol) betrug [71]. In einer Studie von Mahdi et al. wurde auch gezeigt, dass die endothelabhängige Relaxation von Aorten nach Inkubation mit Erythrozyten von Typ-2-Diabetikern ebenfalls unabhängig von der glykämischen Kontrolle signifikant verringert war im Vergleich zu Aorten, die mit Erythrozyten gesunder Probanden inkubiert wurden [66]. Bezieht man diese Ergebnisse auf unsere Studie, könnte eine durch Erythrozyten alter, schlecht eingestellter Diabetiker induzierte endotheliale Dysfunktion Grund für die verringerte kardioprotektive Wirkung von Erythrozyten im kardialen I/R-Schaden sein, wie sie in unseren Versuchen beobachtet wurde.

Yang et al. zeigten, dass Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 den myokardialen I/R-Schaden von Rattenherzen im Langendorff-System im Vergleich zu Erythrozyten gesunder Probanden verschlechtern [70]. Im Vergleich zu Rattenherzen, die mit Erythrozyten gesunder Probanden beladen wurden, zeigte sich bei den Rattenherzen, die mit Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 beladen wurden, sowohl eine schlechtere Erholung des linksventrikulären Drucks und der maximalen Druckänderung über die Zeit als auch ein erhöhter linksventrikulärer enddiastolischer Druck [70]. Der mittlere HbA1c-Wert der Diabetiker betrug in dieser Studie  $8,56 \pm 1,55$  % ( $70 \pm 17$  mmol/mol) [70]. Bezogen auf den Mittelwert stimmen die Ergebnisse dieser Studie

mit unseren Ergebnissen bezüglich der Erythrozyten schlecht eingestellter Diabetiker, mit einem HbA1c-Wert über 7,5% überein.

In der Studie von Yang et al. wurde weiterhin gezeigt, dass sowohl die Arginase-Aktivität als auch die ROS-Bildung in Erythrozyten von Typ-2-Diabetikern erhöht ist [70]. Die Inkubation der Erythrozyten mit dem Arginase-Inhibitor nor-NOHA reduzierte die Produktion von ROS in Erythrozyten von Diabetikern aber nicht von gesunden Probanden, was darauf hinweist, dass die ROS-Bildung abhängig von Arginase ist [70]. Da auch die Inkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester) zu einer Reduktion von ROS in den diabetischen Erythrozyten führte, ist anzunehmen, dass auch die NOS eine ROS-Quelle in Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus darstellt [70]. Zudem konnte eine Vorbehandlung der diabetischen Erythrozyten mit nor-NOHA die Verschlechterung der myokardialen postischämischen Erholung aufheben [70]. Eine zusätzliche Inhibition der NO-Synthese hatte keinen weiteren Einfluss auf die Protektion durch den Arginase-Inhibitor, was impliziert, dass die Verschlechterung der erythrozytären Funktion im kardialen I/R-Schaden mit der Arginase-Aktivität zusammenhängt [70]. Eine alleinige Inkubation der diabetischen Erythrozyten mit L-NAME verbesserte die postischämische Erholung signifikant, dieser Effekt blieb bei gesunden Erythrozyten aus [70]. Wurden Erythrozyten von gesunden Probanden mit nor-NOHA vorbehandelt, zeigte sich eine verbesserte postischämische Erholung im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Erythrozyten, ein Effekt der durch Co-Inkubation mit einem NOS-Inhibitor ausgelöscht wurde [70].

Analog dazu zeigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass die Inkubation von Erythrozyten schlecht eingestellter Diabetiker mit nor-NOHA zu einer reduzierten Infarktgröße der murinen Herzen im Langendorff-Perfusor führt [96]. Dieser Effekt wurde allerdings durch die Co-Inkubation mit nor-NOHA und L-Name wieder aufgehoben [96]. Dies deutet auf eine Imbalance zwischen der eNOS und Arginase in Erythrozyten von schlecht eingestellten Diabetikern hin. Unterschiedliche Versuchsaufbauten können für die Diskrepanz der Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und der Ergebnisse von Yang et al. verantwortlich sein.

In einer Studie von Mahdi et al. wurde gezeigt, dass eine optimierte Blutzuckereinstellung bei Patienten mit Diabetes mellitus einen protektiven Effekt auf die linksventrikuläre Funktion im kardialen I/R-Schaden hat [66]. Unsere Ergebnisse, dass Erythrozyten von Diabetikern mit guter aber nicht mit schlechter glykämischer Kontrolle einen protektiven Effekt auf den kardialen I/R-Schaden haben, stimmen damit überein. Weiterhin wurde in unserer Studie festgestellt, dass es eine Korrelation zwischen dem HbA1c-Wert der

diabetischen Patienten und der Infarktgröße der murinen Herzen im Langendorff-Perfusor gibt. Dies deutet darauf hin, dass die erythrozytäre Funktion im kardialen I/R-Schaden durch eine insuffiziente Blutzuckereinstellung bei Diabetikern negativ beeinflusst wird und dies zu einem schlechteren *Outcome* nach einem AMI führt. So wird es auch bei Patienten mit Diabetes mellitus beobachtet [35, 36].

In der Studie von Mahdi et al. wurde eine signifikante Reduktion der Arginase-Aktivität in Erythrozyten von Diabetikern nach Verbesserung der glykämischen Kontrolle festgestellt [66]. Ähnlich wie bei der endothelabhängigen Relaxation konnte die linksventrikuläre Funktion durch Inkubation von Erythrozyten von Diabetikern mit dem Arginase-Inhibitor nor-NOHA sowohl bei schlechter als auch bei guter Blutzuckereinstellung verbessert werden [66]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die pharmakologische Inhibition die Arginase-Aktivität stärker senkt als eine optimierte Blutzuckereinstellung [66].

In Zusammenschau zeigen die Ergebnisse von Mahdi et al., dass eine optimierte Blutzuckereinstellung eine positive Wirkung auf den Effekt der Erythrozyten auf die kardiale Funktion aber nicht auf die endotheliale Funktion hat [66].

Da über die Arginase auch die Bildung von ROS reguliert wird, könnte auch der oxidative Stress über eine Reduktion der Arginase-Aktivität durch optimierte glykämische Kontrolle reduziert werden [66]. Analysen von Superoxid-Bildung in den Koronararterien und bovinen koronaren Endothelzellen zeigten, dass auch die NO-Synthase und die NADPH-Oxidase wichtige Quellen von ROS, induziert durch Diabetes und hohe Blutzuckerspiegel, sind [43]. Arginase 1 in Erythrozyten reguliert die NO-Bildung reziprok über den Verbrauch von L-Arginin, was ein gemeinsames Substrat der Arginase und NO-Synthase darstellt [57]. Da die Arginase-Aktivität bei Diabetikern mit guter Kontrolle des Blutzuckers geringer ist, kann man schlussfolgern, dass die NO-Bioaktivität unter geringeren Blutglukosekonzentrationen höher ist und dies zu einer besseren postischämischen Erholung des Herzmuskelgewebes führt [66]. Nichtsdestotrotz bleibt die Rolle von NO nicht abschließend geklärt. Um die zugrunde liegenden Pathomechanismen näher zu untersuchen, bedarf es weiterer Studien.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass eine schlechte Langzeitglukoseeinstellung die erythrozytäre Funktion im kardialen I/R-Schaden verschlechtert. Zudem konnte diese Studie zum ersten Mal Hinweise auf eine negative Korrelation zwischen dem HbA1c als Marker der Langzeitglukoseeinstellung und der erythrozytär vermittelten kardioprotektiven Wirkung im kardialen Ischämie-Reperfusionsschaden aufzeigen. In der aktuellen Versorgungsleitlinie zur Therapie des Typ-2-Diabetes ist die Senkung des HbA1c-Wertes ein wichtiges Ziel, jedoch als Einzelmaßnahme nicht ausreichend [101].

Eine erythrozytäre Dysfunktion könnte ein Pathomechanismus sein, der bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und zu einem schlechteren *Outcome* nach einem AMI führt [52]. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die dahinterstehende Pathophysiologie besser zu verstehen.

So sind unsere Ergebnisse als wichtiger Aspekt in Hinblick auf den Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die erythrozytäre Funktion im kardialen I/R-Schaden einzuordnen. Eine durch eine schlechte Langzeitblutzuckereinstellung induzierte erythrozytäre Dysfunktion könnte einen wichtigen Faktor bei der Entwicklung und dem Ausmaß eines AMI bei Diabetikern darstellen.

### **4.3 Limitationen der Arbeit**

Grundlage dieser Arbeit ist eine *ex-vivo* Studie, die als weitere Grundlage für die translationale Medizin dient. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Ergebnisse zu bestätigen und um letztendlich einen klinischen Nutzen daraus ziehen zu können. Auch wurden weder ROS, eNOS, noch Arginase-Expression und Aktivität gemessen. Zwar deuten Ergebnisse anderer Studien darauf hin, dass die schädigenden Effekte schlecht eingestellter Diabetiker mit einer Imbalance zwischen eNOS und Arginase und daraus resultierenden erhöhten Konzentrationen von ROS zusammenhängen [70], jedoch sollte weitere Forschung zum auslösendem Pathomechanismus durchgeführt werden.

In dem verwendeten Versuchsaufbau verweilten die Erythrozyten nur während der Ischämie in den murinen Koronarien. Interaktionen von Erythrozyten mit Endothelzellen oder Kardiomyozyten während der Reperfusion werden in diesem Aufbau nicht berücksichtigt. Durch Messung der Infarktgröße nach abgelaufener Ischämie und Reperfusion, kann nicht unterschieden werden, inwieweit sich die kardiovaskulären Risikofaktoren auf die erythrozytäre Funktion während der Ischämie oder Reperfusion auswirken. Es wird lediglich der Gesamteinfluss beurteilt.

Die *Baseline*-Werte der koronaren Flussrate der Herzen, die mit KHB beladen wurden, war signifikant größer als bei den Herzen, die mit Erythrozyten junger, gesunder Probanden beladen wurden. Die Versuche mit murinen Herzen, die mit KHB beladen wurden, wurden als erstes durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Messung der koronaren Flussrate von manuell auf Messung durch die *Flow probe* geändert, da diese genauer ist. So vermuten wir, dass der Unterschied der koronaren Flussrate hierin begründet liegt.

Ein weiterer Punkt ist die Hämolyse, die durch den genutzten Versuchsaufbau zwar minimiert wird, das Risiko allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden kann [50]. In experimentellen Modellen wird der Zelltod meist nach wenigen Stunden beurteilt. So bleibt die Möglichkeit bestehen, dass die getesteten Modifikationen, die den Zelltod verringern, diesen nur verzögern und das vollständige Ausmaß des Zelltods erst nach der Zeit der Messung erfolgen würde. Dieses Problem besteht bei jedweder Forschung zur Reduktion der Infarktgröße [24].

Eine weitere Limitation besteht in der Auswahl der jungen Diabetiker. Der Pathomechanismus hinter der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 sind verschieden. Um vergleichende Aussagen zum Einfluss des Alters treffen zu können, wäre es sinnvoll, in einer weiteren Studie ebenfalls Erythrozyten junger Typ 2-Diabetiker zu untersuchen. Idealerweise sollten diese auch in zwei Gruppen unterteilt werden, eine mit guter und eine mit schlechter Blutzuckereinstellung.

Die Patientengruppen wurden hinsichtlich Alter, Nierenfunktion, Hämatokrit und Hämoglobin-Wert gematcht. Trotzdem ist ein Trend dahingehend zu erkennen, dass in der Gruppe der schlecht eingestellten Diabetiker überwiegend männliche Patienten sind. Viele der Patienten aus den Gruppen befanden sich in Behandlung mit ASS, Clopidogrel, Heparin, Marcumar, Rivaroxaban, Insulin, Metformin oder DPP-4-Inhibitoren. Einige dieser Medikamente wirken sich positiv auf die endotheliale Dysfunktion aus [102, 103]. So ist es möglich, dass die schädigenden Effekte der schlechten Langzeitblutzuckereinstellung unterrepräsentiert sind.

#### **4.4 Zusammenfassung und Ausblick**

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss des Lebensalters, des Vorliegens von Diabetes mellitus und der Langzeitglukoseeinstellung auf die erythrozytäre Funktion im kardialen I/R-Schaden. Dafür wurden die Koronarien von murinen Herzen mit Erythrozyten verschiedener Probandengruppen für die Dauer einer 40-minütigen Ischämie beladen. Während der folgenden 120-minütigen Reperfusion mit KHB wurden die Funktionsparameter des Herzens aufgezeichnet. Anschließend wurde die Infarktgröße bestimmt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine schlechte Langzeitglukoseeinstellung die erythrozytäre Funktion im kardialen I/R-Schaden verschlechtert, während das Alter und das Vorliegen eines Diabetes mellitus keinen negativen Einfluss auf die erythrozytäre Funktion haben.

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine deskriptive Studie, die einen wichtigen Beitrag zur translationalen Medizin leistet. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Pathomechanismen, die den Beobachtungen zugrunde liegen, zu verstehen. Darauf aufbauend können dann neue Behandlungsmöglichkeiten eines akuten Myokardinfarkts oder Strategien zu dessen Prävention, entwickelt werden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Reed, G.W., J.E. Rossi, and C.P. Cannon, *Acute myocardial infarction*. Lancet, 2017. **389**(10065): p. 197-210.
2. Statistisches Bundesamt (Destatis). *Todesursachenstatistik 2017*. 2019 [cited 2019 14.08.2019]; Available from: [https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/data;sid=4E95B67FCF7B3A2D0B052C4C5985B6FA.GO\\_1\\_1?operation=previous&levelindex=3&levelid=1565782822229&levelid=1565782791468&step=2](https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/data;sid=4E95B67FCF7B3A2D0B052C4C5985B6FA.GO_1_1?operation=previous&levelindex=3&levelid=1565782822229&levelid=1565782791468&step=2).
3. Thygesen, K., et al., *Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)*. Eur Heart J, 2019. **40**(3): p. 237-269.
4. Herold, G., ed. *Innere Medizin*. 2016.
5. Boateng, S. and T. Sanborn, *Acute myocardial infarction*. Dis Mon, 2013. **59**(3): p. 83-96.
6. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2018. **39**(2): p. 119-177.
7. Roffi, M., et al., *2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2016. **37**(3): p. 267-315.
8. Viana-Tejedor, A., et al., *Temporal trends in the use of reperfusion therapy and outcomes in elderly patients with first ST elevation myocardial infarction*. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care, 2015. **4**(5): p. 461-7.
9. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
10. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
11. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
12. Neri, M., et al., *Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 7018393.
13. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. Circulation, 1977. **56**(5): p. 786-94.

14. Piper, H.M., K. Meuter, and C. Schafer, *Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **75**(2): p. S644-8.
15. Sanada, S., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(5): p. H1723-41.
16. Avkiran, M., *Protection of the ischaemic myocardium by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors: potential mechanisms of action*. *Basic Res Cardiol*, 2001. **96**(4): p. 306-11.
17. Chi, H.J., et al., *Progress in Therapies for Myocardial Ischemia Reperfusion Injury*. *Curr Drug Targets*, 2017. **18**(15): p. 1712-1721.
18. Hearse, D.J. and A. Tosaki, *Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart*. *Circ Res*, 1987. **60**(3): p. 375-83.
19. Kloner, R.A., et al., *Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop*. *Circulation*, 1998. **97**(18): p. 1848-67.
20. Krug, A., R. Du Mesnil de, and G. Korb, *Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion*. *Circ Res*, 1966. **19**(1): p. 57-62.
21. Heusch, G., et al., *Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside*. *Circulation*, 2009. **120**(18): p. 1822-36.
22. Ito, H., *No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006. **3**(9): p. 499-506.
23. Ito, H., et al., *Clinical implications of the 'no reflow' phenomenon. A predictor of complications and left ventricular remodeling in reperfused anterior wall myocardial infarction*. *Circulation*, 1996. **93**(2): p. 223-8.
24. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 1998. **38**(2): p. 291-300.
25. Siegmund, B., Y.V. Ladilov, and H.M. Piper, *Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(2 Pt 2): p. H506-13.
26. Ganote, C., *Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1983. **15**(2): p. 67-73.
27. Strijdom, H., N. Chamane, and A. Lochner, *Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions*. *Cardiovasc J Afr*, 2009. **20**(5): p. 303-10.
28. Yu, X., et al., *The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe?* *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 8364848.
29. Zweier, J.L. and M.A. Talukder, *The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2006. **70**(2): p. 181-90.

30. Piper, H.M., et al., *The role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in ischemia-reperfusion*. Basic Res Cardiol, 1996. **91**(3): p. 191-202.
31. Heusch, G., K. Boengler, and R. Schulz, *Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(2): p. 151-4.
32. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 481-97.
33. Johansson, S., et al., *Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review*. BMC Cardiovasc Disord, 2017. **17**(1): p. 53.
34. Lundberg, V., et al., *Diabetes as a risk factor for myocardial infarction: population and gender perspectives*. J Intern Med, 1997. **241**(6): p. 485-92.
35. Sasso, F.C., et al., *Role of Tight Glycemic Control during Acute Coronary Syndrome on CV Outcome in Type 2 Diabetes*. J Diabetes Res, 2018. **2018**: p. 3106056.
36. Authors/Task Force, M., et al., *ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. Eur Heart J, 2013. **34**(39): p. 3035-87.
37. Malmberg, K., et al., *Intense metabolic control by means of insulin in patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction (DIGAMI 2): effects on mortality and morbidity*. Eur Heart J, 2005. **26**(7): p. 650-61.
38. Paneni, F., et al., *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I*. Eur Heart J, 2013. **34**(31): p. 2436-43.
39. Hadi, H.A., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(3): p. 183-98.
40. Berkowitz, D.E., et al., *Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels*. Circulation, 2003. **108**(16): p. 2000-6.
41. Shemyakin, A., et al., *Arginase-Inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus*. Circulation, 2012. **126**(25): p. 2943-50.
42. Santhanam, L., et al., *Arginase and vascular aging*. J Appl Physiol (1985), 2008. **105**(5): p. 1632-42.
43. Romero, M.J., et al., *Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity*. Circ Res, 2008. **102**(1): p. 95-102.
44. Pernow, J. and C. Jung, *The Emerging Role of Arginase in Endothelial Dysfunction in Diabetes*. Current Vascular Pharmacology, 2016. **14**: p. 155-162.

45. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
46. Moncada, S. and E.A. Higgs, *The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S193-201.
47. Moreno, P.R. and V. Fuster, *New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(12): p. 2293-300.
48. Cosentino, F., et al., *2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD*. Eur Heart J, 2019.
49. Davidson, S.M., et al., *Circulating blood cells and extracellular vesicles in acute cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2019. **115**(7): p. 1156-1166.
50. Muessig, J.M., et al., *A Model of Blood Component-Heart Interaction in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury using a Langendorff-Based Ex Vivo Assay*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2019: p. 1074248419874348.
51. Yang, B.C., W.W. Nichols, and J.L. Mehta, *Cardioprotective Effects of Red Blood Cells on Ischemia and Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart: Release of Nitric Oxide as a Potential Mechanism*. Journal of Cardiovascular Pharmacology Therapeutics, 1996. **1**(4): p. 297-306.
52. Pernow, J., et al., *Red blood cell dysfunction: a new player in cardiovascular disease*. Cardiovasc Res, 2019. **115**(11): p. 1596-1605.
53. Yedgar, S., A. Koshkaryev, and G. Barshtein, *The red blood cell in vascular occlusion*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2002. **32**(5-6): p. 263-8.
54. Cortese-Krott, M.M. and M. Kelm, *Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function?* Redox Biol, 2014. **2**: p. 251-8.
55. Kuhn, V., et al., *Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(13): p. 718-742.
56. Merx, M.W., et al., *Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction*. Basic Res Cardiol, 2014. **109**(1): p. 398.
57. Yang, J., et al., *Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(37): p. 15049-54.
58. Pernow, J. and C. Jung, *Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal?* Cardiovasc Res, 2013. **98**(3): p. 334-43.
59. Kleinbongard, P., et al., *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2943-51.

60. Cortese-Krott, M.M., et al., *Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease*. *Blood*, 2012. **120**(20): p. 4229-37.
61. Ellsworth, M.L., C.G. Ellis, and R.S. Sprague, *Role of erythrocyte-released ATP in the regulation of microvascular oxygen supply in skeletal muscle*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2016. **216**(3): p. 265-76.
62. Khecuriani, R., et al., *Deformability of red blood cells and human aging*. *Georgian Med News*, 2010(182): p. 42-6.
63. Liochev, S.I., *Reactive oxygen species and the free radical theory of aging*. *Free Radic Biol Med*, 2013. **60**: p. 1-4.
64. Mahdi, A., J. Pernow, and O. Kovamees, *Arginase-Inhibition Improves Endothelial Function in an Age-Dependent Manner in Healthy Elderly Humans*. *Rejuvenation Res*, 2019. **22**(5): p. 385-389.
65. Herrera, M.D., et al., *Endothelial dysfunction and aging: an update*. *Ageing Res Rev*, 2010. **9**(2): p. 142-52.
66. Mahdi, A., et al., *The Effect of Glycemic Control on Endothelial and Cardiac Dysfunction Induced by Red Blood Cells in Type 2 Diabetes*. *Front Pharmacol*, 2019. **10**: p. 861.
67. Wautier, J.L., et al., *Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: A link between surface-associated AGEs and diabetic complications*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994. **91**: p. 7742-7746.
68. Gyawali, P., R.S. Richards, and E. Uba Nwose, *Erythrocyte morphology in metabolic syndrome*. *Expert Rev Hematol*, 2012. **5**(5): p. 523-31.
69. Buys, A.V., et al., *Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study*. *Cardiovasc Diabetol*, 2013. **12**: p. 25.
70. Yang, J., et al., *Red Blood Cells in Type 2 Diabetes Impair Cardiac Post-Ischemic Recovery Through an Arginase-Dependent Modulation of Nitric Oxide Synthase and Reactive Oxygen Species*. *JACC Basic Transl Sci*, 2018. **3**(4): p. 450-463.
71. Zhou, Z., et al., *Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I*. *J Am Coll Cardiol*, 2018. **72**(7): p. 769-780.
72. Babu, N. and M. Singh, *Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2004. **31**(4): p. 273-80.
73. Wautier, J.L., et al., *Erythrocyte adhesion to cultured endothelium and glycaemic control in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients*. *Diabetologia*, 1986. **29**(3): p. 151-5.

74. Sprague, R.S., et al., *A selective phosphodiesterase 3 inhibitor rescues low PO<sub>2</sub>-induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes: implication for vascular control*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(6): p. H2466-72.
75. Zimmer, H.G., *The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers*. *News Physiol Sci*, 1998. **13**: p. 203-210.
76. Skrzypiec-Spring, M., et al., *Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007. **55**(2): p. 113-26.
77. Döring, H.J., *Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff—Geschichte und Gegenwart, Modifikationen und Applikationen*. *European Surgery*, 1996. **28**(6): p. 328-333.
78. Fye, W.B., *H. Newell Martin and the isolated heart preparation: the link between the frog and open heart surgery*. *Circulation*, 1986. **73**(5): p. 857-64.
79. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säufetierherzen*. 1895.
80. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **50**(6): p. 940-50.
81. Ringer, S., *A third contribution regarding the Influence of the Inorganic Constituents of the Blood on the Ventricular Contraction*. *J Physiol*, 1883. **4**(2-3): p. 222-5.
82. Ringer, S., *Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle*. *J Physiol*, 1882. **3**(5-6): p. 380-93.
83. Ringer, S., *A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart*. *J Physiol*, 1883. **4**(1): p. 29-42 3.
84. Beloukas, A.I., et al., *Milestones in the history of research on cardiac energy metabolism*. *Can J Cardiol*, 2013. **29**(11): p. 1504-11.
85. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. *Pharmacol Res*, 2000. **41**(6): p. 613-27.
86. Pasini, E., et al., *The blood perfused isolated heart: characterization of the model*. *Basic Res Cardiol*, 1999. **94**(3): p. 215-22.
87. Mouren, S., et al., *Crystalloid versus red blood cell-containing medium in the Langendorff-perfused isolated heart preparation*. *Eur J Anaesthesiol*, 2010. **27**(9): p. 780-7.
88. Yang, B.C., et al., *Platelets protect against myocardial dysfunction and injury induced by ischemia and reperfusion in isolated rat hearts*. *Circ Res*, 1993. **72**(6): p. 1181-90.
89. Hwang, H., et al., *Isolated Heart preparation*. *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, 2018: p. 185-193.

90. Sumeray, M.S. and D.M. Yellon, *Characterisation and validation of a new murine model of global ischaemia-reperfusion injury*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1998. **186**(1/2): p. 61-68.
91. Sutherland, F.J., et al., *Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003. **30**(11): p. 867-78.
92. Lateef, R., A. Al-Masri, and A. Alyahya, *Langendorff's isolated perfused rat heart technique: a review*. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology*, 2015: p. 1314-1322.
93. Writing Group, M., et al., *Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association*. *Circulation*, 2010. **121**(7): p. e46-e215.
94. Matz, R.L. and R. Andriantsitohaina, *Age-related endothelial dysfunction : potential implications for pharmacotherapy*. *Drugs Aging*, 2003. **20**(7): p. 527-50.
95. Durante, W., F.K. Johnson, and R.A. Johnson, *Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007. **34**(9): p. 906-11.
96. Muessig, J.M., et al., *Poor glycemic control impairs the cardioprotective effects of red blood cells on myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Nitric Oxide*, 2020.
97. Wautier, J.L., et al., *Increased adhesion of erythrocytes to endothelial cells in diabetes mellitus and its relation to vascular complications*. *N Engl J Med*, 1981. **305**(5): p. 237-42.
98. Sprague, R.S. and M.L. Ellsworth, *Erythrocyte-derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intercellular communication*. *Microcirculation*, 2012. **19**(5): p. 430-9.
99. Creager, M.A., et al., *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I*. *Circulation*, 2003. **108**(12): p. 1527-32.
100. Mahdi, A., et al., *Arginase-Inhibition improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus despite intensive glucose-lowering therapy*. *J Intern Med*, 2018. **284**(4): p. 388-398.
101. (BÄK), B., K.B. (KBV), and A.d.W.M.F. (AWMF). *Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Kurzfassung, 1. Auflage, Version 4*. 2013 Zuletzt geändert: November 2014; Available from: [www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de](http://www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de) [cited: 06.11.2019].
102. Nafisa, A., et al., *Endothelial function and dysfunction: Impact of metformin*. *Pharmacol Ther*, 2018. **192**: p. 150-162.
103. Triggle, C.R. and H. Ding, *Cardiovascular impact of drugs used in the treatment of diabetes*. *Ther Adv Chronic Dis*, 2014. **5**(6): p. 245-68.

## **Danksagung**

In erster Linie gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. med. Jung, dem ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung danken möchte. Auch meinem Zweitkorrektor, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Akhyari, möchte ich an dieser Stelle für die Übernahme der Co-Betreuung danken.

Besonders herzlich möchte ich Frau Dr. Müssig danken, für die Übernahme meiner Betreuung, die Einarbeitung in das Thema und die Labortätigkeiten, sowie die Anregungen zu meiner Dissertationsschrift. Sie stand mir stets mit hilfreichem Rat zur Seite.

Zudem gilt mein Dank Stefanie Becher, die bei Schwierigkeiten immer zur Seite stand und mich stets bei Problemen unterstützte.

Auch meinen Eltern Birgit und Harald Nölle möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen. Sie haben in jeglicher Situation ein offenes Ohr für mich und unterstützten mich über das gesamte Studium sowohl menschlich als auch finanziell. Vielen Dank für das Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift.

Zu guter Letzt danke ich ganz herzlich meinem Lebenspartner, Bertold Behle, der in allen Lebenslagen hinter mir steht und mich stets motiviert. Auch ihm danke ich für das Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift.