

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Direktor der Klinik: Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm

Die Rolle der erythrozytären und endothelialen NOS3 in der Anämie und deren
kardioprotektive Effekte nach myokardialer Ischämie/Reperfusionsschaden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sophie Nolde

2024

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abstract (deutsch)	8
Abstract (englisch).....	9
1. Einleitung	10
1.1 Rote Blutzellen und Ihre physiologische Funktion	10
1.2 Anämie.....	11
1.2.1 Definition	11
1.2.2 Einteilung der Anämien	11
1.2.3 Epidemiologie	12
1.2.4. Eisenmangel	14
1.2.5. Inflammation	15
1.2.6. Hämodynamik der Anämie	16
1.2.7. Therapie der Anämie	16
1.3 Die Rolle von NOS3 im Herz-Kreislaufsystem	18
1.3.1 Biosynthese von NO und dessen physiologische Funktion	18
1.3.2 Regulation/Dysregulation von NOS3 im Endothel	20
1.3.3 Einfluss der Anämie auf den NO-Stoffwechsel	21
1.3.4 Bedeutung der NOS3 für kardiovaskuläre Erkrankungen und für die endotheliale Dysfunktion	22
1.4 Die Langendorff-Methode	23
2. Fragestellung und Hypothesen.....	24
3. Material und Methoden	25
4. experimentelle Methoden	27
4.1 Versuchstiere	27
4.2 Beschreibung des Anämie Modells.....	27
4.3 Blutentnahmen	28
4.4 Analyse des Blutbildes	29
4.5 Probenaufbereitung des Vollblutes und der RBC-Suspension	29
4.6 Probenaufbereitung der RBC-Suspension und Zugabe eines NO-Donors	30
4.7 Langendorff – Modell und Modifikation	31
4.8 Organentnahme	33
4.9 Planimetrische Messung der Infarktgröße	33

4.10 Analyse der eNOS-Expression mittels Westernblot-Analyse/ELISA	34
4.11 Angewandte statistische Verfahren	35
5. Auswertung	36
5.1 Auswertung der Anämieparameter und weiterer Befunde	36
5.1.1 Hämoglobingehalt während der akuten und chronischen Anämiewertung	36
5.2 Auswertung der Langendorff-Versuche	39
5.2.1 Ergebnisse der subakuten Anämie und eNOS -/-.....	40
5.2.2 Auswertung der chronischen Anämie	43
5.2.3 Reversibilitätsprüfung der NO-Bioverfügbarkeit anhand des NO-Donors(DEA NONOate)	45
5.3 Auswertung der Planimetrie der Langendorff-Herzen	47
5.3.1 Ergebnisse der akuten Anämie Kohorten	47
5.3.2 Ergebnisse der akuten Anämie Kohorten	49
5.4 Auswertung des Westernblots	51
6. Diskussion	53
6.1 Das Anämie-Modell	52
6.2 Kardio-protectiver Effekt von Erythrozyten	55
6.3 Rolle von eNOS auf die kardiale Funktion nach I/R Schaden	57
6.4 Transfer von Langendorff Experimente auf Patienten mit Akutes Koronarsyndrom	59
6.5 eNOS-bezogene Mechanismen der Erythrozyten-Dysfunktion	61
6.6 Ursachen und Auswirkungen der Anämie auf ein postmyokardiales Outcome	63
6.7 Die Rolle der erythrozytären und kardialen eNOS bei der Kompensation von Anämie und AMI	64
6.8 Limitation der Arbeit	66
7. Schlussfolgerungen.....	69
8. Literaturverzeichnis.....	72

Abkürzungsverzeichnis:

AMI	Akuter Myokardinfarkt
CFR	Koronare Flussreserve
cO₂	Sauerstoffgehalt
± dp/dt_{max}	Maximum der ersten Ableitung des linksventrikulären Drucks nach der Zeit
± dp/dt_{min}	Minimum der ersten Ableitung des linksventrikulären Drucks nach der Zeit
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS^{-/-}	Globale eNOS-Knockout
EPO	Erythropoetin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
nNOS	Neurogene NO-Synthase
Hb	Hämoglobin
HKT	Hämatokrit
hRBCs	Humane Erythrozyten
I/R	Ischämie-/Reperfusionsschaden
KHB	Krebs-Henseleit Puffer
KO	Knockout
LD	Langendorff
LV	Linker Ventrikel
LVDP	left ventricular developed pressure, linksventrikulär entwickelte Druck
LVEDP	left ventricular end diastolic pressure linksventrikulär enddiastolischer Druck
Min	Minuten
MW	Mittelwert
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
n.s	nicht signifikant
NO	Stickstoffmonoxid
paO₂	Sauerstoffpartialdruck

PED	Wedge-Druck
RBCs	Erythrozyten
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standartabweichung
sO₂	Sauerstoffsättigung
TTC	2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid
WT	Wildtyp

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

Abstract (deutsch)

Rationale: Anämie tritt häufig bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) auf und trägt zu einer ungünstigen Prognose bei. Der kausale Beitrag der Anämie und deren Einfluss auf den zirkulierenden Stickstoffmonoxid (NO) Pool im Zusammenhang mit der Mortalität nach akutem Myokardinfarkt (AMI) ist unklar.

Zielsetzung: Die Zielsetzung meiner Untersuchungen ist es, die Auswirkungen der akuten und chronischen Anämie auf den akuten Myokardinfarkt zu untersuchen. Insbesondere soll die Rolle, der durch Anämie verursachten, (Dys-) Funktion der roten Blutkörperchen, sowie deren Effekte auf die endotheliale Stickstoffmonoxid- Synthase (eNOS3) auf die linksventrikuläre Funktion nach Ischämie/Reperfusionsschaden überprüft werden.

Hypothese: Wir stellen die Hypothese auf, dass der zirkulierende NO-Pool bei Patienten mit AMI und Anämie bei der Aufnahme verändert ist und dass die kardioprotektive Kapazität der Erythrozyten beeinträchtigt ist.

Methoden und Resultate: Im Langendorff-Modell wurde der Einfluss von Vollblut oder roter Blutzellen (RBC)-Suspension von anämischen und nicht anämischen Mäusen auf den kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden untersucht. Bei den zur Blutspende verwendeten Mäusen wurde eine subakute (3 Tage) und chronische (6 Wochen) Anämie durch repetitiven Blutverlust (<15% des zirkulierenden Blutvolumens) induziert (Ziel-Hämoglobin-Wert <9g/dl). Dabei wurde der Beitrag der eNOS3 nach genetischer Hemmung durch die Zugabe des Vollblutes, als auch reiner RBC-Suspension von Mäusen mit globaler eNOS^{-/-} Eliminierung (eNOS^{-/-} Knockout (KO)) analysiert. Die kardiale linksventrikuläre Kontraktilität wurde anhand des linksventrikulären Druckgradienten (LVDP) und die über den LVDP abgeleitete Geschwindigkeit der Kontraktion (+dp/dt), Geschwindigkeit der Relaxation (-dp/dt) sowie dem linksventrikulär enddiastolische Druck (LVEDP) gemessen. RBCs und Vollblut von Mäusen mit akuter Anämie verringerten die kontraktile Erholung nach myokardialer Ischämie und anschließender Reperfusion. Isolierte RBCs von chronisch anämischen Wildtyp (WT) -Mäusen zeigten keinen wesentlichen Abfall der gemessenen Parameter, wohin gegen das Vollblut von chronisch anämischen WT-Tieren zu einer Verschlechterung der linksventrikulären (LV) Leistung führte. Die Vollblut Proben von eNOS^{-/-} KO Mäusen ohne Anämie waren ebenfalls durch eine Verschlechterung der LV-Kontraktilität nach Ischämie/Reperfusion charakterisiert, während die gleichzeitige Supplementierung der eNOS^{-/-} KO -Mäuse mit dem NO-Donor (DEA NONOate) die negativen Effekte dieser RBC aufheben konnte.

Schlussfolgerungen: Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine moderate Blutverlustanämie mit einer Funktionsstörung der roten Blutkörperchen und einem verminderten Gehalt an zirkulierendem Stickstoffmonoxid einhergeht. Sowohl die vaskuläre als auch die kardiale endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase spielen eine entscheidende Rolle bei der Anpassung des Herz-Kreislauf-Systems an die Anämie. Die Funktionsstörungen der roten Blutkörperchen in Verbindung mit einer gestörten eNOS-Funktion könnten zu ungünstigen Ergebnissen bei einem akuten Myokardinfarkt beitragen.

Abstract (englisch)

Rationale: Anaemia is common in patients with acute myocardial infarction (AMI) and contributes to an unfavorable prognosis. The causal contribution of anaemia and its influence on the circulating nitric oxide (NO) pool in relation to mortality after AMI is unclear.

Objective: The aim of my research is to investigate the effects of acute and chronic anaemia on acute myocardial infarction. In particular, the role of anaemia-induced red blood cell (dys-) function and its effect on endothelial nitric oxide synthase (eNOS3) on left ventricular (LV) function after ischaemia/reperfusion injury.

Hypothesis: We hypothesise that the circulating NO pool is altered in patients with AMI and anaemia on admission and that the cardioprotective capacity of red cells is impaired.

Methods and results: The Langendorff model was used to study the effect of whole blood or red blood cell (RBC) suspension from anemic and non-anemic mice on cardiac ischemia/reperfusion injury. In mice used for blood donation, subacute (3 days) and chronic (6 weeks) anaemia was induced by repetitive blood loss (<15% of circulating blood volume) (target haemoglobin value <9 g/dl). The contribution of eNOS 3 was analysed after genetic inhibition by the addition of whole blood, as well as pure red blood cell (RBC) suspension from mice with global eNOS^{-/-} elimination (eNOS^{-/-} = Knockout). The cardiac left ventricular contractility was assessed using the left ventricular pressure gradient (LVDP), and the derived contraction velocity (+dp/dt), relaxation velocity (-dp/dt), as well as the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP). RBCs and whole blood from mice with acute anaemia reduced contractile recovery after myocardial ischaemia and subsequent reperfusion. Isolated RBCs from chronic anaemic wild-type (WT) mice showed no significant decrease in the measured parameters, whereas whole blood from chronic anaemic WT animals resulted in a deterioration of LV performance. Whole blood samples from eNOS^{-/-} mice without anemia were also characterised by impaired LV contractility after ischaemia/reperfusion. While simultaneous supplementation of the eNOS^{-/-} mice with the NO donor (DEA NONOate) was able to reverse the negative effects of this RBCs.

Conclusions: In summary, moderate blood loss anemia is associated with dysfunction of red blood cells and reduced circulating nitric oxide levels. Both vascular and cardiac endothelial nitric oxide synthase play a crucial role in cardiovascular adaptation to anemia. Dysfunction of red blood cells combined with impaired eNOS function may contribute to adverse outcomes in acute myocardial infarction.

Einleitung

1.1 Rote Blutzellen und Ihre physiologische Funktion

Rote Blutkörperchen (RBCs), auch häufig als Erythrozyten bezeichnet, sind die häufigste Art von Blutzellen im menschlichen Körper und haben die physiologische Aufgabe den Transport von Gasen (Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid) von der Lunge zu den Geweben sicherzustellen. Zusätzlich stellen sie eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts im Körper dar. [1]

Darüber hinaus sind die Erythrozyten mit antioxidativen Systemen ausgestattet, die wesentlich zu ihrer Funktion und Integrität beitragen. Diese nicht-enzymatischen und enzymatischen Antioxidationssysteme der Erythrozyten sind wichtig, um Hämoglobin (Hb) in einer reduzierten sauerstoffbindenden Form zu halten, oxidative Veränderungen von Membranlipiden, Strukturproteinen, Kanälen und Stoffwechselenzymen zu begrenzen. Somit wird sichergestellt, dass die Zelle während ihrer (durchschnittlichen) 120-tägigen Lebensdauer funktionsfähig am Leben erhalten bleibt. Unter bestimmten Krankheitsbildern kommt es zu einer Hämolyse, welche durch eine Schädigung der Integrität der Erythrozyten gekennzeichnet ist, und eine endotheliale Dysfunktion herbeiführt. Die antioxidativen Wege der Erythrozyten und ihre Fähigkeit, extrazelluläre Antioxidantien über das Transmembranelektronentransportsystem zu reduzieren, machen die Erythrozyten zu einer idealen Sauerstoffradikale (ROS)-Pufferkomponente, die zur allgemeinen systemischen Homöostase des Redoxgleichgewichts beitragen kann.[2] In den letzten Jahren konnten klinische und experimentelle Arbeiten zeigen, dass die Erythrozyten direkt am Gewebeschutz und an der Regulierung der kardiovaskulären Homöostase beteiligt sind, indem sie weitere nicht-kanonische Funktionen ausüben, darunter den Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel (NO). [2] Viele Hypothesen über die Rolle der nicht-kanonischen Funktionen der Erythrozyten in der kardiovaskulären Homöostase wurden aufgestellt. Über die letzten Jahre konnte anhand zahlreicher Studien belegt werden, dass die aus Erythrozyten gewonnene endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (RBC eNOS) eine zentrale Rolle in der Kardioprotektion bei akutem Myokardinfarkt (AMI) hat. [2] Obwohl Erythrozyten unter Hypoxie Stickstoffmonoxid (NO) und Adenosintriphosphat exportieren können, ist derzeit nicht bekannt, ob diese positiven Effekte bei Patienten mit Anämie und akutem Herzinfarkt weiterhin erhalten sind.

1.2 Anämie

1.2.1 Definition

Die Bildung von Erythrozyten wird als Erythropoese bezeichnet und findet im Knochenmark unter dem Einfluss des Hormons Erythropoietin (EPO) statt. [3] Die Regulation von EPO erfolgt in den juxtaglomerulären Zellen der Niere, welche infolge eines verminderten Sauerstoffangebots (wie bei Anämie oder Hypoxie) die Produktion von EPO und Androgenen erhöhen. Neben EPO sind für eine adäquate Produktion von Erythrozyten das Vorhandensein von Grundbausteinen, hauptsächlich Eisen, Vitamin B12, Folsäure und Häm unabdingbar. [3-5]

Eine Anämie ist ein pathologischer Zustand, der durch eine verminderte Anzahl zirkulierender Erythrozyten gekennzeichnet ist. Entsprechend der WHO-Kriterien ist eine Anämie durch eine verminderte Hämoglobinkonzentration (Hb) des Vollblutes auf <13,0 g/dl bei Männern und auf <12,0 g/dl bei nicht-schwangeren und <11,0 g/dl bei schwangeren Frauen definiert. [4, 6] Neben den geschlechtsspezifischen Referenzwerten stellt sich begleitend oft auch ein Absinken der absoluten Erythrozytenzahl sowie ein verminderter Hämatokrit ein. [1, 4] Die Grundlage der Anämiediagnostik besteht in der Durchführung eines Differentialblutbilds mit den entsprechenden Erythrozytenindizes (mittlere korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) und mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC). Zur genauen Ursachenfindung ist die Erhebung von Parameter des Eisenstoffwechsels (Eisen, löslicher Transferrin-Rezeptor, Ferritin und Transferrin), Indizes der Erythrozytenbildung (Retikulozyten, Retikulozytenproduktionsindex) sowie wichtiger Spurenelemente der Erythrozytenreifung (Vitamin B12, Folsäure) notwendig. [7, 8] Die Anämie kann Folge verminderter Bildung der Erythrozyten (Hypo- oder Aplasie der Erythropoese z.B. bei aplastischer Anämie), ineffektiver Erythropoese (z.B. bei megaloblastärer Anämie), verminderter Hämoglobinbildung (z.B. beim Eisenmangel), einer Verteilungsstörung (z.B. in der Schwangerschaft) oder einer Verkürzung der Überlebenszeit der Erythrozyten im peripheren Blut sein (Hämolyse oder Blutung). [5, 9, 10]

Klinisch zeigt sich eine Anämie vor allem durch Leistungsminderung, Schwäche, rasche Ermüdbarkeit, Belastungsdyspnoe, Schwindel, Herzklopfen und durch Blässe von Haut und Schleimhäuten. Diese Symptomatik ist das Resultat eines verminderten Angebots an Sauerstoff im Gewebe und dessen Kompensation durch kardiopulmonale Mechanismen.

[1, 4, 11] Im Zusammenspiel mit anderen Grunderkrankungen führt dies oftmals zu einer erhöhten Hospitalisierungsrate und Langzeitsterblichkeit. [12]

1.2.2 Einteilung der Anämie

Die Anämie lässt sich anhand unterschiedlicher hämatologischer Laborparameter wie dem mittleren korpuskulären Volumen (MCV), dem mittleren korpuskulären Hämoglobin (MCH), der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (MCHC) und auch der Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) in verschiedene Formen unterteilen. Eine Veränderung dieser Laborparameter gibt ebenfalls Rückschluss auf die Ätiologie der Erkrankung. [11] So weisen beispielsweise ein Abfall des MCV und MCH auf eine mikrozytäre, hypochrome Anämie im Rahmen eines Eisenmangels hin.

Ätiologisch unterscheidet man zwischen Mangelanämien, Anämien bei chronischer Erkrankung, Anämien durch Stammzelldefekte und Knochenmarkverdrängung. Davon abzugrenzen sind hämolytische Anämien, welche durch einen erhöhten bzw. vorzeitigen Zerfall von Erythrozyten (Hämolyse) gekennzeichnet sind. Die Ursache hierfür ist vielfältig und reicht von angeboren Enzym-, und Membrandefekten sowie Hämoglinopathien bis hin zur erworbenen Schädigung bei Infektionserkrankungen oder Herzklappenersatz. Eine weitere Subgruppierung von Anämien bilden die Blutungsanämien, welche aufgrund eines großen Blutverlustes einer zeitnahen Bluttransfusion sowie einer frühzeitigen Diagnostik bedürfen, da sie unbehandelt häufig eine Lebensgefahr für den Patienten darstellen. [11]

Bedingt durch die hohe, klinische Prävalenz und Relevanz wird in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Eisenmangelanämie und die Anämie chronischer Erkrankungen gelegt.

1.2.3 Epidemiologie

Bis zu 80% der weltweit auftretenden Anämien sind bedingt durch einen Eisenmangel, welcher bei 25% der Weltbevölkerung besteht. Dabei sind besonders Frauen durch ihren erhöhten Eisenbedarf betroffen. [4] Jedoch kann auch eine mangelnde diätische Aufnahme von verwertbarem Eisen einen absoluten Eisenmangel zur Folge haben.

Die zweithäufigste Form der Anämie ist die Entzündungsanämie, welche auch Anämie bei chronischen Krankheiten (ACD) genannt wird und vorwiegend Menschen mit entzündlichen Erkrankungen wie Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Tumorleiden und chronischen Nierenerkrankungen (CKD) betrifft. Im Gegensatz zur Eisenmangelanämie entsteht die Entzündungsanämie meist aus einem funktionellen Eisenmangel, welcher jedoch klinisch dieselben Anämie-Symptome aufweist. [4] Ursächlich für die Entzündungsanämie sind chronische Grunderkrankungen, welche das Regulationsprotein Hepcidin des Eisenstoffwechsels pathologisch hochreguliert und somit eine suffiziente Aufnahme des Eisens aus dem Magen-Darmtrakt verhindert.

Etwa 30 bis 40% der Patienten mit AMI haben bei der stationären Aufnahme in der Klinik eine Anämie [10] oder entwickeln während des stationären Aufenthalts aufgrund der repetitiven Blutentnahmen eine erworbene Anämie [2]. Darüber hinaus konnte in einer großen multizentrischen elektronischen Forschungsdatenbank für Intensivstationen (eICU) gezeigt werden, dass fast die Hälfte der kritisch kranken Intensivpatienten mit akuten Koronarsyndrom an einer Anämie leiden, die mit erhöhter Schwere der Erkrankung, komplexen Intensivstationsverfahren und Mortalität verbunden ist. Interessanterweise war dieser schlechte klinische Verlauf bereits auch bei milder Anämieform vorzufinden. Somit stellt der Hämoglobinwert bei Aufnahme einen unabhängigen Faktor für einen schlechten klinischen Verlauf bei Patienten mit akuten Koronarsyndrom dar. [10, 13] Zusätzlich kann die Anämie zu schweren Komplikationen wie thromboembolischen Ereignissen, erhöhten Blutungen und Arrhythmien bei Patienten mit abgelaufenem AMI führen, welche in Summe die klinische Prognose der Patienten weiterhin deutlich verschlechtern. Die Wiederherstellung der RBC-Dysfunktion durch Bluttransfusion oder Erythropoese-stimulierende Faktoren hat das Ergebnis bei AMI-Patienten mit Anämie nicht verbessert und zeigte sogar schädliche Effekte. [2, 14] Dies wirft die wichtige Frage auf, ob die Erythrozyten selbst, abgesehen von ihrer verringerten Anzahl und dem dadurch verminderten Sauerstofftransport bei Anämie, eine wesentliche Veränderung in ihrer Funktionseigenschaft erleiden. Durch die Erkenntnis über den Pathomechanismus der RBC-Dysfunktion könnte ein möglicher Therapieansatz bei Patienten mit AMI geschaffen werden. [15, 16] Ziel dieser Arbeit ist die Anämie bezogene erythrozytäre Dysfunktion und deren Auswirkung auf die LV-Funktion nach AMI zu untersuchen.

1.2.4 Eisenmangel

Der menschliche Körper benötigt eine tägliche Eisenzufuhr von 10-15mg. Diese wird vor allem zur Synthese von Hämoglobin verbraucht und in diesem gebunden. Des Weiteren spielt sie eine Rolle bei der Funktion unserer Kraftwerke, der Mitochondrien, so wie in der Skelett- und Herzmuskulatur. [12] Die Gewinnung von Eisen geschieht über mehrere Stoffwechselwege. Zum einen werden 1-2 mg täglich über Resorption des Darmes aufgenommen. [4, 17, 18] Ein weiterer, größerer Teil des Eisens wird beim Abbau der Erythrozyten wiederverwertet und dem Stoffwechsel erneut zur Verfügung gestellt. Nicht benötigtes Eisen wird intrazellulär in Ferritin und Hämosiderin gebunden und gespeichert, um den Körper vor der toxischen Wirkung des freien Eisens zu schützen und Reserven zu bilden. [4, 18]

Ursachen eines absoluten Eisenmangels können eine mangelnde Zufuhr des Eisens durch Mangelernährung als auch durch Malabsorption sein. Außerdem kann ein erhöhter Eisenverlust durch Blutverluste oder einen erhöhten Eisenbedarf z.B. im Rahmen einer Schwangerschaft entstehen. [4] Durch den Mangel an Eisen wird das hepatische Hormon Hepcidin gehemmt und es findet eine vermehrte duodenale Aufnahme und Freisetzung von Eisen statt. Kann dadurch der Eisenhaushalt nicht gedeckt werden und sind die Eisenreserven aufgebraucht, kommt es zur fehlerhaften Synthese der RBCs und infolgedessen zu einer hypochromen, mikrozytären Anämie. [1, 4, 5, 11, 12]

Der Eisenmangel kann in einem absoluten und einem funktionellen Eisenmangel unterschieden werden. [4] Bei einer langfristigen bestehenden Anämie ($Hb < 10.9 \text{ g/dl}$) wird durch den Eisenmangel die Fähigkeit der Erythrozyten zum Transport von Sauerstoff herabgesetzt durch die mangelnde Bildung von Häm-Molekülen, wodurch weniger Sauerstoff an die Erythrozyten binden kann, bzw. durch die insgesamt verringerte Menge an Erythrozyten. Auf physiologischer Weise bindet der Sauerstoff an das im Hämoglobin verbaute Eisenmolekül, um in das periphere Gewebe zu gelangen und diese mit Sauerstoff zu versorgen. [5] Bei einer milden Anämie von 12 g/dl bis 10.9 g/dl bleibt der Sauerstoffgehalt des Blutes annähernd gleich. [12, 19] Entsprechend des Schweregrades der Anämie nimmt die Sauerstofftransportkapazität des Blutes ab, welche zu einer Hypoxie des Gewebes führt und eine Reihe von Folgereaktionen auslöst.

Ein funktioneller Eisenmangel entsteht, wenn Hepcidin im Rahmen einer anderen Erkrankung durch Zytokin-Ausschüttung aktiviert wird. Dies führt zu einer vermehrten Hepcidin-Aktivität, welches an Ferroportin bindet und dadurch sowohl die Resorption von

diätisch aufgenommenem Eisen verhindert als auch die Freisetzung von Eisenreserven stoppt. [4, 12, 18, 20] Je niedriger das Eisenniveau und der Hb-Wert, desto schwerer die Anämie und desto höher ist das Mortalitätsrisiko unter Patientin mit AMI. [21] In den letzten Jahren wurde in klinischen Studien deutlich, dass der Zeitpunkt der Eisenbehandlung während des Herzinfarktes und nach der Reperfusion von entscheidender Prognose für das Outcome der Patienten ist. Während die Verabreichung von Eisen vor oder während der Ischämie oder unmittelbar vor der Reperfusion nachteilig zu sein scheint, scheint sie bei der chronischen ischämischen Herzerkrankung von Vorteil zu sein. In einer experimentellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zeitliche Verschiebung der Eisengabe auf 24 Stunden nach Reperfusion einer akuten Myokardischämie ein attraktives Zeitfenster ist, um den anfänglichen Umbauprozess des linken Ventrikels positiv zu beeinflussen. [22] Dennoch fehlen weiterhin große klinische Studien, die diese positiven Effekte der Eisengabe bestätigen.

1.2.5 Inflammation

Ein Schlüsselenzym des Eisenstoffwechsels ist das Akute-Phase-Protein Hepcidin. Unter physiologischen Bedingungen wird der Eisenstoffwechsel über das Hormon Hepcidin reguliert. Hierbei reguliert das Hepcidin in Abhängigkeit der Eisenverfügbarkeit im Körper die duodenale Aufnahme des Eisens über die Expression von Ferroportin und die Freisetzung von Eisen aus den körpereigenen Eisenspeichern. [18, 20] Durch chronische Grunderkrankungen wie beispielsweise Autoimmunerkrankungen, Diabetes mellitus, maligne Erkrankungen und Infektionskrankheiten kommt es im Körper zu einer langsamen kontinuierlichen Inflammation. [4] Dies führt zu einer ständig vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-1, Interleukin-6, Interferon-gamma und anderen, welches zu einer Fehlregulation der Hepcidin-Aktivität und somit einem Ungleichgewicht im Eisenstoffwechsel bewirkt. [4] Weitere Auslöser einer Stimulation von Hepcidin können Hypoxie oder Anämien anderer Genese sein. [4, 20, 23]

Wie oben genannt ist einer der Hauptakteure dieser Reaktionen, das in der Leber gebildete Hepcidin. [11] Das bei der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine vermehrt gebildete Hepcidin bindet unter anderem an Ferroportin und verhindert sowohl die Resorption von diätisch aufgenommenem Eisen als auch die Freisetzung von Eisen aus den körpereigenen Reserven. [4, 12, 18, 20] Dies resultiert in einem funktionellen Eisenmangel,

sodass im Körper vorhandenes Eisen nicht zur Erythropoese verfügbar ist. [11] Eine so entstandene Anämie ist laborchemisch charakteristischerweise definiert durch ein normales oder vermindertes MCV/MCHC und eine normozytäre, normochrome Anämie. [11]

1.2.6 Hämodynamik der Anämie

Der Verlust der Zellintegrität und die Funktionsstörung der Erythrozyten bei Anämie ist eng mit der Regulierung der Blutviskosität, des peripheren Widerstands sowie der Herz- und Gefäßfunktion verbunden. Diese werden zum größten Teil vom NO-Stoffwechsel und der Redox-Regulierung kontrolliert. Wie auch in der Arbeit von Westenbrink et al. gezeigt werden konnte, stellt die intrinsische Dysfunktion der Anämie nicht nur eine Begleiterscheinung/Komorbidität dar, sondern ist auch im Wesentlichen für das Auftreten von schweren Komplikationen, wie thromboembolische Ereignisse und erhöhte Blutungen verantwortlich. [24] Derzeit bleibt weiterhin unbekannt, ob die mit der Anämie verbundenen Komplikationen auf die Abnahme der Anzahl an zirkulierenden Erythrozyten (die eine systemische Funktionsstörung der normalen Erythrozyten hervorruft) oder vielmehr auf eine intrinsische Funktionsstörung der Erythrozyten (z.B. weniger effiziente Redox-Pufferung, verringerte NO-Produktion, erhöhte Fragilität der Erythrozyten) oder auf beides zurückzuführen sind.

Neben den Veränderungen der zellulären Blutbestandteile, wird die erhöhte Mortalitätsrate durch eine verminderte Sauerstoff-Kapazität der Erythrozyten bedingt. Folglich resultiert daraus zunächst eine kompensatorische Erhöhung der Herzfrequenz und des Herzzeitvolumens, um die Sauerstoffversorgung der Organe zunächst weiterhin sicher zu stellen. [25] Im Falle eines akuten Myokardinfarktes wird dieser Kompensationsmechanismus gestört, sodass die vorherrschende Mikrozirkulationsstörung zu einer Hypoxie der Organe und des peripheren Gewebes führen, welche einen ungünstigen klinischen Verlauf begünstigen.

1.2.7 Therapie der Anämie

Nach aktueller Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) wird bei einem alimentären Eisenmangel zunächst eine Ernährungsberatung empfohlen. Bei weiterreichendem symptomatischem Eisenmangel

kann eine orale Eisensubstitution mittels zweiwertigen Eisens über drei Monate erfolgen. [7] Diese sollte an alternierenden Tagen erfolgen, da die Einnahme über einen Zeitraum von 24h die Hepcidin-Serumkonzentration steigert und somit zu einer verringerten Resorption nachfolgender Dosen führen kann. In schweren Fällen eines Eisenmangels kann eine tägliche Gabe erwogen werden. [7] Eine intravenöse Eisensubstitution (z.B. Ferinject® oder Ferlecit®) bleibt starkem Eisenmangel und nicht behandelbaren Resorptionsstörungen vorbehalten. [7] Der Erfolg der Therapie sollte in regelmäßigen Laborabnahmen nach einer Woche, so wie nach drei Monaten kontrolliert werden. [7] Des Weiteren sollte eine zugrunde liegende Erkrankung als additive Ursache der Anämie abgeklärt und mitbehandelt werden. [7]

Derzeit gibt es keine, durch eine Leitlinie vorgegebene Therapieansätze für Patienten, welche während einer Anämie eine myokardiale Ischämie erleiden und hospitalisiert werden müssen. Im klinischen Alltag erfolgt die Indikation zur Transfusionstherapie unter Berücksichtigung des Hämoglobinwertes und der Symptomatik des Patienten. Somit konnte eine Senkung der Krankenhausmortalität bei kritisch kranken Herzpatienten durch eine Bluttransfusion bei einem Hb-Wert < 8 bis 9 g/dl erzielt werden. Dieser Hb-Schwellenwert für Transfusionen lag bei 9 bis 10 g/dl im Falle eines AMI. [26] Zwar konnte die Transfusion von roten Blutzellen nachweislich eine signifikante Verbesserung der Sauerstofftransportkapazität und der klinischen Symptomatik der betroffenen Patienten herbeiführen [27], jedoch zeigten sich keine positiven Effekt auf das klinische Ergebnis nach AMI. Mögliche Gründe für die weiterhin hohe Sterblichkeit nach einer Bluttransfusion sind eine Volumenüberladung, gesteigerte Thrombogenität sowie erhöhte Hämolyse und der daraus resultierenden erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS = Reaktive Oxygen Species). [14, 27, 28] Sowohl die restriktive als auch die liberale Indikation zur Transfusion von Erythrozyten konnten ähnliche Wirkungen auf die Gesamtmortalität und die langfristigen klinischen Ergebnisse bei AMI-Patienten mit Anämie aufweisen. [16] Zhang et al konnten allerdings nachweisen, dass die restriktive Transfusion im Vergleich zur liberalen Transfusion mit einem höheren Risiko für die Krankenhaussterblichkeit verbunden ist. [16] Dabei wird kontrovers diskutiert, ob die Lagerungszeit und somit das Alter der Erythrozyten einen Einfluss auf das klinische Outcome der Patienten nach Transfusion hat. [29] Somit wurde in mehreren Studien über die Auswirkungen auf verschiedene herzbezogene Parameter berichtet, die auf die Transfusion "alter" Erythrozyten bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder nach Herzoperationen zurückzuführen sind, wie z. B. das Risiko einer Sterblichkeit im

Krankenhaus, einer Beeinträchtigung der Lungen- oder Herzfunktion und von Gefäßerkrankungen. Im Gegensatz dazu zeigen andere Studien, dass bei herzchirurgischen Patienten (sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen), die "alte" oder "junge" Erythrozyteneinheiten erhalten, kein signifikanter Anstieg der unerwünschten Ereignisse einschließlich der Sterblichkeit zu verzeichnen ist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Transfusionsstrategie in künftigen Studien weiter untersucht werden sollte. Zusätzlich gibt es weiterhin ein hohes Bestreben, den genauen Pathomechanismen der zugrundeliegenden RBC-Dysfunktion herauszufinden, um eine spezifische Therapie der zu Grunde liegenden Anämie zu entwickeln.

1.3 Die Rolle von NOS3 im Herz-Kreislaufsystem

1.3.1 Biosynthese von NO und dessen physiologische Funktion

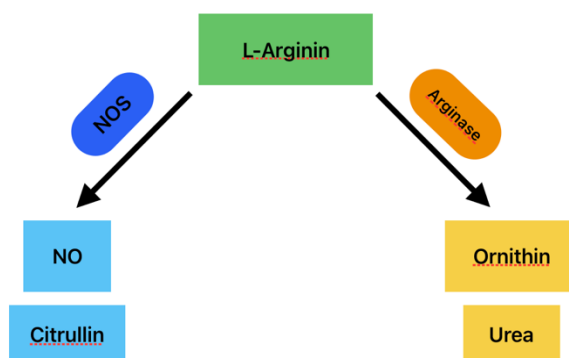


Abbildung 1: Arginase und NOS konkurrieren um das Substrat L-Arginin. Bei der Reaktion mit NOS entstehen NO und Citrullin. Bei der Reaktion mit Arginase Ornithin und Urea.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Gas, welches im Körper als intra- und extrazellulärer Botenstoff und Neurotransmitter agiert und als kurzlebiges Radikal durch die verschiedenen Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) am Ort des Geschehens aus Arginin gebildet wird. [5]

Das Molekül NO ist ein Vasodilatator, das von eNOS-Enzymen im Endothel produziert wird und seine Wirkung über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase in den glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt. Erythrozyten sind in der Lage NO durch die Reaktion mit OxyHb unter Bildung von metHb und Nitrat zu inaktivieren. Im Plasma, im Gewebe und in den Erythrozyten kann NO zu NO₂- oder NO₃- und zu anderen Metaboliten oxidiert werden. Unter hypoxischen Bedingungen kann NO₂- mit DesoxyHb zu NO reagieren, von dem angenommen wurde, dass es die hypoxische Vasodilatation vermittelt und die

Thrombozytenaggregation hemmt. Darüber hinaus wurde angenommen, dass die hypoxische ATP-Freisetzung durch Erythrozyten durch die Aktivierung von eNOS im Endothel eine Vasodilatation bewirkt. [2, 30]

Neben der eNOS nimmt die Arginase der Endothelzellen, als wichtiger Regulator der NO-Produktion, eine große Rolle ein, da sie mit dem Enzym eNOS um ihr gemeinsames Substrat L-Arginin konkurriert. [31] Eine erhöhte Arginase-Aktivität, die durch reaktive Sauerstoffspezies, proinflammatorische Zytokine und Hypoxie ausgelöst wird, kann daher die Bioverfügbarkeit von L-Arginin, welches für die NO-Produktion in Endothelzellen zur Verfügung steht, begrenzen. Dementsprechend erhöht die Hemmung der Arginase die aus dem Endothel stammende NO-Bildung und verbessert die endothelabhängige Gefäßerweiterung in Tiermodellen und bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. [32, 33] Darüber hinaus verringert die Hemmung der Arginase die Größe des Myokardinfarkts sowohl in einem Ratten- als auch in einem Schweinemodell mit Koronararterienligatur und Reperfusion in vivo. [34, 35] Die Wirkung der Arginase-Hemmung wurde durch einen NOS-Inhibitor (N-omega-hydroxy-nor-L-arginine) und einen NO-Radikalfänger (Carboxy-2-Phenyl-4,4,5,5-Tetramethyl-Imidazoline-1-Oxyl-3-Oxide) blockiert, was zeigt, dass sie über eine verstärkte NO-Bildung aufgrund einer Verschiebung des Arginin-Stoffwechsels von Arginase zu NOS vermittelt wurde.[34]

Insgesamt wurden über die letzten Jahre drei Stickstoffmonoxidsynthasen beschrieben, welche in eine endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) unterteilt werden können. [5] Des Weiteren konnte durch Kleinbongard et al eine eNOS-Aktivität in den Erythrozyten nachgewiesen werden, welche ebenfalls einen großen Anteil zum NO-Pool beiträgt und deren Verhalten ähnlich dem der endothelialen NOS ist. [36] Die Aktivierung der eNOS und nNOS erfolgen durch erhöhte Calcium- und Calmodulin-Konzentration. Demgegenüber wird die iNOS, welche vor allem in Makrophagen vorkommt, durch eine Zytokin-Ausschüttung, wie beispielsweise durch TNF- α , IL1 β oder IFN- γ aktiviert. [5]

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der eNOS Aktivität, welche das zentrale Enzym in der Blutdruckregulation darstellt. Die eNOS wird sowohl von Endothelzellen als auch von Erythrozyten produziert. [37] Hierbei kommt der RBC spezifischen eNOS eine tragende Rolle in der Regulation des Stickstoffmonoxid-Stoffwechsels, der systemischen Hämodynamik und des Blutdrucks bei. [38]

Der zirkulierende NO- Pool trägt eine wesentliche Rolle in der kardiozirkulatorischen Adaptation während eines akuten Herzinfarktes bei. [1] Hauptproduzenten des zirkulierenden NO-Pools sind die endothelialen und erythrozytäre NOS, welche durch ihre aktiven NO-Metaboliten zu einer Vasodilatation und einer Hemmung der Thrombozytenaggregation führen. Somit wird die Vasodilatation durch eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur hervorgerufen, welche durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch NO und die damit verbundene Erhöhung des intrazellulären zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) verursacht wird. [1] Insgesamt trägt die eNOS durch die Produktion von Stickstoffmonoxid dazu bei, die Thrombozytenaggregation zu hemmen und das Gleichgewicht im Gefäßsystem aufrechtzuerhalten. Störungen in der NO-Produktion oder - Funktion können folglich zu einer erhöhten Thromboseanfälligkeit führen.

Zusammenfassend konnte Cortese-Krott et al. zeigen, dass die endotheliale eNOS primär die koronare Hämodynamik beeinflusst, aber keine nachteiligen Auswirkungen auf den AMI hat. Umgekehrt wirkt sich das Fehlen von der RBC spezifischen eNOS nicht auf die koronare oder myokardiale Funktion unter homöostatischen Bedingungen aus, sondern begrenzt sich auf die Infarkt-induzierten Herzschäden und deren Verschlechterung der LV-Funktion nach AMI. [39]

1.3.2 Regulation/Dysregulation von NOS3 im Endothel

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein endogener Vasodilatator, der von mehreren NO-Synthasen gebildet wird und hauptsächlich zur Kontrolle des Gefäßtonus beiträgt. In Ruhe kommt es zu einer geringen kontinuierlichen Ausschüttung von NO aus den Endothelzellen. Eine erweiterte NO-Ausschüttung wird zum einen durch die auf die Endothelzellen wirkende Schubspannung und stimulierende Substanzen wie z.B. Bradykinin oder Endothelin induziert. [1] Eine Hochregulierung der vaskulären eNOS kann die strömungsvermittelte Dilatation verbessern, den systemischen Gefäßwiderstand verringern und so die Sauerstoffzufuhr zum peripheren Gewebe erleichtern. Eine erhöhte kardiale NO-Bioverfügbarkeit bewirkt eine Kardioprotektion während des AMI, indem die linksventrikuläre (LV) Dysfunktion und der nachteilige Remodeling des Herzens nach AMI abgeschwächt wird. [19, 40]

Zu einer Dysregulation der eNOS-Funktion kommt es beispielsweise im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion. Bei AMI kann dies von besonderer Bedeutung sein, da akute

und chronische endotheliale Dysfunktion häufig durch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus hervorgerufen werden. Diese Fehlregulation des Endothels verhindert die kardiozirkulatorische Kompensation in der Anämie, welches die Prognose bei ischämischer Herzkrankheit und AMI beeinträchtigen kann. [41] Zusätzlich wandern durch die erhöhte Membrandurchlässigkeit Lipoproteine ein, welche im Sinne einer Arteriosklerose Plaques bilden und somit den Gefäßdurchmesser und Thrombozytenaggregation negativ beeinflussen. [1, 41] Im Bereich einer arteriosklerotischen Gefäßstenose kann die endotheliale Dysfunktion durch einen relativen Acetylcholin-Überschuss mit einer nachfolgenden vasokonstriktorischen Wirkung die Koronarperfusion weiter verschlechtern. Durch die unzureichende Vasodilatation der Koronargefäße wird ein Mismatch von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot verursacht, welches ischämiebedingte Symptome wie die Angina pectoris auslösen kann. [11]

1.3.3 Einfluss der Anämie auf den NO-Stoffwechsel

Neben der endothelialen NO-Synthase trägt auch die erythrozytäre NO-Synthase nicht unerheblich zur NO-Produktion bei. Die Forschungsergebnisse von Kleinbongard et al zeigen, dass eine endotheliale Dysfunktion mit einer reduzierten NO-Bioaktivität einhergeht. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in der Anämie die Reduktion funktionstüchtiger RBCs zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit führen und somit die Prognose nach einer myokardialen Ischämie verschlechtern kann. [36]

Die Ergebnisse von Liu et al stellen außerdem den Blutfarbstoff Hämoglobin als eines der hauptverantwortlichen Proteine dar, welche bekannt ist die Bioaktivität von Nitrit zu steuern. [42] Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Sichelzellerkrankheit das zellfreie eisenhaltige Hämoglobin das Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) abfängt und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugen kann. Klinische Studien an Sichelzellerkrankten konnten zeigen, dass die Anwendung einer Stickstoffmonoxid-Spenderinfusion keine Vasodilatation des Unterarmblutflusses hervorrufen konnte, da durch das Abfangen des NOs dessen Bioverfügbarkeit vermindert wird. Therapien, die Plasmahämoglobin durch Oxidation oder Stickoxid-Ligation inaktivieren, stellen die Bioverfügbarkeit von Stickoxid wieder her. [43] Somit würde in der Anämie durch Hämolyse das freie Hämoglobin NO abfangen, welches zur verminderten Bioverfügbarkeit des zirkulierenden NO-Pools beitragen könnte.

Als gegenregulatorische Kompensation konnten Wischmann et. al zeigen, dass während einer Anämie die Hochregulierung von vaskulärer und erythrozytärer eNOS entscheidend ist, um den reduzierten zirkulierenden NO-Pool bei Anämie zu kompensieren. Dieser eNOS spezifische Kompensationsmechanismus ist nach AMI aufgehoben, welches durch eine erhöhte ROS-Produktion und eNOS-Entkopplung verbunden ist. Dies spiegelt sich in einer Verschlechterung der LV-Funktion sowie einer erhöhten Mortalität bei anämischen Mäusen nach Ischämie/Reperfusionsschaden wider. [13, 44]

1.3.4 Bedeutung der eNOS für kardiovaskuläre Erkrankungen und für die endotheliale Dysfunktion

Die eNOS ist verantwortlich für die Produktion von NO in den Endothelzellen der Blutgefäße. Im Vergleich zu anderen Mediatoren wie Bradykinin, Adenosin und anderen vasodilatativen Botenstoffen wirkt NO als schnellster Vasodilatator an der glatten Muskulatur der Koronarien. Der schnelle Wirkungseintritt des NO lässt sich dadurch erklären, dass NO als second messenger ohne die Notwendigkeit einer Rezeptoraktivierung direkt an den Guanylatcyclasen der glatten Muskelzellen wirkt. [45]

Des Weiteren konnte durch Heusch et al belegt werden, dass bei Eintreten einer myokardialen Ischämie, NO eine Rolle in der Myokardprotektion spielt, welches über eine Art der Hibernation vermittelt wird. Somit reduziert NO den Sauerstoffverbrauch und die Energiekosten, während die kontraktile Funktion des Myokards durch Aufrechterhaltung der Calciumsensitivität erhalten bleibt. [46]

Die endotheliale Dysfunktion ist ein Zustand, bei dem die normale Funktion der Endothelzellen gestört ist. Dies kann durch verschiedene Faktoren wie Entzündungen, oxidativen Stress und andere Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursacht werden. In der endothelialen Dysfunktion kann die Produktion von NO durch NOS3 beeinträchtigt sein, was zu einer verminderten Vasodilatation und einer gestörten Gefäßfunktion führt. [39, 41, 47] Dies kann im weiteren Verlauf eine Atherosklerose begünstigen und durch die fehlregulierte Gefäßweiteinstellung ebenfalls einen arteriellen Hypertonus fördern. In Zusammenschau würden diese Faktoren sich im Falle eines AMI negativ auf den Verlauf auswirken, da durch die herabgesetzte Vasodilatation die Koronarperfusion vermindert würde. Die fehlende Hemmung der Thrombozyten würde eine Thrombosierung und somit einen vollständigen Gefäßverschluss begünstigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der zirkulierende NO-Pool, der von der endothelialen und erythrozytären NOS gebildet wird, wesentlich zum Überleben und zur klinischen Prognose nach einer Myokardischämie beiträgt. Dies geschieht durch die protektive Wirkung auf das Myokard, eine Verbesserung der Koronardurchblutung durch Vasodilatation und eine positive Beeinflussung der Thrombozytenaggregation.

1.4 Die Langendorff-Methode

Carl Ludwig und Elias Cyon führten an der Universität Leipzig erste Untersuchungen an isolierten Herzen durch, zunächst an Froschherzen. [48, 49] Damals hatte das Modell Einschränkungen, da das kardiovaskuläre System fehlte. [49] Zwischen 1881 und 1889 entwickelte Newell Martin das Modell weiter, diesmal mit Hunde- und Katzenherzen, die er mit Rinderblut perfundierte. Doch Rinderblut war nicht ideal, da es die Herzen nicht lange am Leben hielt. [48] Die von Ringer und Kollegen entwickelte Salzlösung brachte einen Fortschritt für klinische Therapie und Forschung am isolierten Herz. [49-51]

Dies legte den Grundstein für das von Langendorff im Jahr 1895 entworfene Modell isolierter retrograd perfundierter Säugetierherzen.[50, 51] Hierbei wird die Aorta ascendens über eine Kanüle rückwärts, gegen den normalen Blutfluss, mit Blut oder Lösung perfundiert. Das Blut fließt über die Koronararterien, dann durch den Koronarsinus und zurück in den rechten Vorhof. [49, 52] Dies ermöglicht die Erfassung des Effluats, das vom schlagenden Herz abfließt, um es zu analysieren. Langendorff nutzte dieses Verfahren, um die Kontraktion und andere Aspekte des Herzens zu untersuchen, wie z.B. die Effekte von Temperatur, Stimulation und Ischämie/Reperfusions-Schaden.

Die Langendorff-Methode erlaubt eine isolierte Betrachtung des Herzens, ohne Einfluss von anderen Organen oder äußeren Faktoren. Dies eignet sich gut für die Untersuchung von Medikamentenwirkungen. Allerdings kann sie nicht die Wirkung von Metaboliten aus anderen Organen erfassen. Die Methode ist nützlich für die Erforschung akuter toxischer Prozesse am Herz. Sie minimiert auch Stressfaktoren für die Versuchstiere. Die LD-Methode ermöglicht verschiedene Messungen am isolierten Herz, wie Kontraktilität, Herzfrequenz, Gefäßtonus, Stoffwechsel und elektrische Aktivität. Sie erlaubt die Erforschung von I/R-Schäden, Transplantationen, Zelltherapien, Hypoxie und Arrhythmien. [49]

2 Fragestellung und Hypothesen

Die Hypothese dieses Forschungsprojekts besagt, dass die Anämie sowohl eine eNOS-Dysfunktion der roten Blutkörperchen (RBC) als auch eine Dysregulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) verursacht. Diese Veränderungen führen zu einer Verringerung des zirkulierenden Stickstoffmonoxid(NO)-Pools, was wiederum eine negative Auswirkung auf die myokardiale Kontraktilität nach einem erfolgreich reperfundierten akuten Myokardinfarkt (AMI) ausübt.

Im Einzelnen werden die folgenden spezifischen Fragestellungen untersucht:

1. Inwiefern beeinflussen die RBC die myokardiale Funktion über den Export von NO Bioaktivität
 - a. In Abhängigkeit des Hämoglobingehalts im akuten und chronische murinen Anämie-Modell?
 - b. In Abhängigkeit von NO-Donoren oder NO-Scavengern im akuten und chronisch murinen Anämie-Modell?
2. Inwiefern lassen sich die Ergebnisse der isolierten Langendorf Experimente im Mausmodell auf den klinischen Alltag bei Patienten mit akuten Koronarsyndrom und Anämie übertragen?

3. Material und Methoden

Alle nicht im Nachfolgenden aufgelisteten Laborgeräte, Materialien und Chemikalien sind Standard-Laboraausstattung des kardiologischen Labors der Heinrich-Heine-Universität oder wurden von anderen Herstellern in p. A. (pro Analysis) Qualität bezogen.

Tabelle 1: Verbrauchs- und sonstige Materialien

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

Tabelle 2: Verwendete Versuchsgeräte

Material	Hersteller
Blutgasanalysator (ABL800 FLEX)	Radiometer Copenhagen, (Dänemark)
Coaxial stimulation electrode mini (73-0181)	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, Deutschland)
Digitale Farbkamera (Leica DFC 425 C)	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Farbkamera für die TTC- Aufnahmen, Model HV- C20AMP	Hitachi Kokusai Electric Inc. (Tokyo, Japan)
Feinwaage	Sartorius Lab Instruments GmbH Co. KG (Göttingen, Deutschland)
Immersion Thermostat Lauda E100	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Inverses Mikroskop (Leica DMIL)	Leica (Etzlar, Deutschland)
ISOTEC Pressure Transducer	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Deutschland)
Langendorff- Apparatur (isolated heart, size 1)	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, Deutschland)
Magnetrührer und -Schüttler (IKAMAG RET)	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland

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

Tabelle 3: verwendete Chemikalien und Medikamente

Chemikalie/Medikament	Hersteller
2- Propanol	VWR Chemicals BDH (USA)
2- Propanol 70%	Otto Fischer GmbH & Co. KG
2- Propanol 96%	Otto Fischer GmbH & Co. KG
2,3,5- Triphenyltetrazolium chlorid (C ₁₉ H ₁₅ CIN ₄)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Calciumchloride dihydrate (CaCl ₂)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Carbogen Lab (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde AG, Pullach, Deutschland
D- (+)-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
DetectX® Hemoglobin Colorimetric Detection Kit	Arbor Assays (Ann Arbor, MI, USA)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
EMSURE ACS, ISO, Reag. Ph Eur Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Eosin G – Lösung 0,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Deutschland)
Ethanol 70% (V/V) Denatured Eurodenaturant	VWL Chemicals BDH (USA)
Formaldehydlösung 4%, Roti®-Histofix 4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium Injektionslösung	Rotexmedica GmbH (Trittau, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ *7H ₂ O)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Mayers Hämalun – Lösung	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	VWL Chemicals BDH (USA)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ H ₂ O)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Sodium Pyruvat (C ₃ H ₃ NaO ₃)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Vitro-Clud	R. Langenbrinck GmbH, (Emmendingen, Deutschland)

Xylene	VWL Chemicals BDH (USA)
--------	-------------------------

Tabelle 4: verwendete Software

Software	Verwendung
Diskus-Mikroskopische Diskussion	Hilgers Technisches Büro, Königswinter, (Deutschland)
GraphPad Prism® version 6.01	Graph Pad Software, Inc. (San Diego, USA)
EndNote 20	Clarivate Analytics (USA)
Office 360 (Word)	Microsoft Corp., (Redmond, Washington USA)
Omega Software Version 3.00 R2	BMG LABTECH (Ortenberg, Deutschland)
IOX 2.4.5.6	Emka Technologies (Paris, Frankreich)

4. Experimentelle Methoden

4.1 Versuchstiere

Aufgrund der Ähnlichkeit physiologischer Prozesse in verschiedenen Säugern können die gewonnenen Mausexperimente im Wesentlichen auf den Menschen übertragen werden. Außerdem sind die Versuchsaufbauten des kardiologischen Labors auf das Arbeiten mit Mäusen ausgelegt und es besteht eine langjährige Expertise auf diesem Feld.

Verwendet wurden für die ex-vivo Versuche 10-12 Wochen alte, männliche C57Bl/6J (Janvier Labs, Saint-Berthevin Cedex; Frankreich) (Wildtyp, WT) Mäuse. Als Blut-Donor für das später erläuterte präischämische Laden des Wildtyp-Herzens im Langendorff Versuch wurden ebenfalls oben genannte Wildtyp-Mäuse, als auch die NOS3 KO (C57BL/6(NOS3)TmPhänotyp^{-/-}) mit einem phänotypisch globalem Knockout der NOS3 verwendet.

Alle Tierversuche wurden vom LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) in Übereinstimmung mit dem Europäischen Übereinkommen zum Schutz, der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere genehmigt. (Aktenzeichen: 81-02.04.2018.A234; 84-02.04.2015.A498).

4.2 Beschreibung des Anämie Modells

Um die Auswirkung der Anämie zu untersuchen, wurden die Versuchstiere, welche später als Blut-Donor fungieren, nach dem Zufallsprinzip in die Kohorten subakute und chronische Kontroll-Gruppe sowie subakute Anämie und chronische Anämie eingeteilt. Die Mäuse der subakuten Anämie und der zugehörigen Kontrollgruppe waren zehn bis

zwölf Wochen alte männliche C57Bl/6J (Janvier Labs, Saint-Berthevin Cedex; Frankreich) (Wildtyp, WT) Mäuse. Die chronischen Kohorten und deren Kontroll-Gruppen waren vier bis sechs Wochen alte, männliche C57Bl/6J (Janvier Labs, Saint-Berthevin Cedex; Frankreich) (Wildtyp, WT), welche über einen Zeitraum von 6 Wochen durch repetitive Blutentnahmen vorbehandelt wurden. Die Kontroll-Gruppe bestand initial ebenfalls aus 4-6 Wochen alten Mäusen, damit diese zum Versuchszeitpunkt genau so alt wie die chronische Anämie-Kohorte sind. Nach Induktion der chronischen Anämie waren die Mäuse ebenfalls 10-12 Wochen alt und wurden dem entsprechenden Versuch zu geführt. Zum Volumenausgleich des Blutverlustes erhielten die Tiere täglich ein Kristalloid (NaCl) in einem Verhältnis zur Blutentnahme 2:1. Hierbei wurde das NaCl zu einer Hälfte intraperitoneal und zur anderen Hälfte subkutan gespritzt, um akute Auswirkungen der Blutentnahme zu verhindern und einen längerfristigen Volumenausgleich zu erzielen.

Um eine moderate subakute Anämie zu erreichen, wurde ein Hb-Zielwert von <9 g/dl angestrebt. Die anämische Gruppe unterzog sich an drei aufeinanderfolgenden Tagen unter Kurznarkose (Isofluran) einem wiederholten Blutverlust ($150\mu\text{L}$ Blutverlust täglich), und die Kontroll-Gruppe unterzog sich ebenfalls drei Tage lang einer Kurznarkose ohne Blutverlust. Die Mäuse wurden zu Studienbeginn und am 3. Tag gewogen. Hierbei zeigten sich keine Veränderungen des Körpergewichts.

Für die chronische Anämie wurde darüber hinaus ein Protokoll erstellt, das bei subakuter Anämie auf sechs Wochen mit wiederholter Blutentnahme (um $150\mu\text{L}$) alle drei Tage erweitert wurde, um den Zielwert von 9 g/dl Hämoglobin aufrechtzuerhalten. Die Mäuse wurden vor jeder Blutentnahme gewogen. Die Kontroll-Kohorten wurden ebenfalls sechs Wochen lang, alle drei Tage einer kurzen Isofluran-Narkose ohne Blutverlust ausgesetzt und gewogen.

4.3 Blutentnahmen

Die Techniken zur Anämie-Induktion, einschließlich der Gesichtsvenenphlebotomie und der retrobulbären Sinuspunktion, sind in unserem Labor lange etabliert und wurden ausführlich bereits beschrieben [53]. Beide Techniken wurden nach den Richtlinien für die Blutentnahme bei Labortieren der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV Solas) angewendet. Blutproben von jeweils ca. $30\text{-}40\mu\text{L}$ wurden in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Eppendorf®-Röhrchen entnommen und spätestens 12 Stunden nach der

Entnahme mit einem scil Vet Vet ABC TMHaematology Analyzer nach den Anweisungen des Herstellers zur Quantifizierung von Blutbildparametern analysiert.

In einem finalen Versuch wurden durch eine finale Narkose mit Ketamin (100mg/kg BW) und Rompun (10mg/kg BW) intraperitoneal die Tiere getötet, um das Blut für den Versuch an der Langendorff-Apparatur als Blut-Donor zu gewinnen. Hierzu wurde durch eine intrakardiale Punktion 2 ml Vollblut gewonnen und zur weiteren Versuchsaufbereitung verwendet.

4.4 Analyse des Blutbildes

An den Tagen der Blutentnahme der Anämie-Induktion wurden Blutproben von jeweils ca. 30-40 µL in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Eppendorf®-Röhrchen gesammelt und spätestens 12h nach der Entnahme mit einem scil Vet Vet ABC TMHaematology Analysegerät analysiert. Insbesondere diente die Blutbildmessung, zur Kontrolle der Anzahl von RBCs, Thrombozyten, Blutplättchen, Hämoglobin-Wert, und Erythrozyten-Indizes. Dabei wurden die Herstelleranweisungen zur Quantifizierung von Blutbildparametern eingehalten und beachtet.

4.5 Probenaufbereitung des Vollblutes und der RBC-Suspension

Für die Versuche wurden sowohl murines Vollblut als auch Erythrozyten verwendet. Etwa 10 bis 15 Minuten vor Beginn des Versuchs wurde eine Herzpunktion bei einer unter endgültigen Narkose stehenden, mit 1000 IE Heparin antikoagulierten Maus durchgeführt. Die für die Punktion benötigten Feindosierungsspritzen mit integrierter Kanüle (0,01-1 ml) wurden zuvor mit Heparin benetzt. Die narkotisierte Maus wurde in Rückenlage fixiert, und die Kanüle wurde in der Medianlinie subxiphoidal unter leichter Aspiration eingeführt, um das Blut vorsichtig zu entnehmen. Auf diese Weise konnten pro Maus 0,7 bis 1 ml Blut für die weitere Probenbearbeitung gewonnen werden. Nach der Punktion wurde zusätzlich eine zervikale Dislokation durchgeführt, indem der Nacken der Maus mit einer Einmalspritze fixiert und gleichzeitig der Schwanz ruckartig nach caudal cranial gezogen wurde. Für die Bereitstellung von isolierten RBCs sind jeweils verschiedene Zentrifugationsschritte und Lagerungsmaßnahmen notwendig, die im Folgenden für die einzelnen Versuche im Detail beschrieben werden. [49]

Das murine Vollblut, welches durch eine Herzpunktion von einer final narkotisierten und heparinisierten Versuchsm Maus entnommen wurde, wurde bei 38°C für 30min in einem Thermomixer erwärmt. Nach den 30min wurde das Vollblut in eine Spritze (2ml) aufgezogen und anschließend in den Perfusor eingespannt. [49]

Um die entnommenen Blutproben vergleichbar zu halten, wurden sie nach der intrakardialen Blutentnahme entsprechend eines etablierten Protokolls aufbereitet, bevor sie im Langendorff-Versuch zum präischämischen Blut-Loading verwendet wurden. Die im Kapitel 4.4 genannten Kohorten spendete jeweils zu einer Hälfte eine Vollblutprobe und zu anderen Hälfte eine isolierte Suspension aus Erythrozyten (RBC-Suspension). [49]

Zur Herstellung der murinen RBC-Suspension wurde das Vollblut bei 4°C für 10 Minuten mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 830g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden die Blutbestandteile je nach Gewicht in drei Kompartimente unterteilt. Dabei bildeten die Erythrozyten die untere Schicht und wurden durch den Buffy-Coat, eine dünne Schicht bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, vom darüberliegenden Plasma getrennt. Um die Erythrozyten zu isolieren, wurde das Plasma und der Buffy-Coat vorsichtig abpipettiert. Anschließend wurden den Erythrozyten KHB hinzugefügt und das Reaktionsgefäß invertiert, bis eine homogene Verfärbung eintrat. Daraufhin wurde nochmals unter denselben Bedingungen zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und ein weiterer Waschvorgang mit KHB durchgeführt. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden die Erythrozyten abpipettiert und in ein mit Krebs-Henseleit-Buffer (KHB) vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt. Um einen Hämatokrit von 40% zu erreichen, wurden 60% KHB mit 40% Erythrozyten langsam gemischt und für 30 Minuten bei 38°C erwärmt. Anschließend konnte die RBC-Suspension dem Versuch zugeführt werden. [49]

4.6 Probenaufbereitung der RBC-Suspension und Zugabe eines NO-Donors

Um zu überprüfen, ob die linksventrikuläre Funktion der mit RBC-Suspension geladenen Herzen tatsächlich durch einen verminderten NO-Pool hervorgerufen wurde, gaben wir in einem zusätzlichen Recovery Versuch einen Stickstoffmonoxid-Donor hinzu. Diese Zugabe des Stickstoffmonoxid- Donors NONOate diente zur Überprüfung der globalen NO-Verfügbarkeit bei genetisch modifizierten eNOS-Mäuse und bestätigte durch seine Reversibilität das genetische Modell. Dazu wurden Material und Methoden veröffentlicht durch Fens et al. [54] und von uns an den jeweiligen Versuch entsprechend adaptiert.

Für die Versuchstestung der NO- Verfügbarkeit wurden RBC-Suspension mit Zugabe von Diethylamin (DEA) NONOate (Cayman Chemical, Ann Harbour, MI, USA), einem NO-Donor mit kurzer Halbwertszeit, hergestellt. Die gewählte Dosis von 20µmol wurde entsprechend einem zuvor publizierten Langendorff-Experiment entnommen, welche entsprechende der jeweiligen Dosis-Wirkungskurve die oben genannte Effektivdosis ermittelt haben. [32] Hierzu wurde auf das separierte RBC-Pellet ein Krebs-Henseleit-Puffer mit 20µmol DEA NONOate gegeben. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend des Protokolls aus Kapitel 4.6, welche aus einer Inkubation von 25 Minuten bei 37° Celsius bestand, um eine adäquate NO-Freigabe zu fördern. [54] Anschließend erfolgte die Ladung in das kalibrierte Langendorff-Wiltp Herz.

4.7 Langendorff – Modell und Modifikation

Das Langendorff-Modell der globalen Ischämie/Reperfusion (I/R) wurde zu unseren Versuchszwecken modifiziert. [31] Anämische und Sham-Mäuse dienten als Spender für Blutproben, die zu Beginn einer 40-minütigen globalen Ischämie in ein isoliertes WT-Herz als Empfänger übertragen wurden. Für eine Gesamtdauer von 40 min wurde eine globale Ischämie erzeugt und die vorher in das Herz geladenen Vollblut oder RBC-Suspensionen nicht ausgewaschen. Danach wurden die Herzen zwei Stunden einer Reperfusion unterzogen. Diese Experimente dienten als Bioassay zur Charakterisierung der RBC-Dysfunktion und deren Auswirkung auf die LV-Funktion und den Koronarfluss nach I/R Schaden.

Die Empfängerherzen wurden von Mäusen entnommen, die durch i.p.-Injektion von 100 mg/kg Ketamin (Ketanest®) und 10 mg/kg Xylazin (Rompun®) betäubt und mit Heparin antikoaguliert wurden (1.000 IU i.p.). Die Herzen wurden rasch exzidiert und zur Vorbereitung des Aortenstammes in kalten, mit Sauerstoff angereicherten Krebs-Henseleit-Puffer zur Präparation des Herzens überführt. Dafür wurde ein Zeitfenster von maximal 6 Minuten angesetzt. Die Aorta wurde kanüliert, die Herzen im nicht zirkulierenden Modus des Langendorff-Apparates bei konstantem Druck (7 kPa, d.h. 70 cm H₂O) mit modifiziertem, warmen Krebs-Henseleit-Puffer (in mmol/L: NaCl 118, KCl 4,7, MgSO₄ 0,8, NaHCO₃ 25,0, CaCl₂ 2,5, KH₂PO₄ 1,2, Glucose 5 und Pyruvat 1,9) perfundiert und äquilibriert mit 95% O₂ und 5% CO₂ (pH 7,4, 37°C).

Bis ein konstanter Koronarfluss erreicht war, wurden die entnommenen Herzen 20 Minuten lang stabilisiert. Der Koronarfluss wurde mit einem Laufzeit-Ultraschall-Durchflussmesser

oberhalb der Aortenkanüle gemessen (Transonics, Ithaca, NY, USA). Linksventrikulärer Druck (LVP), Perfusionsdruck, Aortenfluss und Herzfrequenz wurden kontinuierlich mit einem Analog-Digital-Wandler (2.000 Hz) und spezieller Software (EMKA-Technologies, Paris, Frankreich) überwacht. Ein an einem Druckwandler angeschlossener Ballon wurde durch den linken Vorhof in die linke Herzkammer eingeführt, um den linksventrikulären diastolischen Druck (left ventricular diastolic pressure/ LVDP), seine maximale und minimale Anstiegsrate des linksventrikulären Drucks ($dP/dt_{\max}$ und $dP/dt_{\min}$) und den linksventrikulären end-diastolischen Druck (LVEDP) aufzuzeichnen. Der Ballon wurde so angepasst, dass sich ein LVDP-Basislinienwert von 5 mmHg ergab. Die Herzen wurden während des gesamten Experiments mit einem Herzschrittmacher mit einer Frequenz von 600 bpm stimuliert.

Zu Beginn der globalen Ischämie wurden 400 μ L Blut, das von anämischen (mittlerer Hb $7,60 \pm 5,0$ g/lL) bzw. Sham-Mäusen (mittlerer Hb $14 \pm 3,0$ g/dl) gewonnen wurde, über einen Seitenarm des Perfusors in das Koronarperfusionssystem geladen. Zur Kontrolle wurden die Herzen nur mit Krebs-Henseleit Puffer behandelt. Die Herzen wurden 120 Minuten lang reperfundiert. Nach 60-minütiger Reperfusion wurden Koronarfluss, LVDP, $dP/dt_{\max}$ und $dP/dt_{\min}$ aufgezeichnet und die Erholung nach 60-minütiger Reperfusion wurde als prozentualer Anteil der jeweiligen präischämischen Ausgangsparameter nach Lösen der Klemme berechnet.

Die Ausschlusskriterien werden in der unten gezeigten Tabelle aufgelistet und basieren auf den von Bell et al. aufgezeigten Kriterien. [52]

Tabelle 5: Ausschlusskriterien Langendorff-Model

Parameter	Ausschlusskriterium
Zeit bis Perfusion nach Entnahme (min)	> 5
Koronarfluss (ml/min)	< 2 oder > 5,5
Arrythmie (min)	> 3
Frequenz (Schläge pro min)	< 320 oder > 620
LVDP (mmHg)	> 60 oder > 140

4.8 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte aus den Blut-Donor-Tieren aller Kohorten. Den Tieren wurde das Herz, die Lunge, die Leber, die Milz so wie die Aorta unmittelbar nach Eintritt des Todes durch die intrakardiale Blutentnahme chirurgisch entnommen. Alle entnommenen Organe wurden gewogen und in Eppendorf-Tubes bei -80°C gelagert.

4.9 Planimetrische Messung der Infarktgröße

Die Ermittlung der Infarktgröße der im Langendorff-Versuch verwendeten, isolierten Herzen erfolgte durch Planimetrie der Organe, gemäß Standard-Protokoll des Labors.

Nach Beendigung des Langendorff-Versuches, wurde das Herz der Apparatur entnommen und bei -80°C gelagert. Nach mindestens sechs Stunden bei dieser Temperatur wurde das Herz mit einer gekühlten Pinzette fixiert und von der Herzspitze aufwärts mit einer Klinge je nach Größe des Herzens in sechs bis sieben 1mm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden einzeln gewogen und in ein braunes lichtgeschütztes, mit TTC-Lösung gefülltes Eppendorf-Tube, gegeben, so dass der Organschnitt vollständig bedeckt war.

Die TTC-Lösung wurde vor Präparation des Herzens ebenfalls nach Standard-Protokoll des Labors hergestellt. Das Protokoll hierzu beinhaltete 14,2 g Na_2HPO_4 auf einen Liter Millipore zu gegeben und war vor dem Versuch zuzubereiten. Die Schnitte wurden fünf Minuten in der Lösung gefärbt und anschließend auf einem Deckglas aufgelegt und unter einem Mikroskop mit Kamerafunktion abgelichtet.

Die Infarktgröße wurde planimetrisch mithilfe der Bildverarbeitungssoftware Diskus view (Diskus Software, Hilgers Technisches Büro, Königswinter, Deutschland) ermittelt. Hierbei wurden die zuvor in TTC bei einer Temperatur von 38°C inkubierten Herzscheiben auf einen Objektträger platziert und mit einem Deckglas abgedeckt. Anschließend wurden von jedem Schnitt digitale Bilder in voller Auflösung mit einer Echtzeitkamera (Hitachi HV-C20AMP) aufgenommen. Die markierten Abschnitte des Herzens wurden in eine vorformatierte Tabelle eingetragen.

Dabei wurde zunächst die Gesamtfläche des Herzens sowie der rechte Ventrikel einheitlich eingefärbt. Die Infarktbereiche stellten die farblosen Flächen am Herzen dar und wurden dementsprechend farblich markiert und berechnet. Die markierten Flächen wurden in Quadratmillimetern (mm^2) angegeben. Um den prozentualen Anteil des Infarkts am

gewichteten linken und rechten Ventrikel zu berechnen, wurden die Flächen des rechten Ventrikels (RV) und linken Ventrikels (LV), die Gesamtfläche, die Infarktflächen im RV und LV sowie die Gewichte der einzelnen Herzscheiben ermittelt.

4.10 Analyse der eNOS-Expression mittels Westernblot-Analyse/ELISA

Die Westernblot-Analyse von eNOS im murinen Herz wurde entsprechend einem bereits etablierten Protokoll [55] durchgeführt. Die Organe wurden in Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffer (1% NP40, 0,5% Natriumdeoxycholat und 0,1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pH 7,4) lysiert, der einen Mix aus Protease- und Phosphataseinhibitoren enthält (Pierce, New Haven, USA). Dazu wurden die Proben bei 4°C mit dem Tissue Ruptor (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert, für drei Minuten bei 4°C ins Ultraschallbad gegeben und für 10 Minuten bei 4.000 g bei 4°C zentrifugiert.

Vor dem Beladen der Gele wurde die Gesamtproteinkonzentration des Überstandes mittels Lowry-Assay bestimmt. Die berechnete Proteinmenge der Proben wurde dann in 7% NuPAGE Tris-Acetat-Fertiggele (Invitrogen, Waltham, USA) geladen und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran Hybond P (Amersham Biosciences, München, Deutschland) übertragen. Die Membranen wurden für zwei Stunden mit 5% Bovine Serum Albumin (BSA) (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) in T- Tris Buffered Saline (TBS) (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1% Tween) bei Raumtemperatur geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C mit einem Maus-anti-eNOS (1:500, Sonderanfertigung von Nummer 624086 anti-eNOS/NOS Typ III-Antikörper, Bestand: 1 mg/mL in PBS pH 7. 4, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien) oder polyklonalem Kaninchen-Anti-Actin (1:1000, Produktnummer A2066 Sigma) oder monoklonalem Maus-Anti-GAPDH (1:5000, Sigma Aldrich, St Louis MO, USA) Antikörper in T- TBS Puffer inkubiert. Die Membranen wurden dann für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichter Rotation hin und her bewegt, bevor sie für eine weitere Stunde in T-TBS gewaschen wurden.

Der letzte Schritt vor der Detektion der Banden beinhaltet die Inkubation der Membranen mit Horseradish Peroxidase (HRP) konjugierten Ziegen-Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:5000; BD Biosciences). Die Detektion erfolgte mit Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Nummer RPN2235, GE Healthcare) und Image Quant (GE Healthcare). Die Densitometrie wurde mit der Software Image Studio

Lite (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA) durchgeführt. Die Detektion und Quantifizierung der Banden wurde innerhalb des linearen Bereichs der jeweiligen Analysemethode verglichen.

4.11 Angewandte statistische Verfahren

Wenn nicht anders angegeben, werden die Ergebnisse als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Mehrfache Vergleiche wurden mittels 2-Way-ANOVA, gefolgt von Sidaks Post-Hoc-Tests, durchgeführt. Für den Vergleich von Serum-/Plasmaparametern, Blutdruck und kardialen Funktionsparametern zwischen drei und mehr Gruppen wurde eine one-way-ANOVA (mit Bonferroni-Korrektur für den Vergleich mehrerer Mittelwerte) oder gegebenenfalls ein gleichwertiger nichtparametrischer Test (Dunn/ Kruskal-Wallis-Mehrfachvergleich) verwendet. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der gepaarte oder ungepaarte Student's t-Test verwendet. Shapiro-Wilk- und Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden für den Normalitätstest eingesetzt, bevor die Varianzanalyse oder der Student's t-Test verwendet wurde. Kategoriale Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert und als Häufigkeiten und Prozentsätze angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit GraphPad Prism Version 6.05 getestet. (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, US). Es wurden nur Gruppen mit ähnlichen Varianzen statistisch verglichen. Ausreißer wurden durch die Analyse von Box & Whiskers Plots nach Tukey identifiziert. Die Normalverteilung wurde mit dem D'Agostino-Pearson-Test getestet. P-Werte wurden als statistisch signifikant angesehen und sind entweder in den Abbildungen oder Tabellen angegeben.

5. Auswertung

5.1 Auswertung der Anämieparameter und weiterer Befunde

5.1.1 Hämoglobingehalt während der akuten und chronischen Anämie

Bei der Induktion der subakuten Anämie wurde der Hämoglobin-Gehalt in dem täglich abgenommenen Blut bestimmt, um den Erfolg der Blutentnahmen zu überprüfen.

In Abbildung 1 wird an einer Kohorte von 28 Mäusen der tägliche Verlauf des Hämoglobin-Gehaltes während der Induktion der subakuten Anämie dargestellt. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Abfall des Hämoglobin Wertes von durchschnittlich 15 g/dl auf 9 g/dl innerhalb von 3 Tagen.

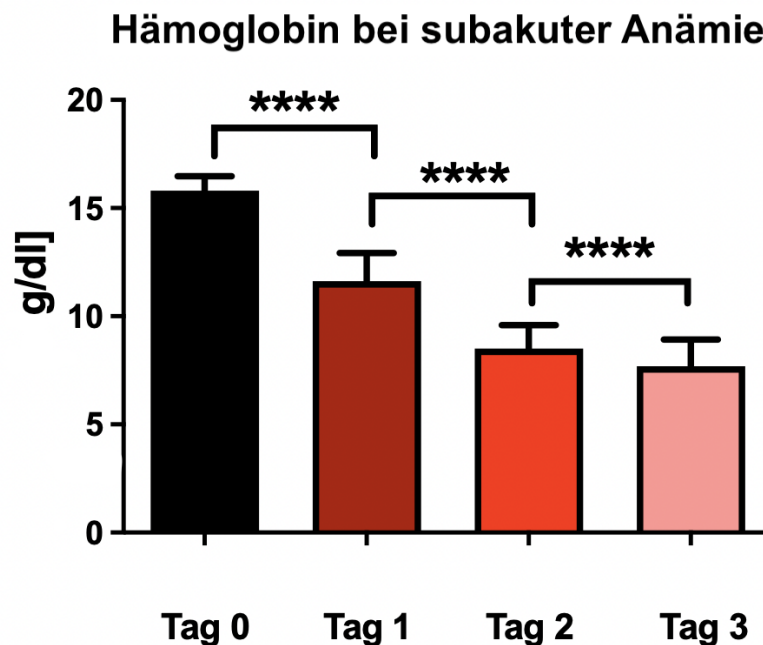


Abbildung 2: Die Induktion der subakuten Anämie zeigt täglich einen signifikanten Abfall des Hb-Wertes. Hämoglobin-Gehalt in g/dl einer Kohorte von 28 WT-Mäusen bei einer täglichen Blutentnahme retrobulbär von ca. insgesamt 150µl über einen Zeitraum von 3 Tagen zur Anämie-Induktion. Daten dargestellt als Mittelwert + SD, **** p-Wert <0.0001.

Ebenfalls wird in der Abbildung 2 der Hämoglobingehalt von 15 WT-Mäusen, welcher einer chronischen Anämie zugeführt wurden, dargestellt. Die Abbildung zeigt den Hämoglobingehalt des Ausgangswert am Tag 0 im Vergleich zu Tag 42, welcher den Tag der letzten Blutentnahme widerspiegelte. Hier zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Hämoglobinabfall von 15 g/dl auf ca. 10 g/dl und verifiziert somit den Erfolg der Anämie-Induktion.

Hämoglobin bei chronischer Anämie

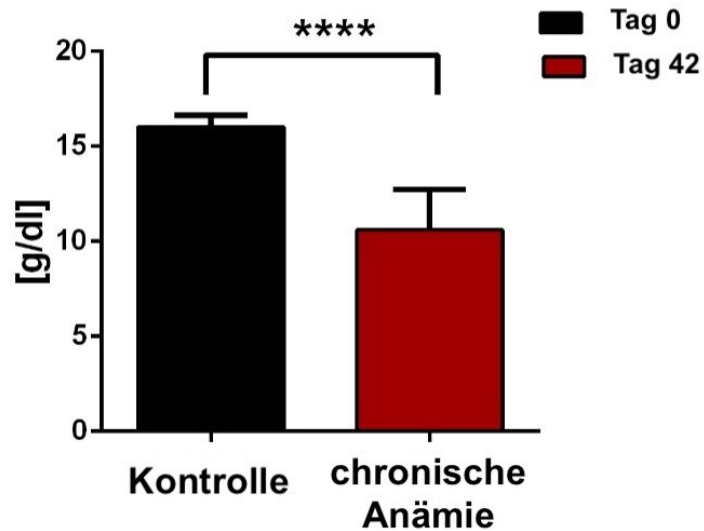
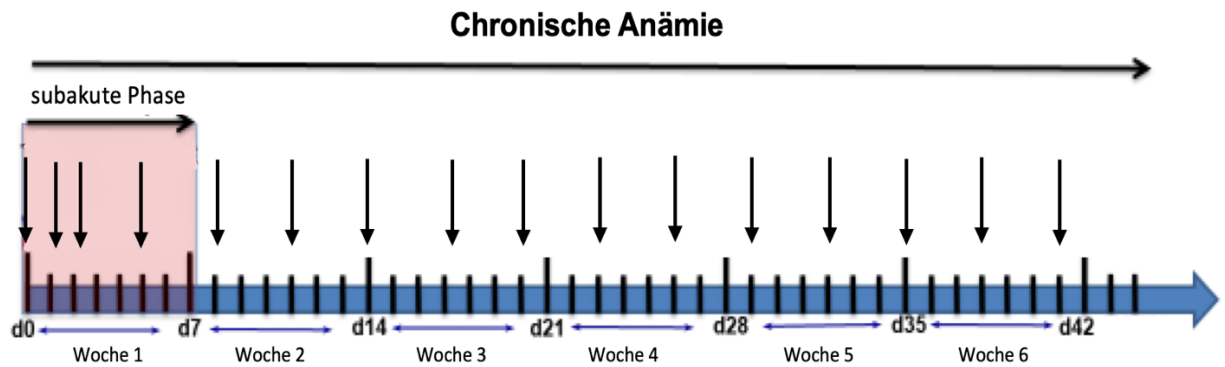


Abbildung 3: Der Hb-Wert sinkt über 42 Tage signifikant ab. Hämoglobingehalt in g/dl einer Kohorte von 15-WT Mäusen vor Start der Anämieinduktion, so wie am 42. Tag der chronischen Anämie bei retrobulbärer Blutentnahme nach Protokoll. Daten stellen den Mittelwert+ SD dar, P-Wert ****= <0.0001 .

In der Abbildung 3 wird der Verlauf und die Schwankungen des Hämoglobinwertes während der Induktion der chronischen Anämie über einen Zeitraum von 42 Tagen dargestellt. Es handelt sich hierbei um dieselben Tiere wie in Abb. 2. Die Blutentnahmen erfolgten nach beschriebenem Protokoll und sind gekennzeichnet durch die schwarzen Punkte der individuellen Linien der Mäuse. Hierbei zeigen sich immer wieder Anstiege des Hämoglobingehaltes über den gesamten Zeitraum. In Rot gekennzeichnet ist eine verstorbene Maus der Kohorte während des Versuchsvorhabens. Alle weiteren Mäuse werden in schwarz dargestellt und konnten dem finalen Versuch zugeführt werden.

A.



B.

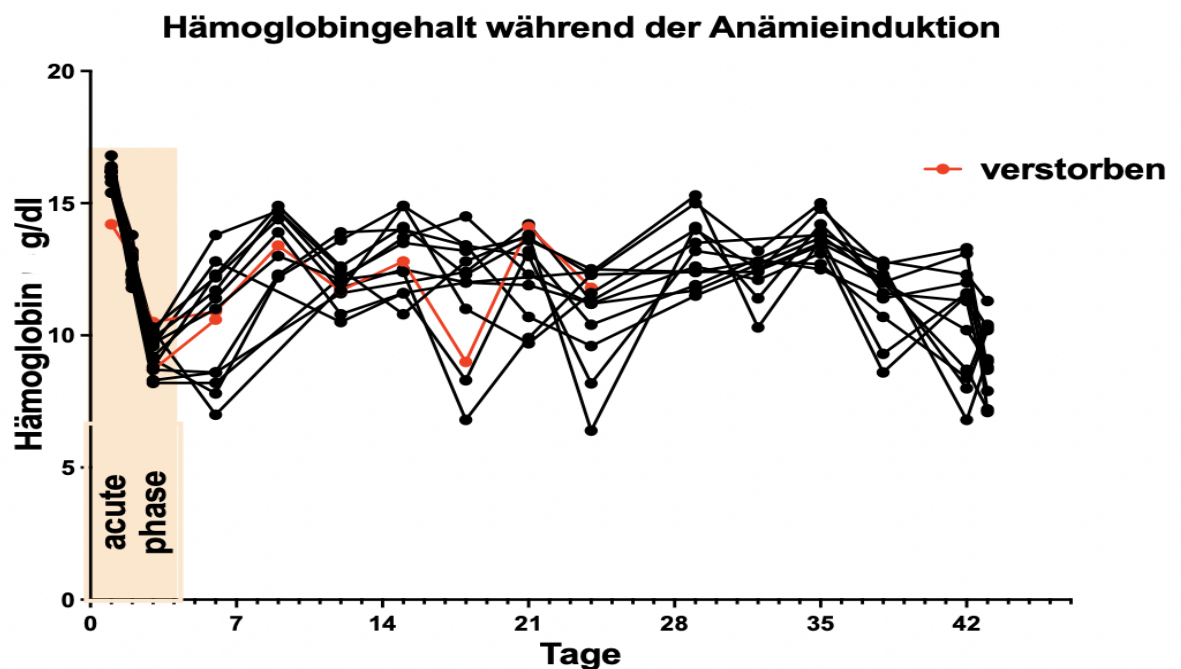


Abbildung 4: A. Verlauf der chronischen Anämieinduktion mit subakuter Phase in den ersten drei Tagen. Die Blutentnahmen sind mit Pfeilen an den jeweiligen Tagen markiert. Zeitstrahl über den gesamten Zeitraum der Anämieinduktion Tag (d) 1-42. B. Hämoglobingehalt in g/dl in den Blutentnahmen der Induktion und Aufrechterhaltung der chronischen Anämie einer Kohorte von 15- WT Mäusen durch retrobulbäre Blutentnahmen nach Protokoll.

Ebenfalls wurde der Hämoglobinwert der hergestellten RBC-Suspensionen für das Langendorff-Modell überprüft. Diese sind in Abbildung 4 dargestellt. Jeder Balken zeigt eine exemplarische Kohorte aus deren Blut nach beschriebenem Protokoll eine RBC-Suspension hergestellt wurde. Hierbei zeigt sich, dass der mittlere Hämoglobingehalt der unbehandelten Wildtyp-Mäuse (grau) bei 15,6 g/dl liegt. Der Hämoglobingehalt, der zur Herstellung der RBC-Suspension aus dem Blut der eNOS^{-/-} Mäuse (blau) gewonnenen

wurde, liegt im Durchschnitt bei 17,3 g/dl. Dies stellt im Vergleich zu WT-Mäusen einen signifikant höheren Ausgangswert des Hämoglobins im Langendorff-Versuch da. Die subakuten (hellrot) anämischen RBC- Suspensionen sind mit einem Hämoglobingehalt von unter 8 g/dl einer akuten Anämie zu zuordnen. Wohingegen die chronischen (dunkelrot) anämischen RBC-Suspensionen eine moderate Anämie aufweisen, welche durch einen einem Hämoglobingehalt von unter 10 g/dl charakterisiert ist. Aufgrund der unterschiedlichen Anämie-Induktionsform zeigte die Kohorte der subakuten Anämie einen signifikant niedrigeren Hämoglobingehalt (< 9 g/dl) auf als die der chronischen Anämie.

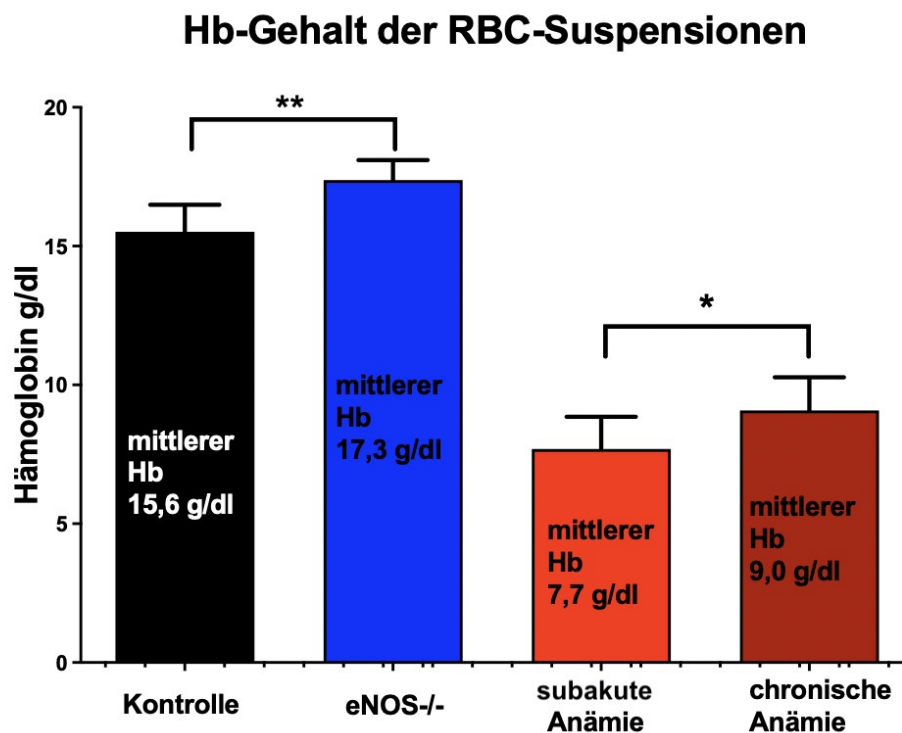


Abbildung 3: Mittlerer Hämoglobingehalt der RBC-Suspensionen der exemplarischer Kontrollen, subakuter Anämie und chronischer Anämie Kohorte von Wildtyp Mäusen und eNOS ^{-/-}. Hämoglobinwerte entsprechen in der Sham (Kontroll) Gruppe dem Ausgangswert und die Hämoglobinwerte der Anämie-Kohorte dem Ausgangswert des Blut- Donors am Langendorff Versuchstag; Daten stellen den Mittelwert+ SD dar, P-Wert ****= <0.0001 .

5.2 Auswertung der Langendorff-Versuche

Die Darstellung der Langendorff-Versuche ist unterteilt in die subakute und chronische Anämie. Die Ergebnisse der eNOS^{-/-} Gruppen werden in der Abbildung der subakuten Anämie mit abgebildet. Die linksventrikulären Funktionsparameter wie Koronarfluss, linksventrikulärer diastolischer Druck (LVDP) und maximaler und minimaler Druckgradient über dem linken Ventrikel (dP/dt_{max} , dP/dt_{min}) werden jeweils für die

Verwendung von Vollblut und RBC-Suspension der genannten Gruppen gegenübergestellt.

5.2.1. Ergebnisse der subakuten Anämie und eNOS^{-/-}

In der Arbeit von Yang et al. konnte gezeigt werden, dass die Beladung mit murinem Vollblut und Erythrozyten über den Seitenarm der LD-Apparatur kurz vor der Induktion der globalen Ischämie möglich ist. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit die Effekte von murinem Vollblut und muriner RBC-Suspension nach Induktion einer subakuten und chronischen Anämie auf den I/R-Schaden an murinen WT-Mausherzen untersucht. Um die Wirkung von Blutkomponenten auf das murine Herz im I/R-Modell zu demonstrieren, wurden die linksventrikulären hämodynamischen Funktionsparameter LVDP, dP/dt_{max}, dP/dt_{min} und die koronare Flussrate gemessen. Die Infarktgröße wurde prozentual aus dem Volumen des rechten und linken Ventrikels berechnet (% LV+RV).

Die hämodynamischen Parameter LVDP, dP/dt_{max}, dP/dt_{min} sowie die koronare Flussrate wurden nach einer 60-minütigen Recoveryphase ermittelt und entsprechen den prozentualen Anteil der präischämischen Baseline-Werten. Die Ermittlung der Infarktgröße erfolgte nach einer 120-minütigen Reperfusionsphase.

Die Ergebnisse der Langendorff-Versuche mit präischämischer Ladung von Vollblut oder RBC-Suspension aus Mäusen mit subakuter Anämie (rot), eNOS^{-/-} - Kontrolle (blau) ohne eine Anämie, sowie deren Kontrollgruppe (grau) sind in Abbildung 5 dargestellt. In der Abbildung 5 werden Vollblut - Ladung (links) und Ladung mit RBC-Suspension (rechts) mit den jeweiligen vier hämodynamischen linksventrikulären Outcome - Parametern (Koronarfluss, LVDP, dP/dt_{max}, dP/dt_{min}), welche 60 Minuten nach induzierter Ischämie gemessen wurden, dargestellt. Die Werte der jeweiligen linksventrikulären Funktionsparameter sind angegeben als prozentuale Erholung gemessen am präischämischen Baselinewert.

Nach Ladung mit Vollblut von Mäusen mit subakuter Anämie (n=10) und (nicht-anämischen eNOS^{-/-} (n=8) zeigten sich keine Veränderung des Koronarflusses im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe (n=11).

Nach Reperfusion der WT- Mausherzen mit Vollblut zeigt sich in der subakuten Anämie-Gruppe eine signifikante Verschlechterung der linksventrikulären Kontraktilität im

Vergleich zur Kontrollgruppe (LVDP: Subakute Anämie $30 \text{ mmHg} \pm 9 \text{ mmHg}$ versus WT-Kontrolle $45 \text{ mmHg} \pm 13 \text{ mmHg}$, $p < 0.001$). Diese Verschlechterung der linksventrikulären Funktion spiegelt sich ebenfalls in einer signifikanten Reduktion des maximalen linksventrikulären Druckgradienten (Subakute Anämie $30 \text{ mmHg} \pm 14 \text{ mmHg}$ versus WT-Kontrolle $50 \text{ mmHg} \pm 19 \text{ mmHg}$, $p < 0.001$) wider.

Identisch mit der subakuten Anämie waren die Vollblutproben von nicht-anämischen $\text{eNOS}^{-/-}$ Mäusen ebenfalls durch eine verschlechterte LV-Funktion nach Ischämie/Reperfusion gekennzeichnet. Somit konnten wir in den erhobenen linksventrikulären Funktionsparameter, dem LVDP ($\text{eNOS}^{-/-}$ $29 \text{ mmHg} \pm 19 \text{ mmHg}$ vs. WT Kontrolle $50 \text{ mmHg} \pm 19 \text{ mmHg}$, $p < 0.001$) $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ ($\text{eNOS}^{-/-}$ $39 \text{ mmHg} \pm 23 \text{ mmHg}$ vs. WT Kontrolle $50 \text{ mmHg} \pm 19 \text{ mmHg}$, $p < 0.001$) und $\text{dP/dt}_{\text{min}}$ ($\text{eNOS}^{-/-}$ $30 \text{ mmHg} \pm 16 \text{ mmHg}$ vs. WT Kontrolle $50 \text{ mmHg} \pm 19 \text{ mmHg}$, $p < 0.001$) einen identischen Verlust der linksventrikulären Kontraktilitätsperformance, wie in der subakuten Anämie aufweisen.

Um die isolierte Funktion der roten Blutzellen auf die linksventrikuläre Funktion nach Ischämie/Reperfusionsschaden zu analysieren, wurden im nächsten Schritt des Versuchs nur die Suspension aus roten Blutzellen von Mäusen mit subakuter Anämie ($n=7$), nicht-anämischer $\text{eNOS}^{-/-}$ ($n=6$) und deren WT-Kontrollgruppe ($n=7$) verwendet. In allen Versuchsgruppen zeigte sich der Koronarfluss nach Zugabe von isolierten roten Blutzellen konstant. In dem oben genannten zellspezifischen Ansatz verbesserten isolierte und re-suspendierte Erythrozyten von scheinbaren WT-Mäusen (Kontrollgruppe) die Erholung der LV-Funktion während der Reperfusion. Demgegenüber verhinderten Erythrozyten von anämischen Mäusen die Kardioprotektion, indem die Kontraktilität nach I/R Schaden stark vermindert war. Im Detail war die Erholung des LVDP, sowohl bei Ladung mit RBC-Suspension aus subakut anämischen Mäusen als auch aus nicht-anämischen $\text{eNOS}^{-/-}$ mit einem Mittelwert von $20 \text{ mmHg} \pm 6 \text{ mmHg}$, signifikant schlechter als in der WT-Kontrollgruppe (LVDP: $30 \text{ mmHg} \pm 9 \text{ mmHg}$, $p < 0.05$). Zusätzlich zeigten sich weitere Kontraktilitätsparameter wie der maximale ($\text{dP/dt}_{\text{max}}$) und minimale ($\text{dP/dt}_{\text{min}}$) linksventrikuläre Druckgradient in der subakuten Anämie und nicht-anämischen $\text{eNOS}^{-/-}$ nahezu kongruent, welches durch eine signifikante Verschlechterung der Erholung in beiden Gruppen charakterisiert war. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten somit beide Versuchsgruppen einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) der linksventrikulären Leistungskapazität nach Ischämie/Reperfusionsschaden abbilden.

subakute Anämie

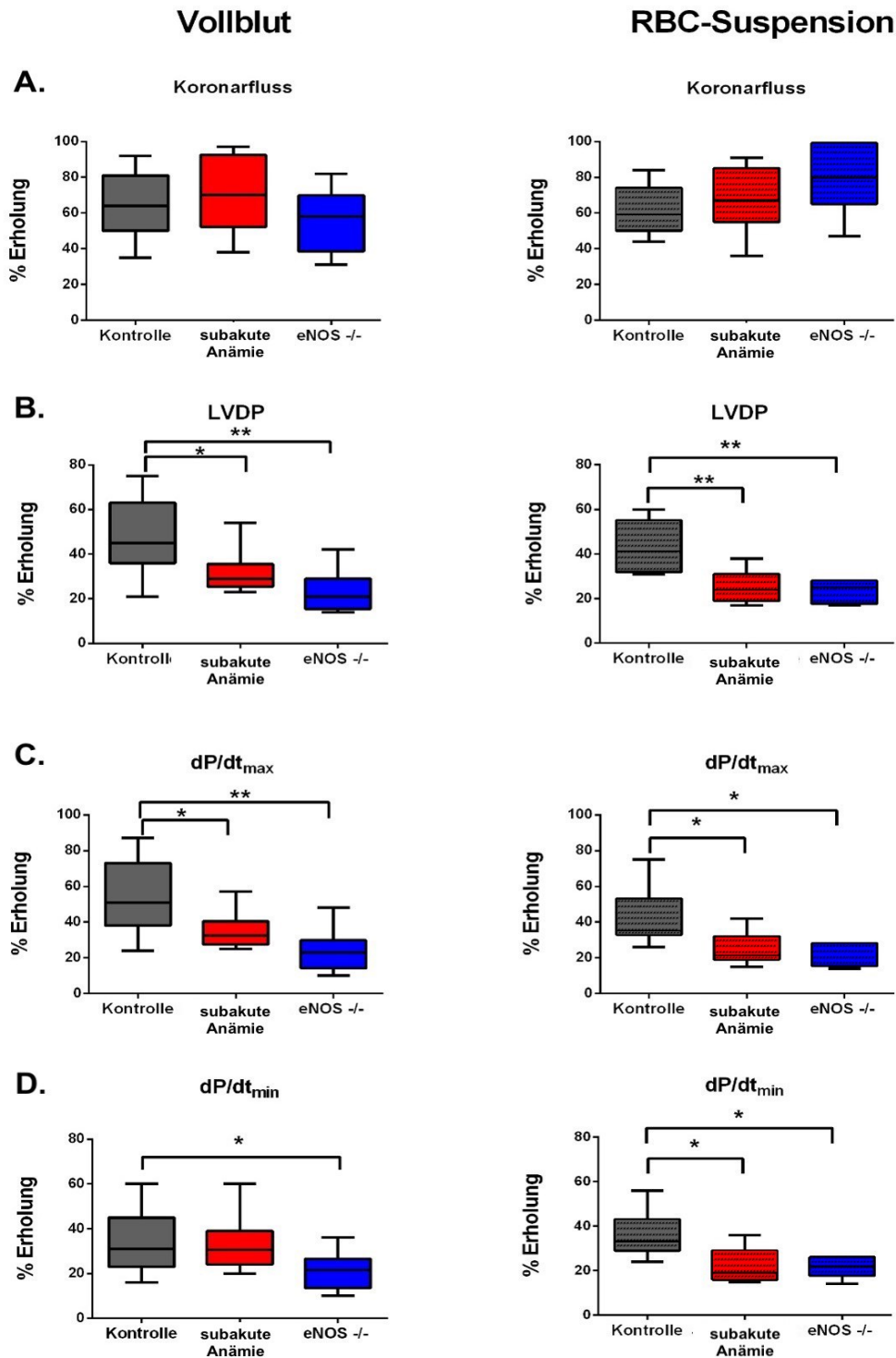


Abbildung 5: Subakute Anämie und eNOS $-/-$ zeigen eine insgesamt signifikant schlechtere Erholung der linksventrikulären Kontraktilität nach Ischämie/Reperfusion. Dargestellt sind Vollblut (I) vs. RBC-Versuche (II), mit den Mittelwerten $\pm$ SD der jeweiligen Kohorten, unterteilt in Kontrolle (grau, $n=7$), subakute Anämie (rot, $n=10$), eNOS $-/-$ (blau, $n=6$). Die Parameter Koronarfluss (A), LVDP (B), dP/dt_{max} (C) und dP/dt_{min} sind dargestellt in prozentualer Erholung 60 Minuten nach 40-minütiger globaler Myokardischämie. Blutproben von anämischen WT-Mäusen und nicht anämischen eNOS $-/-$ Mäusen verschlechterten den LVDP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} im Vergleich zur Kontrollkohorte. LVDP = linksventrikulärer diastolische Druckgradient; dP/dt_{max} = maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit; dP/dt_{min} = minimale Druckerhöhungsgeschwindigkeit, P-Wert * <0.05 , ** <0.01 .

5.2.2 Ergebnisse der chronischen Anämie

Die Ergebnisse der Langendorff-Versuche mit präischämischer Ladung mit Vollblut oder RBC-Suspension aus Mäusen mit chronischer Anämie (dunkelrot), sowie deren WT Kontrollgruppe (grau) sind dargestellt in Abbildung 6. Die Abbildung ist unterteilt in Vollblut-Ladung links und Ladung mit RBC-Suspension rechts mit jeweils vier Graphen. Dargestellt sind die linksventrikulären Funktionsparameter Koronarfluss, linksventrikulärer diastolischer Druck (LVDP), maximaler und minimaler Druckgradient über dem linken Ventrikel (dp/dt_{max} , dp/dt_{min}), die 40 Minuten nach Ischämie und 120 Minuten Reperfusion aufgezeichnet wurden. Diese sind angegeben in prozentualer Erholung gemessen am präischämischen Ausgangswert.

In den chronisch anämischen Vollblut-Versuchen konnte eine signifikant schlechtere linksventrikuläre Leistung aller vier gemessenen Funktionsparametern im Vergleich zur chronischen WT Kontrollgruppe dargestellt werden. Dieser negative Effekt von chronisch anämischem Vollblut zeigte seine größte Auswirkung im Koronarfluss, welcher im Vergleich zur WT Kontrollgruppe deutlich geringer war (WT Kontrolle: $71\% \pm 16\%$ versus chronische Anämie $50\% \pm 13\%$; $p < 0.01$).

Wurde das Herz präischämisch mit einer Suspension aus roten Blutzellen der chronischen Versuchstiere geladen, zeigte sich wie in der Kontrollgruppe kein negativer Einfluss der roten Blutzellen auf die linksventrikuläre Kontraktilität nach Reperfusion.

chronische Anämie

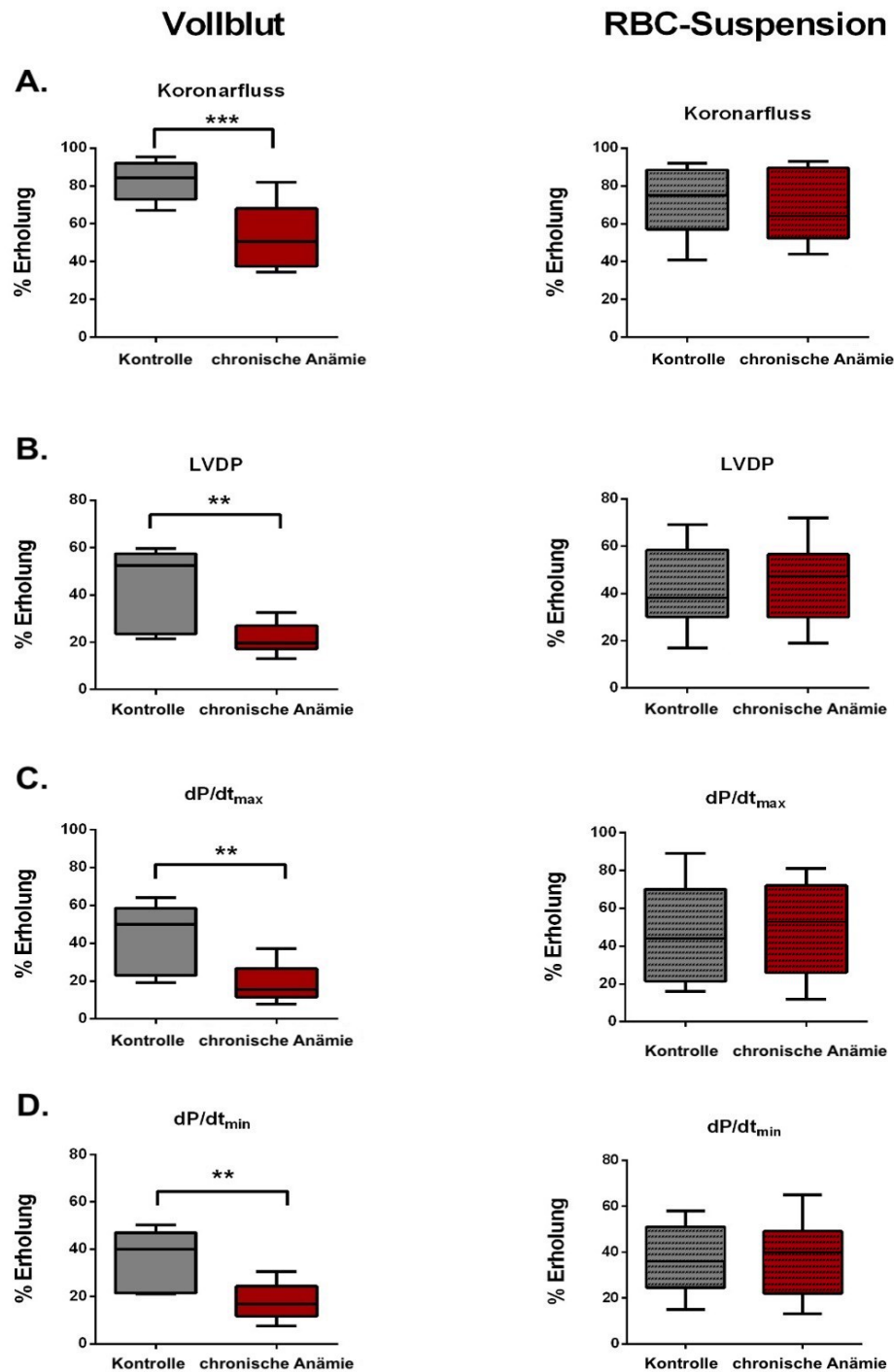


Abbildung 6: Vollblut-Kohorten der chronischen Anämie zeigt eine Verschlechterung der linksventrikulären Funktion nach Ischämie/Reperfusion im Vergleich zu den chronisch anämischen RBC-Kohorten. Dargestellt sind Vollblut (I) vs. RBC-Versuche (II), mit den Mittelwerten $\pm$ SD der jeweiligen Kohorten, unterteilt in Kontrolle (grau, RBC n=7, Vollblut n=8), chronische Anämie (dunkelrot, RBC n=8, Vollblut n=8). Die linksventrikulären Funktionsparameter Koronarfluss (A), LVDP (B), dP/dt_{max} (C) und dP/dt_{min} sind in prozentualer Erholung 60 Minuten nach globaler Myokardischämie dargestellt. Blutproben von chronisch anämischen WT-Mäusen zeigen einen verschlechterten den LVDP = linksventrikulärer Druckgradient; dP/dt_{max} = maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit; dp/dt_{min} = minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit, dp/dt_{min} zur Kontroll-Kohorte. Der zellspezifische Ansatz mit isolierten RBC aus chronisch-anämischen WT-Mäusen zeigte keinen Einfluss auf die linksventrikuläre Leistungsfunktion im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

5.2.3 Reversibilitätsprüfung der NO-Bioverfügbarkeit anhand des NO-Donors (DEA NONOate)

Wie bereits in Abb. 5 präsentiert wurde, zeigte die Versuchsreihe der nicht- anämischen eNOS^{-/-} Blutproben eine deutlich schlechtere Erholung der linksventrikulären Funktion nach Ischämie/Reperfusionsschaden im Vergleich zur entsprechende WT-Kontrollgruppe. Somit stellten wir die Hypothese auf, dass die Einschränkung der linksventrikulären Kontraktilität durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit der RBC durch die Anämie hervorgerufen wurde. Es erfolgte der Versuchsaufbau zur Reversibilitätstestung der RBC (Dys)-Funktion nach Präinkubation mit einem NO-Donor (DEA NONOate).

In Abbildung 7 sind Reversibilitätsversuche an WT - RBC und eNOS^{-/-} RBC dargestellt mit den entsprechenden vier postischämischen linksventrikulären Funktionsparametern. Die Gruppen sind unterteilt in WT Kontroll-Gruppen bestehend aus Gabe einer WT-RBC-Suspension mit und ohne Zugabe von DEA NONOate, sowie eNOS^{-/-} Gruppen ebenfalls mit (blau-gestreift, n=5) und ohne (blau, n=5) Zugabe des NO-Donors. Die erhobenen linksventrikulären Funktionsparameter entsprechen der Erholung in %, welche entsprechend aus dem zuvor gemessenen präischämischen Baseline Ausgangswerts berechnet wurden.

Es zeigen sich zwischen den Kontroll-Gruppen WT-RBC und WT-RBC nach zusätzlicher Gabe des NO-Donor keine zusätzliche Verbesserung der RBC-vermittelten Kardioprotektion. Bei Betrachtung der Gruppen eNOS^{-/-} RBC ohne Zusatz von DEA NONOate und eNOS^{-/-} RBC mit Zusatz von DEA NONOate sieht man eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Kontraktilität in der Gruppe, welchen den NO-Donor erhalten hat. Auffallend ist, dass bei den Parametern Koronarfluss und dp/dt_{max} im Vergleich zu der WT-RBC-Suspension mit NONOate, die eNOS^{-/-} -RBC-Suspension mit NONOate eine signifikant bessere Erholung der beschriebenen Parameter zeigen konnte als die Kontrollgruppe.

20 μ Mol DEA NONOate

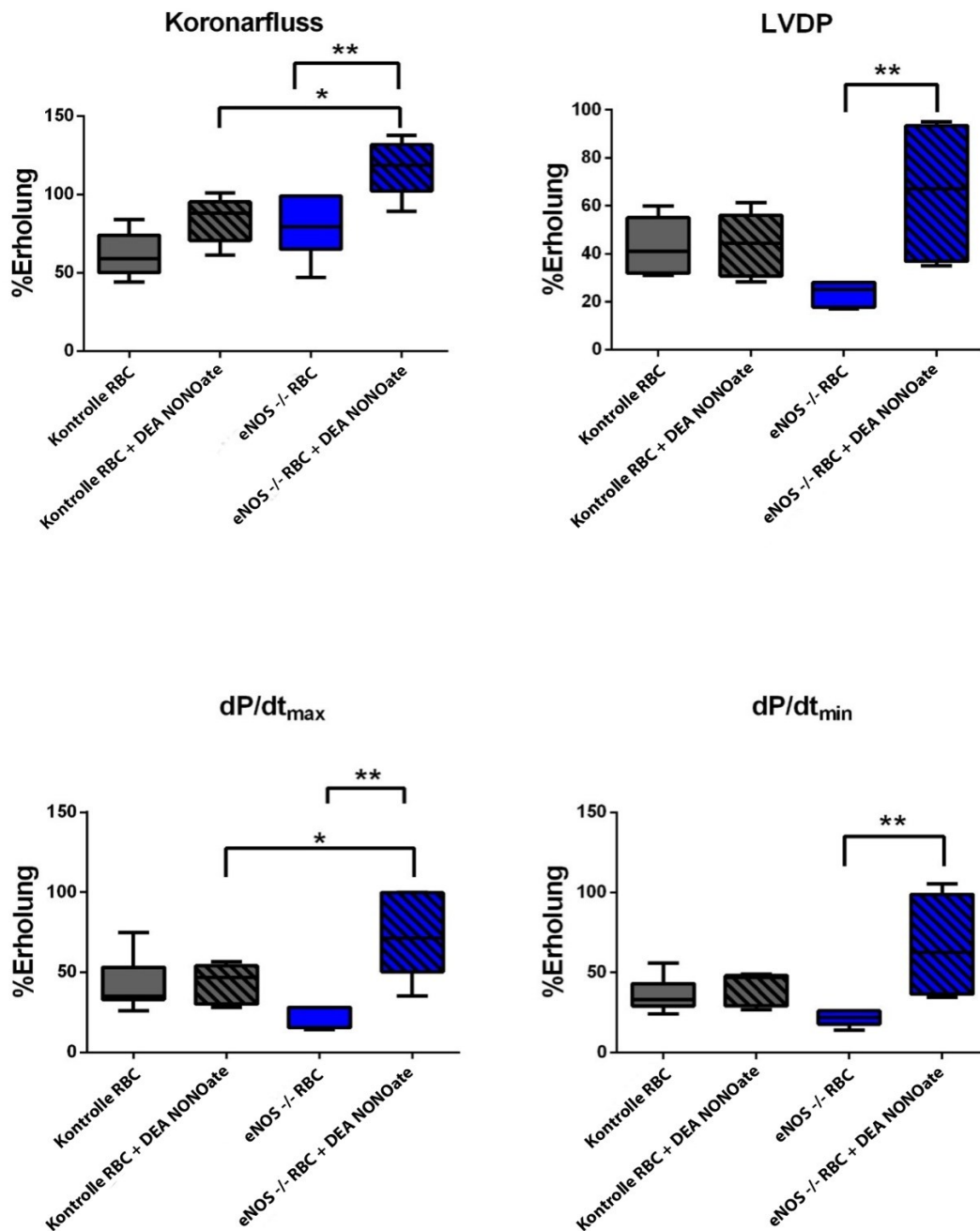


Abbildung 7: NO-Substitution in roten Blutkörperchen zeigt kardioprotektive Effekte auf die linksventrikuläre Funktion nach Ischämie/Reperfusionsschaden. Ergebnisse der Langendorff-Versuche bei präischämischer Ladung mit RBC-Suspension aus WT-Mäusen (grau, n=6) oder eNOS -/- (blau, n=6), jeweils einmal mit (n=6) und ohne (n=6) Substitution von 20 μ Mol DEA NONOate, gemessen in der prozentualen Erholung der 60 Minuten postischämisch gemessenen Parameter (Koronarfluss, LVDP = linksventrikulärer Druckgradient, dP/dt_{max} = maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} = minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit) vom präischämischen Ausgangswert. Daten gezeigt als Mittelwert und Standardabweichung. * = p < 0.05; ** = p < 0.01

5.3 Auswertung der Planimetrie der Langendorff-Herzen

Die Bestimmung der Infarktgröße, der im Langendorff-Versuch verwendeten Herzen erfolgte wie bereits erläutert durch eine TTC-Färbung und eine sich anschließende planimetrische Auswertung der Infarktgröße.

Ogleich eine globale Ischämie gesetzt wurde, wurde bei der Auswertung der Infarktgröße der prozentuale Anteil des ischämischen Gewebes vom linken Ventrikel ermittelt. Die Ergebnisse wurden erneut gegliedert in subakute und chronische Anämie. Dazu wurden als Untergruppen die Vollblut- Experimente und RBC-Suspension miteinander verglichen.

5.3.1 Ergebnisse der akuten Anämie-Kohorten

Die Infarktgrößen der subakut anämischen Kohorten, sowie deren Kontrollgruppen wird in Abb. 8 dargestellt. In der gleichen Abbildung sind die Infarktgrößen der mit nicht-anämischen eNOS^{-/-} Vollblut und RBC-Suspension Gruppen beladenen Herzen beschrieben.

Die Infarktgröße wird angegeben als prozentualer Anteil des linken Ventrikels. Die subakute Anämie wird dargestellt in zwei Graphen: links unter der Verwendung von Vollblut bei der präischämischen Ladung und rechts unter der Verwendung von RBC-Suspensionen.

Die dargestellten Kohorten in beiden Graphen sind jeweils eine Kontrollgruppe (grau, Vollblut n = 9; RBC n = 6), eine Gruppe mit präischämischen Blutloading mit subakut anämischen Blutproben (rot; Vollblut n = 10; RBC, n = 7). Ebenfalls wird die eNOS^{-/-} Gruppe mit dem entsprechenden Vollblut (blau, n = 9) und der RBC-Kohorte (blau, n = 8,) abgebildet.

Betrachtet man die Infarktgrößen zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen fällt lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der eNOS^{-/-} Vollblut-Gruppe und der Kontrollgruppe auf. Bei Verwendung von eNOS^{-/-} Vollblut sind die angegebenen Infarkte als Anteil des gefährdeten Areals (Area at Risk) signifikant größer (bis zu 55% des linken Ventrikels) im Vergleich zur Kontrollgruppe (bis zu 15% des linken Ventrikels). Im Vergleich der anderen Gruppen zeigen sich keine weiteren signifikanten Relevanzen. Die Infarktgröße als Anteil der Area at Risk bei Verwendung von RBC-Suspension liegt bei allen drei Untergruppen in einem Bereich von 5% - 45%.

akute Anämie

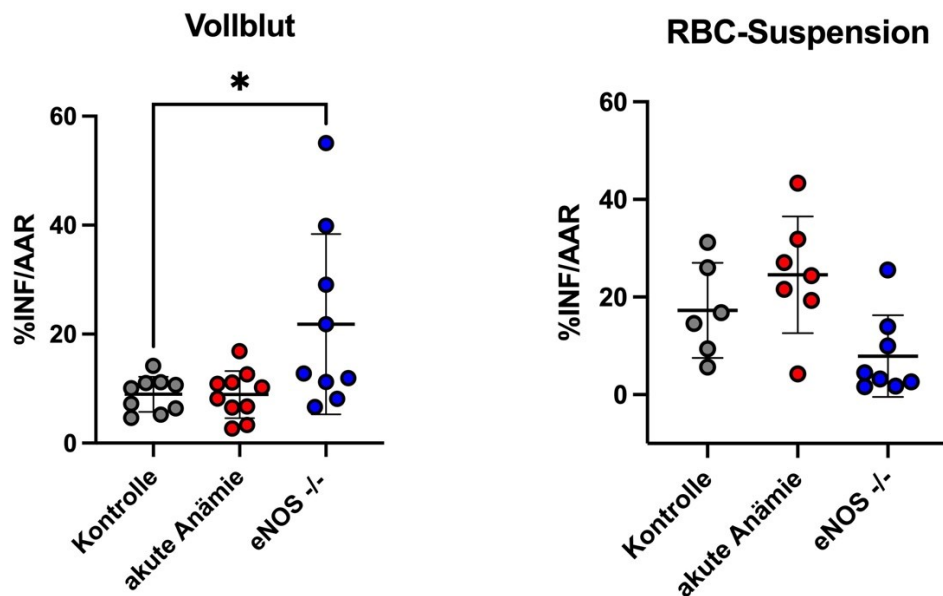


Abbildung 8: RBC von WT-Mäusen mit subakuter Anämie haben keinen Einfluss auf die Infarktgröße nach I/R Schaden. Ischämie/Reperfusion-Schaden wurde bei eNOS KO-Mäusen (blau, Vollblut $n=9$, RBC $n=8$), subakuter WT-Mäusen (rot, Vollblut $n=10$, RBC $n=7$) sowie der entsprechenden Kontrollgruppe (grau, Vollblut $n=9$, RBC $n=6$) ausgelöst. Das Versuchsprotokoll bestand aus einer 40-minütigen Ischämie und einer 120-minütigen Reperfusion. $*p < 0,05$.

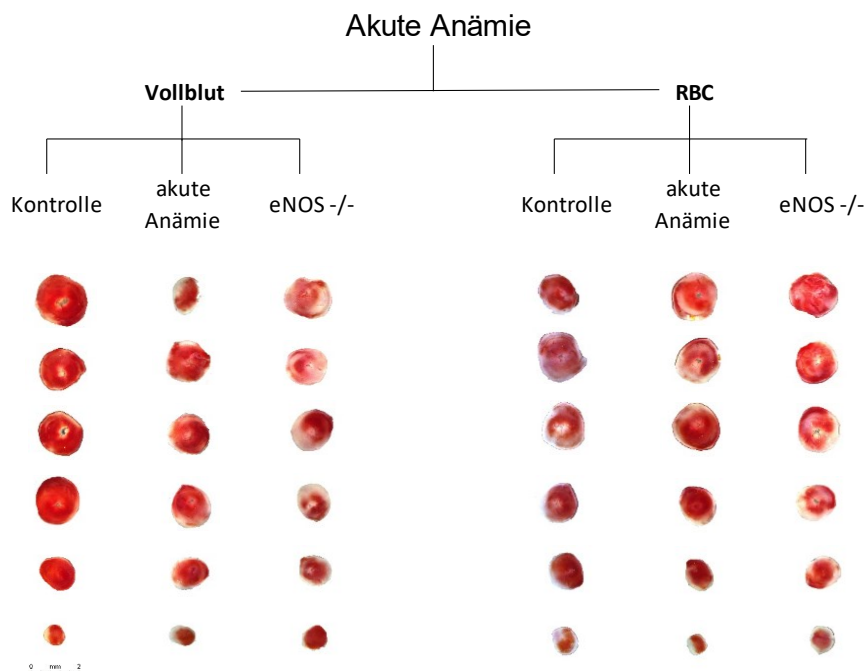


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der TTC-Schnitte eines jeweiligen exemplarischen Herzens nach Färbung mit TTC-Lösung. Die Herzschnitte sind von WT-Mäusen nach entsprechender Perfusion des Herzens mit Vollblut und RBC in den jeweiligen Versuchsgruppen von subakuter Anämie, sham WT-Maus sowie eNOS^{-/-}. Weiß dargestellt ist das ischämische Areal, rot kennzeichnet das vitale Areal des Anschnittes, gekennzeichnet durch die Anlagerung der TTC-Färbung.

5.3.2 Ergebnisse der chronischen Anämie-Kohorten

Die Infarktgrößen der chronischen anämischen Kohorten, sowie deren Kontrollgruppen wird in Abb. 10 dargestellt.

Die Infarktgröße wird angegeben als prozentualer Anteil des Infarkt gefährdeten Areal (Area at Risk) des linken Ventrikels. Die chronische Anämie wird in zwei Gruppen aufgeteilt und dementsprechend in zwei Graphen dargestellt: links unter der Verwendung von Vollblut bei der präischämischen Ladung und rechts unter der Verwendung von RBC-Suspensionen.

Die dargestellten Kohorten in beiden Graphen sind jeweils eine Kontrollgruppe (grau, n = 6) oder Kontroll RBC-Suspension (grau gepunktet, n = 6), sowie eine Gruppe mit präischämischen Blutladen mit chronisch anämischem Vollblut (rot, n = 10) oder RBC-Suspension (rot gepunktet, n=6).

Bei der Verwendung von Vollblut zur präischämischen Beladung des WT-Herzens zeigt sich im Vergleich zwischen Kontroll- und Anämiegruppe kein signifikanter Unterschied. Ebenso zeigen sich unter Verwendung von RBC-Suspension keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der chronischen Anämie-Gruppe. Auch hier liegen die prozentualen Infarktareale des linken Ventrikels in einem Intervall von 5% - 25%.

chronische Anämie

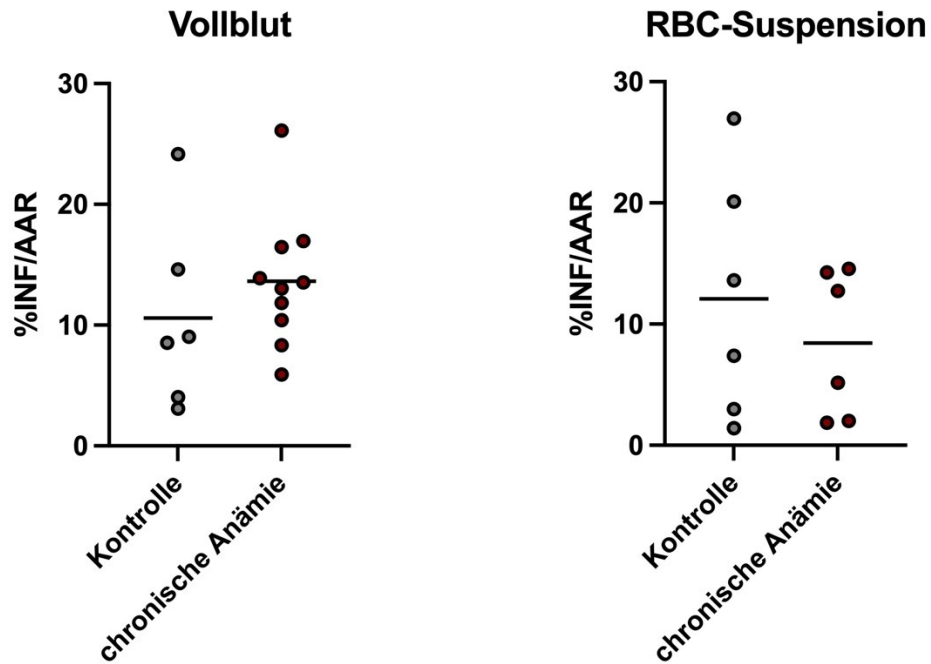


Abbildung 10: RBC von WT-Mäusen mit chronischer Anämie haben keinen Einfluss auf die Infarktgröße nach I/R Schaden. I/Schaden wurde in chronisch anämischen Mäusen (dunkelrot, Vollblut n=10, RBC n=6) sowie der entsprechenden Kontrollgruppe (grau, Vollblut n=6), (dunkelrot, RBC n=6) ausgelöst. Das Versuchsprotokoll bestand aus einer 40-minütigen Ischämie und einer 120-minütigen Reperfusion.

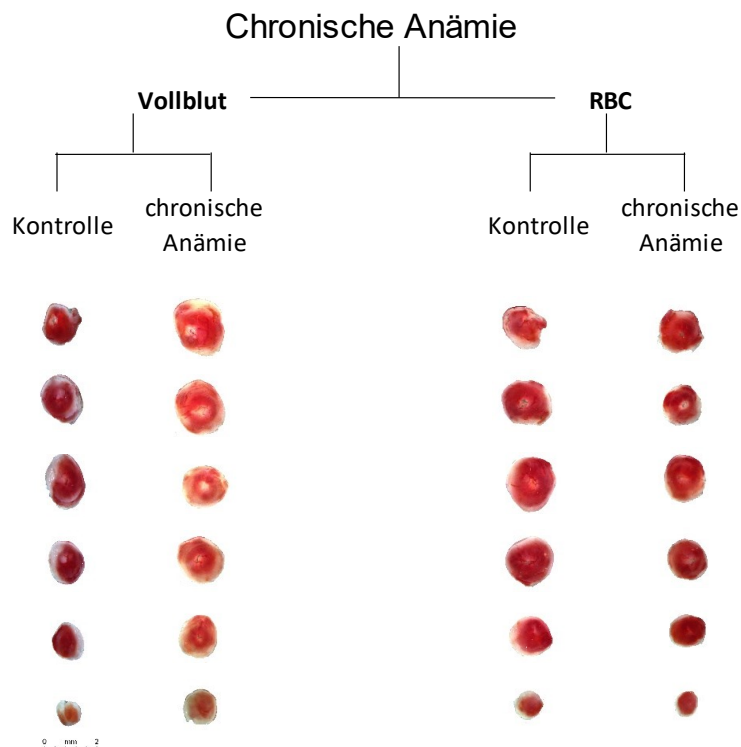


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der TTC-Schnitte mit jeweils einem exemplarischen Herz nach Färbung mit TTC-Lösung sowie Präparation der Herzschnitte von WT-Mäusen nach Reperfusion mit Vollblut und RBC der Versuchsgruppe mit chronischer Anämie und Sham-WT Maus.

5.4 Auswertung des Westernblots

Während der subakuten Anämie kommt es zu einer kardio-zirkulatorischen Adaptation, welche zur Aufrechterhaltung der linksventrikulären Funktion unabdingbar ist. Eines der wichtigsten Schlüsselenzyme in der Kardioprotektion von Patienten mit einer Koronaren Herzerkrankung ist die eNOS, welche sowohl im Endothel als auch in roten Blutzellen exprimiert wird. Ziel meiner Arbeit war es den Einfluss der eNOS auf die kardio-zirkulatorische Adaptation während der Anämie zu untersuchen.

Somit wurde zunächst das ganze Herz homogenisiert und die entsprechende Menge an Protein zur Messung der eNOS-Expression mittels Westernblot Methode bestimmt. Hierbei wurde das Signalmolekül eNOS im Herzen der Kontrollgruppe und der zu vergleichenden subakuten Anämie Gruppe unter Verwendung des Antikörpers detektiert. Der Anteil der eNOS-Expression war insgesamt als positiv zu bewerten (Abbildung 12). Der gemittelte Expression- Anteil lag innerhalb der Kontrollgruppe bei $100\% \pm 35\%$; bei der subakuten Anämie Gruppe bei $125\% \pm 64\%$ und bei den eNOS^{-/-} bei $0\% \pm 0\%$. Bei der Analyse der eNOS-Expression zeigte sich in den globalen eNOS KO-Mäusen (blau) eine fehlende kardiale eNOS-Expression, welches den Phänotypen des genetischen Mausstamms nochmals bestätigte. Zusätzlich zeigte sich nach Induktion der subakuten Anämie eine Erhöhung der eNOS-Expression im Herzen von anämischen WT- Mäusen (rot) im Vergleich zur Sham-WT Maus (grau).

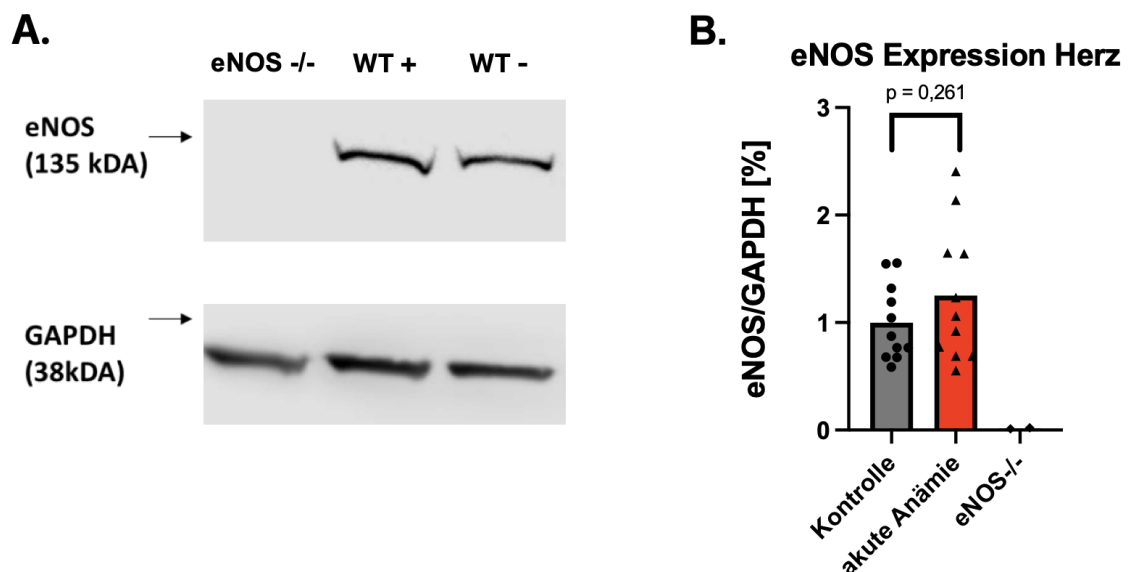


Abbildung 12: (A) Repräsentativer Westernblot der eNOS-Expression im murinen Herz, standardisiert auf GAPDH. (B) Densitometrische Analyse der eNOS-Expression im Herzen von Kontrollmäusen und subakut anämischen Mäusen mit dem Housekeeping-Gen GAPDH. Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD von n=11 Mäusen/Gruppe.

6. Diskussion

6.1. Das Anämie-Modell

Das Hauptziel dieser Studie ist die Charakterisierung eines ex vivo Transfer-Modells mithilfe einer Langendorff (LD)-Apparatur, um spezifisch den Effekt einer subakuten und chronischen Anämie auf die linksventrikuläre Kontraktilität nach einem kardialen Ischämie-Reperfusionsschaden zu analysieren.

Als Grundlage für diese Untersuchung dienen zahlreiche klinische Studien, die eine erhöhte Sterblichkeit bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) belegen, wenn zusätzlich zur Indexaufnahme eine Anämie vorliegt. In vorangegangenen experimentellen Arbeiten haben Yang et al. [31] einen Bioassay entwickelt, der es ermöglicht, durch eine zellspezifische Methode murine rote Blutkörperchen (RBCs) und Vollblut unmittelbar vor Beginn der globalen Ischämie in die LD-Apparatur einzubringen, um eine Interaktion zwischen RBCs und Kardiomyozyten herzustellen. Nach Beendigung der Ischämie erfolgt die weitere Perfusionsphase mit KHB. [31]

Die Entscheidung ein RBC-Bioassay für unseren Versuch zu verwenden, wurde insbesondere aufgrund der Tatsache getroffen, dass die Blutperfusion des murinen LD-Herzens kurz vor der Ischämie-Phase stattfindet, was den Bedarf an Blutproben pro Versuch minimiert. Zudem wird durch die kurze Inkubationszeit des Blutes vor der globalen Ischämie das Risiko einer Hämolyse der Blutproben reduziert. Dieser Ansatz ermöglicht eine präzise Untersuchung der Auswirkungen einer RBC-Dysfunktion in verschiedenen Anämieformen auf die Funktion des linken Ventrikels nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden.

Die Anämie ist eine häufige Komorbidität bei älteren Patienten mit koronarer Herzerkrankung, welche eine ungünstige Prognose nach AMI darstellt. Es gibt verschiedene genetisch, diätetisch oder pharmakologisch modifizierte Tiermodelle, die es ermöglichen, die molekularen Mechanismen der Funktionsstörung der roten Blutkörperchen, die zu Anämie führen, zu entschlüsseln. [2] Da hierbei unerwünschte Nebenwirkungen durch die Verabreichung von pharmakologischen Substanzen oder Futterergänzungsmitteln nicht auszuschließen sind, haben wir in der vorliegenden Arbeit ein Anämie-Modell ausgewählt, welches durch eine tägliche Phlebotomie zu einer subakuten Anämie führt. Durch die regelmäßigen Aderlässe konnte eine moderate Blutarmut erzielt werden, welches dem laborchemischen Bild einer chronischen Anämie von akuten Koronarsyndrom Patienten ähnelte. [56] Bei den wiederholten Blutverlusten

wurde den Versuchstieren nur $< 15\%$ des zirkulierenden Blutvolumens pro Tag entnommen. Gleichzeitig erfolgte ein Volumenausgleich mit isotoner Lösung, um einen Volumenmangelschock zu vermeiden. [44] Anzeichen von Blutungen oder signifikanten Volumenverschiebungen wurden ausgeschlossen, da die arterielle Laktatkonzentration und die Verteilung des Evans-Blau-Farbstoffs im Normalbereich lagen.

Nach Induktion der subakuten Anämie konnten wir einen erhöhten Umsatz und eine Funktionsstörung der Erythrozyten anhand einer Reihe von zellulären und plasmatischen Blutbestandteilen, welche für die Integrität und Funktion der Erythrozyten (erhöhtes RDW und freies Hämoglobin, erhöhter RBC-Umsatz charakteristisch sind, darstellen. Die, durch den moderaten täglichen Blutverlust induzierte Anämie der Versuchstiere war charakterisiert durch das Auftreten eines leichten Eisenmangels, einer Inflammation sowie einer Hämolyse. Alle zusammen stellen häufige charakteristische Laborbefunde während des stationären Aufenthaltes von anämischen Patienten dar. [44] Der Nachweis einer leichten Hämolyse konnte durch ein erhöhtes zellfreies Hämoglobin und ein verringertes Haptoglobin im Plasma erklärt werden.

Die Hämolyse im Blutkreislauf hat nachweislich tiefgreifende pathologische Auswirkungen, insbesondere auf das Herz-Kreislauf-System. Die Folgen der Hämolyse zeigen sich besonders deutlich bei der hämolytischen Anämie, bei der die Fragilität der Erythrozyten hauptsächlich auf eine Redox-Imbalance oder Hämoglobinopathien zurückzuführen ist, z. B. bei der Sichelzellerkrankung (SCD). Durch die Ruptur der Erythrozyten kommt es zur Freisetzung von intrazellulärem Inhalt, insbesondere von Hämoglobin und Arginase 1. Der Verlust der Hb-Kompartimentierung kann zu einem systemischen Abfangen des Signalstoffes NO führen und darüber die Endothelfunktion beeinträchtigen. Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass die Freisetzung von Arginase 1 aus den Erythrozyten zur Argininverarmung beiträgt, was zu einer verminderten Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) führt. [13, 44] Andere und wir haben gezeigt, dass erhöhte Plasmaspiegel von freiem Hb die Blutrheologie und die vaskuläre Vasodilatatorfunktion durch eine verringerte NO-Verfügbarkeit beeinflussen könnte. Darüber hinaus konnte eine Veränderung des Redox- Puffer- Systems von Erythrozyten zusammen mit einer verringerten Konzentration von NO-Häm eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit belegen.

Um das klinische Szenario einer chronischen Anämie in Verbindung mit einem akuten Myokardinfarkt zu imitieren, wurde das Anämie-Model der subakuten Anämie auf eine

chronische Anämie erweitert. Durch die repetitive Blutentnahme von WT-Mäusen für einen Zeitraum von sechs Wochen vor dem Infarkt, wurde experimentell das klinische Bild einer chronischen Anämie nachgeahmt.

Die Ergebnisse der Arbeit beziehen sich somit vor allem auf eine Eisenmangel-Anämie oder eine Anämie durch moderaten Blutverlust. Eine Übertragung der Erkenntnisse auf andere Unterformen der Anämie, welche beispielsweise durch einen Mangelernährungszustand oder eine Inflammation auftreten, ist somit unsicher und die Daten sind nicht problemlos auf derartige Szenarien übertragbar. Hervorzuheben ist, dass die im Versuch induzierte chronische Anämie im Vergleich zur subakuten Anämie durch eine im Zeitverlauf auftretende chronisch inflammatorische Komponente deutlich beeinflusst wird. Somit lassen sich die Ergebnisse der subakuten und chronischen Anämie nicht ohne Weiteres vergleichen, da es durch die Inflammation zu Kompensationsmechanismen kommt, welche bei der subakuten Anämie in diesem Ausmaß nicht auftreten. Im klinischen Szenario besteht bei Patienten mit einem akuten Herzinfarkt häufig eine chronische Anämie, welche durch eine konstante milde Inflammation charakterisiert ist.

Hämoglobin hat die Fähigkeit, NO abzufangen bzw. mit ihm zu reagieren. Diese Wechselwirkung zwischen Hämoglobin und NO spielt eine Rolle bei der Regulierung der NO-Konzentration im Körper. Wenn NO im Körper produziert wird, diffundiert es in das umgebende Gewebe und den Blutkreislauf. Im Blutkreislauf ist eines seiner potenziellen Ziele das Hämoglobin. Hämoglobin kann sich mit NO verbinden und einen Komplex bilden, der als Nitrosyl-Hämoglobin oder HbNO bekannt ist. Diese Bindung von NO an Hämoglobin verringert die Bioverfügbarkeit von NO und schränkt seine physiologischen Wirkungen ein. [57] Dies ist besonders wichtig in Situationen, in denen eine übermäßige NO-Produktion zu nachteiligen Auswirkungen führen könnte, wie z. B. bei Entzündungen oder oxidativem Stress.

Hämoglobin hat wie viele Proteine ein redoxaktives Eisenatom in seiner Häm-Gruppe. Durch diese Redoxaktivität kann Hämoglobin nicht nur mit Sauerstoff und NO interagieren, sondern auch mit anderen Molekülen, die Elektronen abgeben oder aufnehmen können reagieren. Eine weitere indirekte Beeinflussung entsteht durch ROS, welche beispielsweise mit NO reagieren können und dadurch reaktive Stickstoffspezies wie Peroxynitrit (ONOO-) erzeugen. Peroxynitrit kann mit verschiedenen Biomolekülen interagieren und potenziell zu oxidativen Schäden führen. [36, 57, 58] In diesem Szenario

kann das Zusammenspiel von ROS, reaktiven Stickstoffspezies und NO eine komplexe Auswirkung auf die zelluläre Funktion und Signalgebung des NOs haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fähigkeit des Hämoglobins, NO abzufangen, dazu beiträgt, die Konzentration und Aktivität von NO im Körper zu regulieren, was für die Aufrechterhaltung eines korrekten physiologischen Gleichgewichts wichtig ist. Die Beteiligung von ROS und Redoxreaktionen macht diese Interaktionen noch komplexer und beeinflusst die Gesamtwirkung von NO auf zelluläre Prozesse.

6.2. Kardio-protektiver Effekt von Erythrozyten

Die kardioprotektive Wirkung von Erythrozyten beim AMI bezieht sich auf die Rolle dieser Zellen bei der Verringerung der Schädigung des Herzmuskelgewebes während eines Herzinfarkts. Ein AMI tritt auf, wenn die Blutversorgung eines Teils des Herzmuskels durch ein verstopftes Herzkranzgefäß unterbrochen wird, was zu Sauerstoffmangel und Zelltod führt. Zu den kardioprotektiven Eigenschaften der RBCs gehört der Sauerstofftransport, der Transport und die Abgabe von NO, Beeinflussung der Blutviskosität und deren antioxidativen Aktivitäten. Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum, Adipositas und Diabetes mellitus zählt die Anämie zu einer wichtigen Komorbidität, welche die Morbidität und Mortalität bei Patienten mit akutem Herzinfarkt deutlich erhöht.

In der Literatur wird beschrieben, dass rote Blutzellen kardioprotektive Effekte haben können. Diese Effekte werden durch verschiedene Mechanismen vermittelt, darunter die Freisetzung von Substanzen wie Adenosin und ATP, die eine Schutzfunktion für das Herz haben. Zudem besitzen rote Blutzellen antioxidative Eigenschaften, die dazu beitragen, oxidativen Stress im Herzen zu reduzieren. Die Fähigkeit der roten Blutzellen, eigenständig Stickstoffmonoxid (NO) durch eine endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zu produzieren, ermöglicht es ihnen aktiv an der Regulation des systemischen Stickstoffmonoxid-Stoffwechsels teilzunehmen. NO ist ein wichtiger Botenstoff, der die Blutgefäße erweitert und somit die Durchblutung des Herzens verbessert. [39, 59] Dies kann dazu beitragen, ischämische Schäden am Herzmuskel zu reduzieren. Darüber hinaus enthalten Erythrozyten auch eine Reihe von Redox-Enzymen, die den zirkulierenden NO-Pool regulieren. Auf diese Weise tragen Erythrozyten zur Regulierung des arteriellen

Blutdrucks bei, beeinflussen die Perfusion in der Mikrozirkulation und erleichtern die hypoxische Vasodilatation zur Gewährleistung einer angemessenen Nährstoffversorgung von hypoxischem Gewebe. [39, 59] Diese Mechanismen haben kardioprotektive Wirkungen und beeinflussen sowohl die diastolische als auch systolische Funktion des linken Ventrikels (LV), was darauf hindeutet, dass sie auch das ischämische sowie das angrenzende Myokard bei einem akuten Myokardinfarkt (AMI) beeinflussen können.

Diese kardioprotektiven Effekte der RBCs ließen sich in den durchgeführten Versuchen ebenfalls verifizieren. In den Versuchen zeigten die nicht anämischen Gruppen mit Vollblut und RBC-Suspension keine signifikante Verschlechterung der linksventrikulären Herzfunktion nach AMI. In der subakuten Anämie mit Beladung von Vollblut und RBC-Suspension verschlechterte sich die linksventrikuläre Herzfunktion signifikant nach I/R Schaden. Da sich im Versuch mit isolierter RBC-Suspension von eNOS^{-/-} Mäusen vergleichbare Ergebnisse zeigten, ist von einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit von anämischen RBC auszugehen. Dies bestätigt unsere Hypothese, dass die Anämie eine Dysfunktion von RBC hervorruft, welche zu einem Verlust der Kardioprotektion nach I/R Schaden führt. Insbesondere spiegelt sich die RBC Dysfunktionalität in einer signifikant verminderten linksventrikulären Kontraktilität nach I/R Schaden wider.

Das parallele Verhalten der RBC eNOS^{-/-} Kohorten lässt den Rückschluss zu, dass in den RBCs eine Entkopplung der eNOS stattfindet, welche zu einem Funktionsverlust der beschriebenen Synthase führt. Der Verlust der eNOS-Funktion stellt in unseren Experimenten den Hauptbefund der erythrozytären Dysfunktion dar, welche die linksventrikuläre Herzfunktion nach akutem Herzinfarkt negativ beeinflusst. In den letzten Jahren konnten verschiedene Faktoren analysiert werden, welche einen Einfluss auf die Entkopplung der eNOS haben. Unter anderem wurde die Entkopplung der eNOS auf eine hohe Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies zurückgeführt, welche durch ihre direkte Bindung mit dem Stickstoffmonoxid diesen gleichzeitig inaktivieren lässt. [47, 60] Außerdem können ROS die bioaktive Form des Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH₄) oxidieren, der für die Enzymaktivität der eNOS erforderlich ist. Somit kann ein Mangel an BH₄ dazu führen, dass die eNOS statt NO vermehrt reaktive Sauerstoffradikale produziert. Die entstandenen NO-Radikale beeinflussen die Chemie von Zellen, verändern den Zellstoffwechsel und behindern die Zelle in ihrer Funktion. Dies wiederum führt zu zahlreichen Problemen, da die Zelle ihren spezifischen Aufgaben nicht mehr nachgehen kann und somit dysfunktional wird. Weitere Ursachen für die Entkopplung der eNOS

können Mangel an Kofaktoren (z.B. durch unzureichenden L-Arginin-Transport) oder entzündliche und chronische Krankheiten sein, welche den oxidativen Stress erhöhen und die Verfügbarkeit von BH₄ reduzieren. [47, 58, 61]

6.3 Rolle von eNOS auf die kardiale Funktion nach I/R Schaden

Die Hauptfunktion der eNOS ist wie erwähnt, die Produktion von NO, dass eine wichtige Rolle bei der Regulation der kardiovaskulären Funktion spielt. Hierdurch erfüllt die eNOS eine Reihe kardioregulatorischer Funktionen. Durch die NO-vermittelte Vasodilatation in den Koronargefäßen wird der Blutfluss zum Herzmuskel erhöht, was die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sicherstellt. Ebenso wird durch die vasodilatative Funktion der periphere Widerstand verringert und der Blutdruck reguliert. Zudem hat eNOS anti-atherogene Effekte, indem die Bildung arterieller Plaques verringert wird. Durch ihre Funktion als Thrombozytenaggregationshemmer über den NO/cGMP (Stickstoffmonoxid/zyklisches Guanosinmonophosphat) - Signalweg, wird ebenso das Risiko eines AMI verringert. [62, 63] Darüber hinaus kann NO antioxidative Eigenschaften besitzen, indem es reaktive Sauerstoffspezies neutralisiert und so oxidative Stressreaktionen reduziert. [30, 41]

Die verwendete eNOS^{-/-} Mauslinie verfügt über einen globalen Mangel an erythrozytärer und endothelialer eNOS, sodass eine Differenzierung zwischen den beiden NO-Synthasen nicht vollständig möglich ist. Zwar wird durch die Verwendung von isolierter RBC-Suspension die isolierte Wirkung der erythrozytären NOS untersucht, jedoch ist eine Wirkung der endothelialen NOS im Wildtyp-Spenderherz nicht auszuschließen. In der differenzierten Betrachtung der Blutkomponente, lässt sich zeigen, dass die Kohorten der eNOS^{-/-} -RBC-Suspension eine deutliche Verschlechterung der LV-Funktion nach I/R Schaden aufweist, als die eNOS^{-/-} - Vollblut Kohorte, welches eine isolierte Funktion der eNOS3 defizienten Erythrozyten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der eNOS-Aktivität aus zwei Zelltypen stammt: zum einen den Endothelzellen, aber auch den RBC, welche die Gewebeperfusion regulieren. [38] Experimentelle und klinische Studien haben gezeigt, dass die von Erythrozyten stammende endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) bei akutem Myokardinfarkt (AMI) eine kardioprotektive Wirkung entfalten kann. Wischmann et al. fanden heraus, dass Anämie die linksventrikuläre Funktion nach einem Herzinfarkt durch

die Modulation des NO-Stoffwechsels beeinflussen kann. [44] Darüber hinaus deuten Studien darauf hin, dass eNOS in Erythrozyten eine schützende Wirkung gegen Ischämie/Reperfusionsverletzungen sowohl ex vivo als auch in vivo ausübt [31, 39, 55, 64, 65]. Diese kardioprotektive Rolle der Erythrozyten scheint zumindest teilweise durch die Aktivierung der purinerger Signalübertragung über den P2Y₁₃-Rezeptor und den NO-löslichen Guanylylzyklaseweg in den Erythrozyten und die Proteinkinase G im Herzen vermittelt zu werden [66]. Erythrozyten aus eNOS-KO-Mäusen induzieren eine endotheliale Dysfunktion, wenn sie über Nacht mit Aortenringen inkubiert werden [67].

Cortese-Krott et al. zeigten, dass RBC eNOS und endotheliale eNOS unabhängige, sich jedoch ergänzende Funktionen bei der Regulation des vaskulären Tonus und der myokardialen Leistungsfähigkeit während des AMI haben. [39] Zudem konnte gezeigt werden, dass die durch die RBC exprimierte, eNOS einen kardioprotektiven Effekt durch Reduktion der Infarktgröße und somit einer Erhaltung der LV-Funktion nach AMI im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkt. [39] Dies zeigt sich vor allem durch eine bessere linksventrikuläre Funktion nach AMI und kleineren Infarkten in der Planimetrie. Jedoch zeigten andere Experimente, dass eine RBC-Dysfunktion wie sie vor allem bei Patienten mit kardiovaskulären Komorbiditäten wie z.B. Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie sowie chronischer Niereninsuffizienz vorkommt zu einer Störung in der Regulation des Redox-Gleichgewichtes und der eNOS-Aktivität kommt. So zeigten andere Untersuchungen, dass die kardioprotektive Wirkung der RBCs bei diversen Vorerkrankung oder während einer Anämie und einem kardiovaskulären Ereignis verloren geht. [44, 65, 68]. Zahlreiche ex- vivo Versuchsmodellen konnten zeigen, dass Erythrozyten von Mäusen und Menschen mit Typ-2-Diabetes die post-ischämische kardiale Erholung von WT-Herzen, die ex vivo einer I/R-Verletzung ausgesetzt waren, verschlechtern und ex vivo eine endotheliale Dysfunktion induzieren [65, 67, 68]. Ebenso konnte Wischmann et al. in einem ex vivo Transferexperiment zeigen, dass dysfunktionale rote Blutzellen von STEMI Patienten mit Anämie ihre kardioprotektiven Eigenschaften in isolierten Maus Herzen verlieren, die einer Ischämie/Reperfusion ausgesetzt sind. Ursächlich hierfür war eine Reduktion des zirkulierenden NO-Pools durch eine verminderte NO Bioverfügbarkeit. Diese Beeinträchtigung des zirkulierenden NO-Pools und die nichtkanonische, kardioprotektive Funktion der roten Blutzellen könnten zu den schädlichen Auswirkungen von Anämie bei AMI beitragen.

Während eines AMI kommt es zu einer Dysregulation der eNOS durch pro-oxidative Stress, was zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) führt. Diese vermehrte ROS-Produktion führt zur Zerstörung von Erythrozyten, welche somit in Ihrer Oberflächenstruktur geschädigt werden und sich einer vermehrten Hämolyse unterziehen. [69] Das hierbei freigesetzte Hämoglobin bindet an die eNOS, welche in Ihrer Funktion vollständig entkoppelt wird und zudem zur weiteren Bildung von ROS führt. Außerdem wird Cholesterin aus den beschädigten roten Blutkörperchen freigesetzt. Die Kombination dieser Vorgänge führt dazu, dass sich Ablagerungen in den Gefäßen verstärkt bilden und die Gefäße anfälliger für Schäden werden. Dadurch verringert sich die Widerstandsfähigkeit gegenüber Ereignissen im Zusammenhang mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Infolgedessen ändert sich die Rolle der eNOS von einem schützenden Faktor für das Herz zu einem Risikofaktor für akute Herzinfarkte. Daher ist es von großer Bedeutung, die Funktionen der eNOS in den Endothelzellen und den roten Blutkörperchen genau zu unterscheiden, um geeignete Maßnahmen im Verlauf der Erkrankung zu ergreifen. [69]

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nicht nur das Vorhandensein oder Fehlen von endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und die Gesamtmenge an Stickstoffmonoxid (NO) im Herzen für den kardioprotektiven Effekt während eines Herzinfarkts entscheidend sind. Vielmehr spielen die zellspezifische Lokalisierung, Bildung, Umwandlung und Speicherung von NO-Spezies eine entscheidende Rolle bei der Beeinflussung der Infarktgröße. Diese Erkenntnis legt nahe, dass eNOS in Erythrozyten ein potenzielles therapeutisches Ziel für Interventionen bei Ischämie/Reperfusion nach einem Myokardinfarkt darstellen könnte

6.4. Transfer von Langendorff Experimente auf Patienten mit Akutes Koronarsyndrom

In der, von Mamas et al durchgeführten UK Myocardial Ischemia National Audit Project Registry-Studie konnte festgestellt werden, dass die meisten Patienten mit akuten Koronarsyndrom relevante Komorbiditäten sowie ein hohes Alter aufweisen. [56] Zudem konnte gezeigt werden, dass dieses Patientenkollektiv weniger häufig als die restlichen Patienten eine evidenzbasierte Therapie erhalten haben, welche das klinische Endresultat verbessern könnte. [56] Viele Patienten haben bereits ein erhöhtes kardiovaskuläre Risikoprofil wie Diabetes mellitus, chronische Niereninsuffizienz und arterielle

Hypertonie, welches eine vermehrte Freisetzung von ROS, sowie eine eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit bzw. eNOS-Funktion bewirkt. In einem Transferexperiment von Wischmann et al. wurden die kardioprotektiven Eigenschaften von Erythrozyten bewertet, indem isolierte und resuspendierte Erythrozyten von STEMI-Patienten, die einer primären perkutanen Koronarintervention unterzogen wurden, auf isolierte Mausherzen übertragen wurden, die 40 Minuten globaler Ischämie und 120 Minuten Reperfusion ausgesetzt waren. [70]. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in ex vivo Transferexperimenten dysfunktionale Erythrozyten ihre kardioprotektiven Eigenschaften in isolierten Mausherzen verlieren, die einer Ischämie/Reperfusion ausgesetzt sind. Der koronare Blutfluss wurde in beiden Gruppen aufrechterhalten. Somit sind die soeben genannten Effekte ein spezifisches Merkmal für Erythrozyten, da eine Vorbelastung mit Plasma von entweder anämischen oder nicht-anämischen STEMI-Patienten keine Auswirkungen auf Parameter der LV-Funktion nach Ischämie/Reperfusion hatte. [70] Hauptverantwortlich für den Verlust der Kardioprotektion von dysfunktionalen Erythrozyten in STEMI Patienten mit Anämie war ein reduzierter zirkulierenden NO-Pool. Eine gezielte Therapieoption zur Verbesserung der eNOS-Expression und Funktion, sowie zur Prävention des Uncoupling der eNOS ist derzeit nicht zugelassen. Darüber hinaus zeigten klinische Studien, dass die Inhalation von NO jedoch möglich Angriffspunkte einer pharmakologischen Therapie für Patienten mit Anämie während des akuten myokardialen Ereignisses aufweisen. [47, 60, 61] Jedoch blieben diese klinischen Versuche mit NO-Inhalation ohne eine Verbesserung der kontraktilen Funktion nach AMI. Die Ergebnisse der Arbeit von Hayward et al. lässt eine Inaktivierung des aufgenommenen NO durch beispielsweise Hämoglobin vermuten, bevor es im Herzen wirken kann. [71]

6.4.1. Transfer von anämischen Tiermodellen in klinische Studien

Tierexperimente zur Analysierung von anämischen Modellen im akuten Herzinfarktmodell wurde in der Vergangenheit zahlreich vorbeschrieben. [22] Bisher gestaltet sich jedoch der Transfer einer medikamentösen Therapie aus dem Tiermodell in humane Studien deutlich erschwert. Wischmann et al. haben in Versuchen die Einflüsse der Gabe von i.v. Eisenpräparaten getestet. Hierbei zeigte sich, dass die Gabe von Eisen die myokardiale Funktion positiv beeinflussen kann, der geeignete Therapiezeitraum jedoch auf Grund der akuten Phase Reaktionen und dadurch vermittelte Inflammation limitiert ist. [22] Eine Eisensupplementierung 24 Stunden nach der Reperfusion eines akuten Herzinfarkts zeigte

sich sicher und führt zu einem erhöhten Schlagvolumen und Herzzeitvolumen. [22] Dies unterstreicht sein Potenzial als ergänzende Behandlung bei Anämie nach reperfundiertem AMI. Zudem konnte bisher keine effektive Verbesserung durch eine Bluttransfusion der betroffenen Patienten mit AMI und zeitgleicher Anämie bewiesen werden. Ein anderer Ansatz wurde von Minamino et al. untersucht. [72] Hierbei wurde STEMI-Patienten mit einer geringen linksventrikulären Ejektionsfraktion LVEF (<50%) intravenös EPO verabreicht in einem Zeitraum von sechs Stunden nach AMI. In der Auswertung konnte jedoch keine Steigerung des LVEF bei EPO-Gabe sechs Monate nach AMI festgestellt werden. [72]

Die Übertragbarkeit in vivo ist jedoch limitiert da hierbei die zirkulatorische Adaptation sowie mögliche Zytokin Freisetzung bei Patienten mit vorbestehenden Komorbiditäten nicht berücksichtigt werden. Zusätzlich können die in vivo ausgelösten vaskulären und autonomen Reflexen, welche durch Veränderungen der vaskulären Nachlast bei steigendem Schlagvolumen ausgelöst werden und so die Gesamtveränderungen des Herzzeitvolumens beeinflussen, in ex- vivo Modellen nicht analysiert werden. [73] Trotzdem könnten die gewonnenen Ergebnisse für die humane Physiologie und Pathophysiologie relevant sein.

6.5. eNOS-bezogene Mechanismen der Erythrozyten-Dysfunktion

Die Betrachtung der Versuchsergebnisse nach einer präischämischen Ladung des Spender-WT-Herzens mit Vollblut oder RBC-Suspension von anämischen Mäusen und anschließender Ischämie und Reperfusion, zeigt eine deutliche Beeinträchtigung der LV-Funktion postischämisch. Diese Beobachtung unterstützt die eingängliche Hypothese, dass eine Funktionsstörung der Erythrozyten sich auf die Interaktion derer mit dem Gefäß- und Herzgewebe auswirkt. Stützen lässt sich diese Annahme unter anderem dadurch, dass die reine RBC-Suspension schlechter abschneidet als die Vollblut-Kohorten. Hier gibt es gegebenenfalls die Möglichkeit einer Kompensation durch andere Blutbestandteile in den Vollblut Kohorten (z.B. also Plasma, Plättchen etc.). [69]

Um Unterschiede in der Sauerstoffversorgung auszuschließen, wurden die RBC-Suspensionen alle mit identischem Hämatokriten rekonstruiert. [44] Die Wirkung der anämischen RBC-Suspensionen waren vergleichbar mit den Erythrozyten der eNOS^{-/-} Mäuse, welcher die kardioprotektive RBC-eNOS fehlt. [44, 74] Daraus lässt sich

schlussfolgern, dass eine akute Anämie die kardioprotektive Wirkung der eNOS3 in den Erythrozyten stört und entkoppelt, sodass eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit in den Erythrozyten zum Verlust der kardioprotektiven Funktion in der Anämie herbeiführt.

Die Reperfusion bei kardialer Ischämie ist ein essenzieller Bestandteil, um den Schaden des Myokards zu minimieren, kann jedoch paradoxerweise auch einen Reperfusionsschaden verursachen. [75] Die Beobachtung wird dadurch gestützt, dass Mäuse mit NOS3 deprimierten Blutzellen einen niedrigeren zirkulierenden NO-Pool als Kontrollkohorten entwickeln. [55, 74] Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der jüngsten Erkenntnis, dass Erythrozyten das Herz durch den Export von NO-Bioaktivität vor IR-Schäden schützen können [36, 75] Cortese Krott et al zeigten in ihren Studien, dass in den globalen eNOS-KO-Mäusen die koronare Dilatation und die LV-Funktion vollständig erhalten bleibt. Diese Erkenntnis bestätigt, dass das verschlechtere postischämische Ergebnis durch eine Verringerung des zirkulierenden NO-Pools, welcher durch die erythrozytäre Dysfunktion und die Beeinträchtigung der erythrozytären eNOS entsteht, hervorgerufen wird. [38, 39]

Eine Entkopplung von eNOS wurde als Hauptursache für die erhöhte ROS-Produktion in Erythrozyten von Diabetikern identifiziert, die nicht nur die Kardioprotektion in isolierten Herzen mit Ischämie/Reperfusion abschwächte, sondern auch die endotheliale Dysfunktion verschlimmerte. [68, 70]

In unseren Studien begünstigte eine gleichzeitige NOS-Hemmung (bspw. durch die Gabe von L-Name) die negativen Auswirkungen der Erythrozyten auf die LV-Funktion. Wohingegen eine NO-Supplementierung die LV-Funktion wiederherstellen konnte. [44] Heymes et al. konnten zeigen, dass bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie die Genexpression der endothelialen NOS-Genexpression hochreguliert war, was dazu führte, dass das LV-Schlagvolumen und die LV-Hubarbeit aufgrund einer NO-vermittelten Rechtsverschiebung der diastolischen LV-Druck-Volumen-Relation die kardiale Funktion verbesserten. [76] Im Vergleich zu dieser Arbeit stützt dies die Hypothese, dass eine schlechtere kardiale Belastbarkeit und ein vermindertes Sauerstoffangebot zu einer kompensatorischen Steigerung der vaskulären und myokardialen eNOS-Aktivität führen. [77] Dabei ist davon auszugehen, dass die Genexpression ebenso in den Erythrozyten angeregt wird und für eine kardio-zirkulatorische Anpassung an die Anämie zuständig ist. [44, 77]

Durch die induzierte Anämie konnten wir eine Verringerung des Hämatokrits von 51 % auf 26 % mit einer anschließenden Verringerung des gesamten zirkulierenden Erythrozytenvolumens verzeichnen. Zusätzlich zeigte Wischmann et al., dass die Gesamtmenge aller oxidativen und nitrosierten NO-Metaboliten im Blut anämischer Mäuse stark reduziert wurde. Verantwortlich dafür ist die Volumenexpansion des Plasmas bei Anämie, die Verringerung der Gesamtmenge der Erythrozyten und die verringerte NO-Bioaktivität in den verbleibenden Erythrozyten. [44] Gleichzeitig ist die Konzentration der NO Metabolite im Plasma um mehr als das Dreifache höher als die der Erythrozyten, welches überwiegend durch eine kompensatorische Erhöhung der vaskulären eNOS ermöglicht wird. [44] Daher könnte man erwägen, den zirkulierenden NO-Pool bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung zu erhöhen. Dies könnte durch die Beeinflussung der Funktion der roten Blutkörperchen geschehen, um die mikrovaskuläre Dysfunktion auszugleichen [14].

6.6 Ursachen und Auswirkungen der Anämie auf ein postmyokardiales Outcome

In Anbetracht der hohen Inzidenz von leichter und mittelschwerer Anämie bei Patienten mit ACS [56, 78] könnten diese Ergebnisse Auswirkungen auf das Therapiemanagement von Patienten haben. In den USA konnte bereits gezeigt werden, dass ca. 30-40 % der ACS-Patienten an einer relevanten Anämie bei stationärer Aufnahme oder an einem Krankenhaus erworbenen Anämie leiden, welche mit erhöhter Mortalität verbunden war. [79] Neben den bereits genannten Ursachen der akuten und chronischen Anämie ist hier ebenfalls eine durch Salisbury beschriebenen im Krankenhaus erworbene Anämie zu nennen, welche durch, interventionelle Eingriffe, Hämodilution, Blutungen und repetitive Blutentnahmen, insbesondere auf den Intensivstationen hervorgerufen wird. [79-81] Da derzeit keine adäquate Therapie der Anämie besteht, bedarf es weitere klinische Studien, um das Regime der kritisch kranken Patienten auf den Intensivstationen zu verbessern, um vor allem auch die Gefahr einer nach Aufnahme erworbenen Anämie zu verhindern und angemessen zu therapieren. [44, 81, 82] Aronson et al zeigten in ihrer Studie, dass eine durch oben benannte Faktoren entstandenen Folgen der Anämie während und nach dem Herzinfarkt, durch Transfusionen von RBCs bei einem Hb von <8 mg/dl eine signifikante Verbesserung des klinischen Ergebnisses brachten. [83]

Wie bereits durch Wischmann et al kritisch angemerkt, gibt es keinen offiziellen Unterschied zwischen anämischen und nicht-anämischen ACS-Patienten in Bezug auf die leitliniengerechte Therapie. Zusätzlich besteht eine Lücke in der bisherigen Datenlage bezüglich einer Therapie von unterschiedlichen Endotypen während eines akuten Herzinfarktes. [44] Somit kann nicht differenziert werden, ob die vorliegenden Ergebnisse auf verschiedene Arten von Anämie anwendbar sind oder nicht. Ebenso ist derzeit kein Biomarker bekannt, welcher die verschiedenen Endotypen der Anämie hinsichtlich der klinischen Prognose bei Patienten mit akuten Koronarsyndrom bzw. akuter myokardialer Ischämie stratifiziert. Derzeit ist die einzige Richtgröße der Hb-Wert, sowie die RDW, welche mit einer schlechten klinischen Prognose bei Patienten mit akuten Koronarsyndrom in Zusammenhang gebracht wird. [9]

6.7 Die Rolle der erythrozytären und kardialen eNOS bei der Kompensation von Anämie und AMI

Die vorliegenden Daten unterstreichen die bedeutende Rolle der eNOS, vor allem aber der erythrozytären eNOS bei der kardialen Anpassung an eine sowohl subakute als auch chronische Anämie. Währenddessen kann bei den Vollblutkohorten und den verwendeten Wildtyp-Herzen eine wesentliche Rolle der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) nicht ausgeschlossen werden. [44] Des Weiteren lässt sich auf eine Schlüsselrolle der erythrozytären eNOS schließen, da die RBC-Kohorten mit Blut aus eNOS^{-/-} Mäusen deutlich schlechtere Ergebnisse und eine schlechtere Erholung des linksventrikulären Druckes nach myokardialer Ischämie zeigten. Dies geschieht trotz vorhandener endothelialer eNOS im Empfänger-Herz, woraus sich auf eine bedeutende Wirkung der erythrozytären eNOS schließen lässt.

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) wird in vielen Zellen exprimiert, vor allem jedoch in Endothelzellen. Es ist bekannt, dass vaskuläre Endothelzellen durch eine Reaktion Arginin in Stickstoffmonoxid (NO) umwandeln können. Das produzierte NO diffundiert zu den lokalen glatten Muskelzellen und aktiviert ihren cGMP-Signalweg. Dieser Signalweg führt letztendlich dazu, dass die Muskelzelle sich entspannt und es zu einer Vasodilatation kommt. Neben Scherstress und Gefäßweitung als mechanische Stimuli gibt es weitere Wege, die die eNOS in den Blutgefäßen aktivieren können, wie interendotheliale Verbindungskomplexe, Ionenkanäle, Arginin-Kanäle oder das

Zytoskelett. Diese befinden sich in spezifischen Mikrodomänen. Eine Überexpression von eNOS kann zu einem Blutdruckabfall mit erhöhter NO-Freisetzung führen. Wischmann et al. konnten zeigen, dass in der Anämie die eNOS-Expression in der Aorta von Mäusen deutlich erhöht war. Dies wurde durch eine gesteigerte flussvermittelte Dilatation bei anämischen Mäusen bestätigt, die durch den NOS-Inhibitor L-NAME aufgehoben wurde. Darüber hinaus wurde die erhöhte eNOS-Aktivität durch einen Anstieg von Nitrit und nitrosiertem NO in der Aortenwand bestätigt. Anämische Mäuse zeigten verschiedene kompensatorische Veränderungen, darunter eine Verringerung des Blutdrucks und des systemischen Gefäßwiderstands, um die gesamte Sauerstoffzufuhr und -aufnahme des Körpers aufrechtzuerhalten. Zudem gab es eine Zunahme der Verformbarkeit der roten Blutkörperchen und der Herzfrequenz, was zu einer verbesserten Herzleistung beitrug. Die Behandlung mit L-NAME reduzierte den durch Anämie bedingten Rückgang des mittleren arteriellen Blutdrucks, was darauf hindeutet, dass vaskuläres eNOS wesentlich zur Kompensation der Anämie beiträgt. Um eine genauere Differenzierung zwischen der Wirkung der endothelialen und erythrozytären eNOS herleiten zu können, müsste der Versuch erweitert werden unter der Verwendung von Kompartiment spezifischen eNOS^{-/-} Spenderherzen (z.B: RBC-eNOS KO, EC-eNOS KO)

Bei den verwendeten Blutproben der chronisch-anämischen Wildtyp-Mäuse konnte eine bessere Erholung des linksventrikulären Druckes nach einem ischämischen myokardialen Ereignis festgestellt werden. Hier zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen RBC und Vollblut-Versuchen, wobei die RBC-Kohorten ähnlich gut wie die Kontrollmäuse abschnitten. Folglich wäre zu überprüfen, ob in den sechs Wochen der Anämieinduktion eine intrinsische Hochregulation der eNOS-Genexpression im Körper angestoßen wird, welche zur Kardioprotektion bei Ischämie beiträgt. Denkbar in diesem Zusammenhang wäre eine erweiterte Analyse mit weitergehender Untersuchung der Genexpression in anämischen und nicht anämischen Geweben und RBCs mittels Westernblot. Zudem sollten die Einflüsse anderer Blutbestandteile und Gerinnungsparameter ebenfalls dezidiert untersucht werden, um die genauen Einflüsse festzustellen, welche den Unterschied zwischen Vollblut und RBC-Kohorte mit beeinflussen.

In der durchgeführten TTC-Färbung zur Ermittlung der jeweiligen Infarktgröße der Herzen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kohorten. Diese Ergebnisse belegen, dass die Anämie keinen Einfluss auf die Infarktgröße, jedoch auf

linksventrikuläre Funktion nach Ischämie/Reperfusions-Schaden hat. In diesem Zusammenhang ließe sich diskutieren, dass das verschlechterte Outcome nach einem AMI nicht durch das Maß der Minderperfusion bzw. die Größe des Infarktareals definiert wird, sondern vor allem ein multifaktorielles Zusammenspiel aus Infarktcharakteristika ist. Hierbei stellen sich als Infarktcharakteristika die intramyokardiale Hämorrhagie und die mikrovaskuläre Obstruktion als bekannte myokardiale Prognoseparameter dar, welche einen schlechten Verlauf für das Remodellierung und somit die Funktion des linken Ventrikels bzw. des Herzens sind. [64, 84]

Wie durch Cosby et al erwähnt wurde, steigt das Mortalitätsrisiko bei AMI-Patienten signifikant an, sobald der Hämoglobin-Wert unter 9 bis 8 g/dl fällt. [77] Auch dies spricht dafür, dass ein subakuter Abfall, wie bei den Kohorten der subakuten Anämie mit einem deutlich schlechteren klinischen Ergebnis vergesellschaftet ist.

Es ist bekannt, dass eine erhöhte Ausschüttung von NO unter akuter und chronischer Anämie zur vermehrten Genexpression von eNOS führt. [85] In Übertragung auf unser Anämie-Modell lässt sich vermuten, dass bei der chronischen Anämie eine vermehrte Genexpression von eNOS unter anderem auch in den Erythrozyten, durch ein vermindertes Sauerstoffangebot angeregt wird. Somit schneiden die chronischen RBC-Kohorten besser ab, als die subakuten RBC-Kohorten, welche zwar zur vermehrten NO-Ausschüttung angeregt sind, jedoch noch keine Anpassung an die Belastungssituation erfolgt ist.

6.8 Limitation der Arbeit

Diese Dissertation zeigt, dass das etablierte ex-vivo Langendorff-Modell eine effektive Methode darstellt, um die Interaktionen zwischen den Herzmuskelzellen und den beim präischämischen Laden verwendeten Vollblut und RBC-Suspensionen zu untersuchen. Zusätzlich erlaubt diese Methode eine detaillierte Analyse der Auswirkungen der verwendeten Blutmengen auf den I/R-Schaden. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund des ex-vivo Charakters bei dieser Methode gewisse Einschränkungen existieren.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in vivo Zustände sowie die Ableitung von Schlussfolgerungen über Kompensationsmechanismen des Gesamtorganismus sind nicht möglich. Dies resultiert unter anderem aus der Tatsache, dass die RBCs und das Vollblut lediglich während der Phase der Globalischämie in das murine Koronarsystem eingebracht

werden. Dies führt zu einer Begrenzung der analysierten Zell-Zell-Interaktionen auf diesen spezifischen Versuchszeitraum, da in der postischämischen Phase das murine Herz erneut mit KHP perfundiert wird. Gegebenenfalls würden andere Ergebnisse erzielt werden bei einer postischämischen Perfusion mit dem auch präischämisch geladenen Präparat.

Zusätzliche Einflüsse der Blutkomponenten auf die Endothelzellen und Kardiomyozyten vor der Globalischämie sowie während der gesamten Reperfusionsphase können nicht berücksichtigt werden. Die Auswirkungen anderer Blutbestandteile wie Plasma und Thrombozyten auf das System bleiben unbeachtet, da hierfür keine Betrachtung in der vorliegenden Arbeit erfolgt ist.

Neben der Expression von eNOS besitzen die roten Blutzellen weitere Funktionen, welche in dieser Studie nicht analysiert wurden. Um jedoch das Gesamtbild der RBC-Dysfunktion abbilden zu können, sind Proteom Analysen von anämischen RBC unabdingbar. Proteom Untersuchungen wurden bereits durch Pasini et al. an physiologischen RBC durchgeführt. [86] Durch eine Übertragung des Versuches wäre die Analyse von sämtlichen Proteinen unter pathophysiologischen Bedingungen während der Anämie möglich und könnte ihre Funktionen in den RBC entschlüsseln.

Jedoch hat die isolierte Erforschung des Herzens den Vorteil, dass Störgrößen wie neurohumorale oder systemische Faktoren die Ergebnisse nicht zusätzlich beeinflussen. Eine weitere Limitation bietet das murine Spenderherz selbst, da dieses aus Wildtyp Mäusen stammt. Dadurch befindet sich die eNOS im Endothel der Koronarien. Somit beeinflusst das Vorhandensein der eNOS im Endothel das Ergebnis, da sich die Ergebnisse nicht isoliert auf die präischämisch geladene erythrozytäre NO-Synthase beziehen lassen. Hierzu müsste das Spenderherz ebenfalls von eNOS^{-/-} Mäusen stammen.

Auch der zur prä- und postischämischen Perfusion verwendete Krebs-Henseleit-Puffer kann mit seinen verschiedenen Bestandteilen die Kontraktilität des murinen Herzens beeinflussen. Unter anderem sind die Auswirkungen von Calcium und Pyruvat auf die Kontraktilität des Herzens bekannt und stellen wichtige Aspekte der kardialen Physiologie dar.

So reguliert Calcium die Muskelkontraktion im Herzen, indem es die Kontraktilität der Herzmuskelzellen direkt beeinflusst. Während der Erregung einer Herzmuskelzelle gelangen Calciumionen über L-Typ-Calciumkanäle ins Zellinnere und lösen die

Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern aus. Dieses Calcium bindet an muskelspezifische Proteine, was die Kontraktion der Herzmuskelzelle auslöst.

Veränderte Calciumkonzentrationen beeinflussen die Kontraktilität. Eine höhere intrazelluläre Calciumkonzentration verstärkt die Kontraktion, während eine niedrigere Konzentration zu einer verminderten Kontraktion führt.

Auch Pyruvat kann in bestimmten Konzentrationen die Herzfunktion positiv beeinflussen, indem es den mitochondrialen Energiestoffwechsel anregt und so die Kontraktilität des Herzens steigert. Besonders in Situationen mit beeinträchtigtem Energiestoffwechsel wie akute Myokardischämie oder Herzinsuffizienz könnte dies von Vorteil sein.

Somit könne auch nur geringfügige Schwankungen in der Zusammensetzung des KHP zu einer sowohl positiven als auch negativen Verfälschung der Ergebnisse führen, ganz gleich was präischämisch in das murine Herz geladen wurde.

7. Schlussfolgerungen

Diese Dissertation zeigt, dass isolierte RBCs nach einem I/R-Schaden eine positive Wirkung auf das Herzmuskelgewebe haben können. Um die genaue Wechselwirkung zwischen Blutzellen und Herzzellen zu verstehen, sind spezifische Versuche notwendig, welche mittels pharmakologischer Inhibition ermöglichen, interzelluläre Signalwege und (patho-) physiologische Prozesse zu erforschen.

Die LD-Methode, die in dieser Arbeit verwendet wurde, erwies sich als geeignet, um die Auswirkungen von Zell-Zell-Interaktionen während des I/R-Schadens zu analysieren. Ein Vorteil ist die geringe Menge an Blut, die benötigt wird, um die Effekte am Herzmuskel nach einem I/R-Schaden zu beobachten und zu analysieren. Ebenso konnte ein Transferexperiment mit humanen Blutproben von STEMI- Patienten mit Anämie die Effekte von isolierten Erythrozyten auf die linksventrikuläre Funktion nach Ischämie/Reperfusionsschaden untersuchen. [70]

In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass vorbehandelte RBCs, die mit einer pharmakologischen Substanz (NONOate) behandelt wurden, dazu verwendet werden können, den Einfluss bestimmter Enzyme wie der NOS auf die Kontraktilität des linken Ventrikels nach einem I/R-Schaden zu untersuchen. Somit können durch Recovery-Versuche mithilfe einer pharmakologischen Therapie von (NONOate) die negativen Effekte von dysfunktionalen anämischen Erythrozyten aufgehoben werden. Diese Methode erlaubt auch die Erforschung klinisch relevanter Fragestellungen, da auch isolierte menschliche RBCs in dem Langendorff-Transferversuch erfolgreich analysiert werden können. Insbesondere eignet sich die LD-Methode, um RBC-Dysfunktionen zu charakterisieren und die Effekte der Anämie auf die Herzfunktion nach einem I/R-Schaden zu untersuchen.

Die LD-Methode bietet eine kostengünstige Möglichkeit, verschiedene Formen der Anämie zu analysieren, einschließlich subakuter und chronischer Anämie. Als Folgeversuche wäre es somit möglich den Einfluss von Blut von gesunden Personen und Patienten mit Herzerkrankungen auf das murine Herzgewebe zu untersuchen.

Zusammenfassend ergänzt das LD-Transfermodell die bisherigen Perfusionsmodelle mit Blut oder RBC-Pufferlösungen. Aufgrund seiner Einfachheit und der Möglichkeit zur Herstellung verschiedener Blutkomponenten steigert diese Methode die Reproduzierbarkeit der Experimente. Die einfache Handhabung und vielfältige

Untersuchungsmöglichkeiten machen das ex vivo Transfermodell zu einer vielversprechenden Methode, um die Wechselwirkungen zwischen Zellen im Rahmen von I/R-Schäden zu erforschen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Anämie zu einer eNOS Dysfunktion der RBCs führt, die die Funktion des linken Ventrikels nach einem I/R-Schaden erheblich beeinträchtigt. Wir konnten nachweisen, dass eine Störung der Expression von eNOS, eine große Rolle bei der Dysfunktion der roten Blutkörperchen bei subakut und chronisch anämischen Mäusen spielt. Durch eine vorherrschende RBC-Dysfunktion kommt es zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Kontraktilität nach einer myokardialen globalen Ischämie/Reperfusionsschaden im isolierten Langendorff Modell. In der Anämie zeigte sich eine Anpassung des Herz-Kreislauf-Systems, welche durch eine gesteigerte vaskuläre eNOS-Expression und -Funktionalität sowie eine eNOS vermittelte Zunahme des enddiastolischen Volumens des linken Ventrikels gekennzeichnet war. Nach Induktion eines AMI kommt es zu einer deutlichen Verschlechterung der LV-Funktion mit einer erhöhten Mortalität. [44]

Die genetische Manipulation der eNOS-Aktivität in den Knockout -Mäusen ist durch eine fehlende Expression von endothelialen, kardialen und erythrozytären eNOS-Funktion charakterisiert. Insbesondere zeigte sich das Fehlen der eNOS-Aktivität darin, dass die kardioprotektiven Effekte nach Ischämie/Reperfusionsschaden verloren gehen. Dies war durch eine signifikante Verschlechterung der linksventrikulären Funktion, insbesondere des linksventrikulären diastolischen Drucks, gekennzeichnet. Es ist daher zu vermuten, dass die eNOAS vermittelte Erythrozytendysfunktion ebenso wie die Endotheldysfunktion die linksventrikuläre Funktion stark beeinträchtigen und damit das klinische Ergebnis eines ischämischen Ereignisses im Myokard negativ beeinflussen kann.

Viele der Patienten mit ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) weisen ein hohes kardiovaskuläres Risikoprofil mit zahlreichen relevanten Komorbiditäten auf. In zahlreichen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und chronische Nierenerkrankungen mit einer endothelialen Dysfunktion vergesellschaftet sind. Das tiefere Verständnis der komplexen Schlüsselrolle der Anämie bei der akuten myokardialen Ischämie ist entscheidend, um das Management von STEMI Patienten mit Anämie zu verbessern und zukünftige Therapiestrategien zu entwickeln. Mehrere Studien konnten belegen, dass durch Bluttransfusionen die Mortalität während des AMI verschlechtert wurde. [27, 83] Es könnten sich neue Therapieansätze für

Patienten ergeben, die sowohl von einer Anämie als auch von einem AMI betroffen sind, indem nicht alleine der erniedrigte Hb-Wert (beispielsweise durch Transfusionen) therapiert wird, sondern neue Biomarker der Anämie und deren unterschiedliche Endotypen untersucht werden.

Somit kann man zu dem Schluss kommen, dass die vorliegenden Experimente einige Einblicke in die Auswirkung der eNOS während subakuter und chronischer Anämie auf die myokardiale Funktion im Hinblick auf einen I/R-Schaden haben. Die Methode selbst verfügt über bereits aufgezählte Limitationen, welche die Ergebnisse verfälschen und die Übertragbarkeit auf den humanen Organismus limitieren können. Jedoch wären noch weitere Experimente im Langendorff-Modell am murinen Herzen unter anderem mit humanen Proben oder dem Zusatz von pharmakologischen Substanzen in Zukunft denkbar. Somit hätte man mögliche Ansatzpunkte einer pharmakologischen Therapie während eines AMI zu testen.

8. Literaturverzeichnis

1. Speckmann, E., J. Hescheler, and R. Köhling, *Physiologie: Das Lehrbuch*. 7 ed. 2019, Germany: Elsevier. 918.
2. 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.
3. Braunstein, E. *Bildung der roten Blutkörperchen*. 2022 Juli 2022 [cited 2024; Available from: <https://www.msmanuals.com/de-de/profi/hämatologie-und-onkologie/untersuchung-des-anämischen-patienten/diagnose>].
4. Herold, G., *Innere Medizin*. 2021, Germany: Herold, G. 1002.
5. Heinrich, P., M. Müller, and L. Graeve, *Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie*. 9 ed. 2014, Germany. 1073.
6. Peña-Rosas, J.P., et al., *Intermittent oral iron supplementation during pregnancy*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **7**(7): p. Cd009997.
7. al., W.B.e., *AWMF Leitlinie Eisenmangelanämie*. AWMF, 2021.
8. Horl, W.H., *[Diagnosis and therapy of renal anemia. Iron levels should be watched carefully: MMW Seminar on Anemia. 2]*. MMW Fortschr Med, 1999. **141**(24): p. 47-8.
9. Zhang, Z., et al., *Relationship between Red Blood Cell Indices (MCV, MCH, and MCHC) and Major Adverse Cardiovascular Events in Anemic and Nonanemic Patients with Acute Coronary Syndrome*. Dis Markers, 2022. **2022**: p. 2193343.
10. Anker, S.D., et al., *Prevalence, incidence, and prognostic value of anaemia in patients after an acute myocardial infarction: data from the OPTIMAAL trial*. Eur Heart J, 2009. **30**(11): p. 1331-9.
11. Greten, H., F. Rinniger, and T. Greten, *Innere Medizin*. 13 ed. 2010, Germany: Georg Thieme Verlag. 1241.
12. Cappellini, M.D., K.M. Musallam, and A.T. Taher, *Iron deficiency anaemia revisited*. J Intern Med, 2020. **287**(2): p. 153-170.
13. Wischmann, P., et al., *Relevance of pre-existing anaemia for patients admitted for acute coronary syndrome to an intensive care unit: a retrospective cohort analysis of 7418 patients*. Eur Heart J Open, 2022. **2**(4): p. oeac040.
14. Jung, C., et al., *The role of anemia on admission in acute coronary syndrome - An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses*. Int J Cardiol, 2022. **367**: p. 1-10.
15. Colombo, M.G., et al., *Association between admission anemia and long-term mortality in patients with acute myocardial infarction: results from the MONICA/KORA myocardial infarction registry*. BMC Cardiovasc Disord, 2018. **18**(1): p. 50.
16. Zhang, Y., et al., *Restrictive vs. Liberal Red Blood Cell Transfusion Strategy in Patients With Acute Myocardial Infarction and Anemia: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Front Cardiovasc Med, 2021. **8**: p. 736163.
17. Horl, W.H., *New insights into intestinal iron absorption*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(10): p. 3063-4.
18. Larson, D.S. and D.W. Coyne, *Understanding and exploiting hepcidin as an indicator of anemia due to chronic kidney disease*. Kidney Res Clin Pract, 2013. **32**(1): p. 11-5.
19. Cappellini, M.D. and I. Motta, *Anemia in Clinical Practice-Definition and Classification: Does Hemoglobin Change With Aging?* Semin Hematol, 2015. **52**(4): p. 261-9.
20. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
21. Anand, I.S. and P. Gupta, *Anemia and Iron Deficiency in Heart Failure: Current Concepts and Emerging Therapies*. Circulation, 2018. **138**(1): p. 80-98.
22. Wischmann, P., et al., *Safety and efficacy of iron supplementation after myocardial infarction in mice with moderate blood loss anaemia*. ESC Heart Fail, 2021. **8**(6): p. 5445-5455.
23. Fraenkel, P.G., *Understanding anemia of chronic disease*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015. **2015**: p. 14-8.

24. Westenbrink, B.D., et al., *Anemia predicts thromboembolic events, bleeding complications and mortality in patients with atrial fibrillation: insights from the RE-LY trial*. J Thromb Haemost, 2015. **13**(5): p. 699-707.
25. Erdmann, J., et al., *Dysfunctional nitric oxide signalling increases risk of myocardial infarction*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 432-6.
26. Ding, Y.Y., et al., *Hemoglobin Level and Hospital Mortality Among ICU Patients With Cardiac Disease Who Received Transfusions*. J Am Coll Cardiol, 2015. **66**(22): p. 2510-8.
27. Alexander, K.P., et al., *Transfusion practice and outcomes in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes*. Am Heart J, 2008. **155**(6): p. 1047-53.
28. Figueras, J., et al., *Thrombin formation and fibrinolytic activity in patients with acute myocardial infarction or unstable angina: in-hospital course and relationship with recurrent angina at rest*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(7): p. 2036-43.
29. García-Roa, M., et al., *Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives*. Blood Transfus, 2017. **15**(3): p. 222-231.
30. Cortese-Krott, M.M., et al., *A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO production and nitrosation events using diaminofluoresceins*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(11): p. 2146-58.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Jung, C., et al., *Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(1): p. 147-54.
35. Gonon, A.T., et al., *Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42038.
36. Kleinbongard, P., et al., *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2943-51.
37. Wood, K.C., et al., *Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(8): p. 1861-71.
38. Leo, F., et al., *Red Blood Cell and Endothelial eNOS Independently Regulate Circulating Nitric Oxide Metabolites and Blood Pressure*. Circulation, 2021.
39. Cortese-Krott, M.M., et al., *Red blood cell eNOS is cardioprotective in acute myocardial infarction*. Redox Biol, 2022. **54**: p. 102370.
40. Rassaf, T., et al., *Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function*. Circ Res, 2007. **100**(12): p. 1749-54.
41. Daiber, A., et al., *Targeting vascular (endothelial) dysfunction*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(12): p. 1591-1619.
42. Liu, C., et al., *Mechanisms of human erythrocytic bioactivation of nitrite*. J Biol Chem, 2015. **290**(2): p. 1281-94.
43. Reiter, C.D., et al., *Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease*. Nat Med, 2002. **8**(12): p. 1383-9.
44. Wischmann, P., et al., *Anaemia is associated with severe RBC dysfunction and a reduced circulating NO pool: vascular and cardiac eNOS are crucial for the adaptation to anaemia*. Basic Res Cardiol, 2020. **115**(4): p. 43.
45. Kelm, M. and J. Schrader, *Control of coronary vascular tone by nitric oxide*. Circ Res, 1990. **66**(6): p. 1561-75.
46. Heusch, G., et al., *Endogenous nitric oxide and myocardial adaptation to ischemia*. Circ Res, 2000. **87**(2): p. 146-52.
47. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.

48. 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.
49. Kaya, S., *Charakterisierung eines Langendorff basierten Zelltransfer Modells des kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens*, in *medical research school*. 2020.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Teilmann, A.C., et al., *Physiological and pathological impact of blood sampling by retro-bulbar sinus puncture and facial vein phlebotomy in laboratory mice*. *PLoS One*, 2014. **9**(11): p. e113225.
54. Fens, M.H., et al., *The capacity of red blood cells to reduce nitrite determines nitric oxide generation under hypoxic conditions*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e101626.
55. 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.
56. Mamas, M.A., et al., *Relationship Between Anemia and Mortality Outcomes in a National Acute Coronary Syndrome Cohort: Insights From the UK Myocardial Ischemia National Audit Project Registry*. *J Am Heart Assoc*, 2016. **5**(11).
57. Lui, F.E. and R. Kluger, *Reviving artificial blood: meeting the challenge of dealing with NO scavenging by hemoglobin*. *Chembiochem*, 2010. **11**(13): p. 1816-24.
58. Kim, J.H., et al., *Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats*. *J Appl Physiol* (1985), 2009. **107**(4): p. 1249-57.
59. LoBue, A., et al., *Red blood cell endothelial nitric oxide synthase: A major player in regulating cardiovascular health*. *Br J Pharmacol*, 2023.
60. Förstermann, U. and H. Li, *Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(2): p. 213-23.
61. Rochette, L., et al., *Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?* *Pharmacol Ther*, 2013. **140**(3): p. 239-57.
62. Radziwon-Balicka, A., et al., *Differential eNOS-signalling by platelet subpopulations regulates adhesion and aggregation*. *Cardiovasc Res*, 2017. **113**(14): p. 1719-1731.
63. Ruschitzka, F.T., et al., *Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(21): p. 11609-13.
64. Gorressen, S., et al., *Circulating NOS3 modulates left ventricular remodeling following reperfused myocardial infarction*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0120961.
65. 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.
66. Jiao, T., et al., *Erythrocytes from patients with ST-elevation myocardial infarction induce cardioprotection through the purinergic P2Y₁₃ receptor and nitric oxide signaling*. *Basic Res Cardiol*, 2022. **117**(1): p. 46.
67. Zhuge, Z., et al., *Red blood cells from endothelial nitric oxide synthase-deficient mice induce vascular dysfunction involving oxidative stress and endothelial arginase I*. *Redox Biol*, 2023. **60**: p. 102612.
68. 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.
69. Mahdi, A., et al., *Novel perspectives on redox signaling in red blood cells and platelets in cardiovascular disease*. *Free Radic Biol Med*, 2021. **168**: p. 95-109.
70. Wischmann, P., et al., *Red Blood Cell-Mediated Cardioprotection Is Impaired in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Patients With Anemia*. *JACC Basic Transl Sci*, 2023. **8**(10): p. 1392-1394.

71. Hayward, C.S., et al., *Effect of inhaled nitric oxide on normal human left ventricular function*. J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(1): p. 49-56.
72. Minamino, T., et al., *Low-Dose Erythropoietin in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (EPO-AMI-II) - A Randomized Controlled Clinical Trial*. Circ J, 2018. **82**(4): p. 1083-1091.
73. Prendergast, B.D., V.F. Sagach, and A.M. Shah, *Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart*. Circulation, 1997. **96**(4): p. 1320-9.
74. Burger, D., et al., *Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase*. Cardiovasc Res, 2006. **72**(1): p. 51-9.
75. Davidson, S.M., et al., *Circulating blood cells and extracellular vesicles in acute cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2019. **115**(7): p. 1156-1166.
76. Heymes, C., et al., *Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1999. **99**(23): p. 3009-16.
77. Cosby, K., et al., *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1498-505.
78. Bryan, N.S., et al., *Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4308-13.
79. Bindra, K., et al., *Abnormal haemoglobin levels in acute coronary syndromes*. QJM, 2006. **99**(12): p. 851-62.
80. Dauerman, H.L., et al., *Bleeding complications in patients with anemia and acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2005. **96**(10): p. 1379-83.
81. Salisbury, A.C., et al., *Incidence, correlates, and outcomes of acute, hospital-acquired anemia in patients with acute myocardial infarction*. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2010. **3**(4): p. 337-46.
82. Meyer, C., et al., *Hemodialysis-induced release of hemoglobin limits nitric oxide bioavailability and impairs vascular function*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(5): p. 454-9.
83. Aronson, D., et al., *Impact of red blood cell transfusion on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2008. **102**(2): p. 115-9.
84. Amorim, S., et al., *Left ventricular reverse remodeling in dilated cardiomyopathy- maintained subclinical myocardial systolic and diastolic dysfunction*. Int J Cardiovasc Imaging, 2017. **33**(5): p. 605-613.
85. Sessa, W.C., et al., *Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression*. Circ Res, 1994. **74**(2): p. 349-53.
86. Pasini, E.M., et al., *Red blood cell (RBC) membrane proteomics--Part I: Proteomics and RBC physiology*. J Proteomics, 2010. **73**(3): p. 403-20.