

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

Zusammenhang von schwerer Anämie mit niedrigerer myokardialer mitochondrialer oxidativer Kapazität

Dissertation

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

vorgelegt von
Tobias Adrian Kunzelmann

2026

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. Amin Polzin, FESC

Zweitgutachter: PD Dr. med. Christian Buchbender

Für Heike und Frank

Zusammenfassung

Anämie ist eine häufige Komorbidität der Herzinsuffizienz (HI) und erhöht sowohl das Risiko, an einer HI zu erkranken, als auch Morbidität und Mortalität bei vorliegender HI. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher jedoch nicht vollständig geklärt. Bisherige Forschung konnte zeigen, dass eine myokardiale mitochondriale Dysfunktion eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der HI spielt, doch bisher gibt es keine Studie, die den Zusammenhang zwischen Anämie und myokardialer mitochondrialer Funktion direkt untersucht.

Zwischen Mai 2016 und Oktober 2022 wurden für die vorliegende Arbeit (i) 130 herztransplantierte Menschen ohne Abstoßungsreaktion oder HI rekrutiert, bei denen endomyokardiale Biopsien (EMBs) entnommen wurden, sowie (ii) 152 Menschen mit nichtischämischer HI, bei denen EMBs entnommen wurden, und (iii) 38 Menschen mit ischämischer terminaler HI, bei denen ein *left ventricular assist device* (LVAD) implantiert wurde. Endomyokardiales Gewebe wurde aus EMBs oder chirurgisch entferntem Gewebe gewonnen, mit Saponin permeabilisiert und der hochauflösenden Respirometrie (HRR) zugeführt. Oxidative Phosphorylierungs- (OXPHOS-) Kapazität und *electron transfer system* (ETS-) Kapazität wurden als Marker für die mitochondriale oxidative Kapazität gemessen und die *respiratory control ratio* (RCR) als Marker für die mitochondriale Kopplungseffizienz berechnet. In Herzgewebe aus LVAD-Implantationen wurde außerdem die Citrat-Synthase-Aktivität (CSA) als Marker des Mitochondriengehaltes bestimmt. Zusätzlich wurde die Hämoglobin- (Hb-) Konzentration aus Blutproben ermittelt. Jede Kohorte wurde in eine Anämiegruppe ($\text{Hb} < 10 \text{ g / dl}$) und eine Kontrollgruppe ($\text{Hb} \geq 10 \text{ g / dl}$) unterteilt. Mithilfe unabhängiger t-Tests wurden die Gruppen auf Unterschiede hinsichtlich mitochondrialer oxidativer Kapazität, Kopplungseffizienz und Mitochondriengehalt untersucht und es wurde getestet, ob die genannten Variablen mit der Hb-Konzentration korrelierten.

In (i) herztransplantierten Menschen ohne HI war Anämie unabhängig von anderen Faktoren mit einer niedrigeren OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität bei erhaltener RCR assoziiert und die Hb-Konzentration korrelierte unabhängig von anderen Faktoren mit OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität, nicht aber mit der RCR. In (ii) Menschen mit nichtischämischer HI unterschieden sich OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität und RCR nicht zwischen Anämie- und Kontrollgruppe und korrelierten nicht mit der Hb-Konzentration. Dilatative Kardiomyopathie (DCM) und Myokarditis waren die häufigsten Ursachen für nichtischämische HI; in diesen Subkohorten korrelierte die Hb-Konzentration nicht mit OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität oder RCR. In (iii) Menschen mit ischämischer HI war Anämie unabhängig von anderen Faktoren mit einer starken Erniedrigung der RCR und einer tendenziellen nicht statistisch signifikanten Verringerung von OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität und CSA assoziiert. Die Hb-Konzentration korrelierte mit der RCR, sowie tendenziell mit OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität und CSA.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals eine direkte Assoziation zwischen Anämie und verringerter myokardialer mitochondrialer Funktion in Menschen ohne HI und Menschen mit ischämischer terminaler HI, nicht aber in Menschen mit nichtischämischer HI. Weitere Studien sind notwendig, um zu prüfen, ob eine Korrektur der Anämie die mitochondriale Funktion verbessert und die Entwicklung und das Voranschreiten von HI verlangsamt.

Abstract

Anemia is a common comorbidity in heart failure (HF) which increases both the risk of developing HF as well as morbidity and mortality after the onset of HF. However, the underlying pathomechanisms are incompletely understood. While it has been shown that myocardial mitochondrial dysfunction plays a key role in the pathogenesis of HF, there has been no study yet to investigate the link between anemia and myocardial mitochondrial dysfunction.

Between May 2016 and October 2022, (i) 130 heart transplanted humans without HF or transplant rejection undergoing endomyocardial biopsy (EMB), (ii) 152 humans with non-ischemic HF undergoing EMB, and (iii) 38 humans with ischemic terminal heart failure undergoing left ventricular assist device (LVAD) surgery were enrolled. Endomyocardial tissue was harvested from EMBs or surgically excised heart tissue, permeabilized with saponin and used for high-resolution respirometry (HRR). Oxidative phosphorylation (OXPHOS) capacity and electron transfer system (ETS) capacity were measured as markers of mitochondrial oxidative capacity and the respiratory control ratio (RCR) was calculated as a marker of mitochondrial coupling efficiency. Histological analysis was used to identify underlying diseases in humans with non-ischemic HF. Heart tissue harvested from LVAD surgery was used to measure citrate synthase activity (CSA) as a marker of mitochondrial content. Additionally, blood samples were taken, and hemoglobin (Hb) concentration was measured. Each cohort was divided into an anemia group ($\text{Hb} < 10 \text{ g / dl}$) and a control group ($\text{Hb} \geq 10 \text{ g / dl}$) and independent t-tests were used to investigate differences in mitochondrial oxidative capacity, coupling efficiency and content. Moreover, correlation analysis was used to investigate the association between Hb and mitochondrial oxidative capacity, coupling efficiency and content.

In (i) heart transplanted humans without HF, anemia was associated with lower OXPHOS capacity and ETS capacity independently of other variables while RCR was preserved. Hb concentration independently correlated with OXPHOS capacity and ETS capacity, but not with RCR. In (ii) humans with non-ischemic HF, OXPHOS capacity, ETS capacity and RCR did not differ between the anemia group and the control group. Hb concentration did not correlate with OXPHOS capacity, ETS capacity or RCR. The most frequent underlying diseases in humans with non-ischemic HF were dilatative cardiomyopathy (DCM) and myocarditis. In humans with DCM and humans with myocarditis, Hb concentration did not correlate with OXPHOS capacity, ETS capacity, or RCR. In (iii) humans with ischemic terminal HF, anemia was associated with strongly impaired RCR independently of other variables while OXPHOS capacity, ETS capacity, and CSA were not significantly lower in comparison to humans without anemia. Hb concentration correlated with RCR independently of other variables, but not significantly with OXPHOS capacity, ETS capacity, or CSA.

This study is the first to show a direct association between anemia and impaired myocardial mitochondrial function in humans without HF and in humans with ischemic terminal HF, but not in humans with non-ischemic HF. Further research is needed to investigate whether therapeutic correction of anemia enhances mitochondrial function and slows down development and progression of HF.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BIOPS	<i>Biopsy preservation solution</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
CSA	Citrat-Synthase-Aktivität
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EMB	Endomyokardbiopsie
ETF	Elektronentransferierendes Flavoprotein
ETS	<i>Electron-Transfer-System</i> -Kapazität; ETS-Kapazität
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy)phenylhydrazon
g (kg, mg, µg)	Gramm (Kilo-, Milli-, Mikrogramm)
g	Erdbeschleunigung
H₂O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HI	Herzinsuffizienz
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFmrEF	<i>Heart Failure with mildly reduced Ejection Fraction</i> ; Herzinsuffizienz mit mittelgradig reduzierter Ejektionsfraktion
HFpEF	<i>Heart Failure with preserved Ejection Fraction</i> ; Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFReEF	<i>Heart Failure with reduced Ejection Fraction</i> ; Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HRR	<i>High-resolution respirometry</i> ; Hochauflösende Respirometrie
HTX	Herztransplantation
Kat.-Nr.	Katalognummer
KHK	Koronare Herzerkrankung
L	LEAK-Respiration
l (dl, ml, µl)	Liter (Dezi-, Milli-, Mikroliter)
LCR	<i>LEAK control ratio</i>
LVAD	<i>Left ventricular assist device</i> ; Linksventrikuläres Unterstützungssystem
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M (mM, µM)	Mol / Liter (Milli-, Mikromol / Liter)
m (nm)	Meter (Nanometer)

min	Minute
mol (mmol, nmol, pmol)	Mol (Milli-, Nano-, Pikomol)
MES-hydrat	2-Morpholino-ethansulfonsäuremonohydrat
MiR05	<i>Mitochondrial respiration medium 05</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NHST	Nullhypotesensignifikanztestung
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
P	Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität, OXPHOS-Kapazität
POS	<i>Polarographic oxygen sensor</i> ; Polarographischer Sauerstoffsensor
RCR	<i>Respiratory control ratio</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Reaktive Sauerstoffspezies
ROX	<i>Residual oxygen consumption</i> ; Residualer Sauerstoffkonsum
s	Sekunde
SUIT	<i>Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration</i>
TTE	Transthorakale Echokardiographie
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz.....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Klassifikation.....	1
1.1.3	Epidemiologie.....	1
1.1.4	Ätiologie	2
1.1.5	Pathomechanismus	2
1.2	Anämie	3
1.2.1	Definition.....	3
1.2.2	Epidemiologie und Ursachen.....	3
1.3	Anämie als Komorbidität der Herzinsuffizienz.....	4
1.4	Energiestoffwechsel des humanen Myokards	5
1.4.1	Grundlagen des Energiestoffwechsels	5
1.4.2	Energiestoffwechsel im gesunden Myokard.....	8
1.4.3	Energiestoffwechsel des Myokards bei Herzinsuffizienz.....	8
1.4.4	Grundlagen der Respirometrie.....	10
1.5	Ziele der Arbeit.....	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Chemikalien.....	13
2.1.2	Kits	15
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.4	Geräte.....	17
2.1.5	Software.....	18
2.2	Studiendesign	18
2.3	Probengewinnung	19
2.3.1	Gewinnung von Herzgewebe bei Endomyokardbiopsien	19
2.3.2	Gewinnung von Herzgewebe bei LVAD-Implantationen.....	20
2.4	Hochauflösende Respirometrie.....	20
2.4.1	Herstellung der Reagenzien zur hochauflösenden Respirometrie.....	20
2.4.2	Durchführung der hochauflösenden Respirometrie.....	22
2.5	Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität	25
2.6	Ergänzende Diagnostik.....	26

2.6.1	Histopathologie.....	26
2.6.2	Venöse Blutentnahme	26
2.6.3	Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion.....	27
2.7	Statistik	27
2.7.1	Stratifizierung und Ausschluss der Patienten in der retrospektiven Analyse ..	27
2.7.2	Statistische Tests	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Post-HTX-Kohorte	30
3.1.1	Charakteristika.....	30
3.1.2	Myokardiale mitochondriale Funktion und Effizienz	32
3.2	Nichtischämische-HI-Kohorte.....	34
3.2.1	Charakteristika.....	34
3.2.2	Myokardiale mitochondriale Funktion und Effizienz	36
3.2.3	Subkohortenanalysen.....	37
3.3	Ischämische-HI-Kohorte	39
3.3.1	Charakteristika.....	39
3.3.2	Myokardiale mitochondriale Funktion und Effizienz	40
4	Diskussion	43
4.1	Charakteristika der Kohorten.....	43
4.2	Anämie als therapeutisches Ziel bei Herzinsuffizienz	44
4.3	Anämie in Menschen ohne Herzinsuffizienz.....	45
4.4	Anämie bei Menschen mit nichtischämischer Herzinsuffizienz	46
4.5	Anämie in Menschen mit terminaler ischämischer Herzinsuffizienz.....	47
4.6	Limitationen	48
5	Schlussfolgerungen	49
6	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	50

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Definition

Herzinsuffizienz (HI) wird in den Leitlinien der *European Society of Cardiology* (ESC) als klinisches Syndrom definiert, das durch Kardinalsymptome, beispielsweise Atemnot, Knöchelödeme und Fatigue, gekennzeichnet ist, die mit Krankheitszeichen, beispielsweise erhöhtem Jugularvenendruck, pulmonalen Rasselgeräuschen und peripheren Ödemen, assoziiert sein können [1]. Dies deckt sich grundsätzlich mit der Definition der Leitlinien des *American College of Cardiology*, der *American Heart Association* und der *Heart Failure Society of America* [2]. Da HI die gemeinsame Endstrecke einer Vielzahl verschiedener kardialer und extrakardialer Grunderkrankungen darstellt, betonen die europäischen Leitlinien ausdrücklich die Wichtigkeit der Identifikation der zugrundeliegenden Ätiologie bei Diagnosestellung, welche prognostische und therapeutische Relevanz besitzt (siehe Kapitel 1.1.4).

1.1.2 Klassifikation

Einhergehend mit der großen Heterogenität der HI als gemeinsame Endstrecke unterschiedlicher Grunderkrankungen, wurden verschiedene Klassifikationssysteme für die HI entwickelt. Unabhängig von der Ursache ist zunächst die Einteilung anhand der Linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) geläufig: HI mit einer LVEF $\geq 50\%$ wird als Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (*Heart Failure with preserved Ejection Fraction*; HFpEF), HI mit einer LVEF zwischen 41 % und 49 % als Herzinsuffizienz mit mittelgradig reduzierter Ejektionsfraktion (*Heart Failure with mildly reduced Ejection Fraction*; HFmrEF) und HI mit einer LVEF $\leq 40\%$ als Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (*Heart Failure with reduced Ejection Fraction*; HFrEF) bezeichnet [1]. Im klinischen Alltag wird die LVEF meist echokardiografisch bestimmt, wobei eventuelle Ungenauigkeiten im Rahmen der Messung beachtet werden sollten [3]. Goldstandard für die Bestimmung der LVEF ist die Kardiale Magnetresonanztomographie (MRT), welche jedoch aufwändiger ist und daher im klinischen Alltag seltener zum Einsatz kommt als die echokardiographische Bestimmung. Eine alternative Möglichkeit der Einteilung von HI ist die vor ca. 100 Jahren von der *New York Heart Association* (NYHA) vorgeschlagene Klassifikation [4], welche anhand körperlicher Belastbarkeit die HI in vier Klassen einteilt. Die prognostische Aussagekraft der NYHA-Klassifikation ist allerdings umstritten [5].

1.1.3 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland und verantwortlich für rund ein Drittel der Todesfälle in Deutschland [6, 7]. HI im Speziellen bildet dabei die sechsthäufigste Todesursache [8] und die häufigste Ursache für

Hospitalisierungen in Deutschland [9]. In den Jahren 2009 bis 2017 waren ca. 4 % der deutschen Bevölkerung von HI betroffen [10]. Gleichzeitig ist der Trend steigender absoluter Hospitalisierungszahlen in Deutschland bereits mindestens seit dem Jahr 2000 zu beobachten [9, 11], weshalb eine aktuell höhere Prävalenz nicht auszuschließen ist. HI ist vorrangig eine Erkrankung des älteren Menschen: Erkrankte sind im Durchschnitt 76 Jahre alt und die Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter kontinuierlich an [12]. Vor dem Hintergrund einer weiter alternden Bevölkerung im Rahmen des demographischen Wandels ist davon auszugehen, dass die Häufigkeit der HI auch in Zukunft vermutlich weiter zunehmen wird [13, 14]. Dabei beschränkt sich die große Belastung des Gesundheitssystems und der Gesellschaft durch HI keineswegs allein auf Deutschland, sondern stellt eine weltweite Herausforderung dar: In der Vergangenheit ist die HI bereits als „weltweite Pandemie“ beschrieben worden [15].

1.1.4 Ätiologie

Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben handelt es sich bei der HI um die gemeinsame Endstrecke verschiedener Grunderkrankungen. Diese möglichen Grunderkrankungen werden von der ESC eingeteilt in koronare Herzerkrankung, Hypertonie, Klappenerkrankungen, Arrhythmien, Kardiomyopathien, angeborene Herzerkrankungen, Infektionen, medikamentöse Schädigung, infiltrative Ursachen (z.B. Amyloidose), Speichererkrankungen (z.B. Hämochromatose oder Morbus Fabry), endomyokardiale Krankheiten (z.B. Radiotherapie), perikardiale Ursachen (z.B. Kalzifikationen), metabolische Erkrankungen und neuromuskuläre Erkrankungen (z.B. Friedreich-Ataxie oder Muskeldystrophien) [1].

Eine Vielzahl von Studien hat sich mit den Risikofaktoren für die Entstehung von HI beschäftigt [16-21]. Die wichtigsten Risikofaktoren für HI, die wiederholt in Untersuchungen identifiziert werden konnten, sind Hypertension, Koronare Herzerkrankung, Diabetes mellitus, Übergewicht, Rauchen, geringe körperliche Aktivität, Herzklappenerkrankungen, Arrhythmien (einschließlich Vorhofflimmern) und renale Dysfunktion (bzw. erhöhte Serumkreatininkonzentration). Darüber hinaus gelten männliches Geschlecht und niedriger sozioökonomischer Status als Risikofaktoren. Ein Einfluss von Migrationshintergrund und Herkunftsland auf die Entstehung von HI ist vereinzelt beschrieben worden [22]. Da eine Reihe der genannten Risikofaktoren aktiv beeinflussbar ist, kommt klinisch gesehen der Prävention eine zunehmend große Rolle zu [23, 24]. Interessanterweise wird in vielen Arbeiten die Anämie nicht als klassischer Risikofaktor für die Entstehung von HI aufgeführt, obwohl sich Hinweise darauf finden, dass Anämie das Risiko für eine Erkrankung an HI erhöht (siehe Kapitel 1.3).

1.1.5 Pathomechanismus

Die genannten Risikofaktoren und Grunderkrankungen führen zu einem komplexen pathogenetischen Prozess, welcher die Grundlage für die Entstehung der HI darstellt. Dieser Pathomechanismus ist unter anderem gekennzeichnet durch inflammatorische Prozesse [25, 26], Zelltod, Fibrose [27], neurohumorale Veränderungen [28], veränderte Genexpression [29], veränderte Signalwege [30], Alterationen im Calciumhaushalt [31], erhöhten oxidativen Stress [32] und mitochondriale Dysfunktion [33-35]. Diese Prozesse greifen

ineinander, begünstigen sich gegenseitig und resultieren in einer chronisch progressiven Veränderung der myokardialen Struktur. Diese chronisch-progressive Veränderung wird als pathologisches *remodeling* bezeichnet [36] und stellt eine fundamentale Charakteristik in der Entstehung der HI dar.

1.2 Anämie

1.2.1 Definition

Anämie bezeichnet einen Mangel des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin (Hb) im Blut, aus welchem die Unfähigkeit resultiert, ausreichende Mengen an Sauerstoff aus der Lunge über den Weg des Blutes in die verschiedenen Gewebe des Körpers wie Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur und Verdauungstrakt zu transportieren. Von der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*; WHO) wird Anämie definiert als Hb-Konzentration $< 13 \text{ g / dl}$ für Erwachsene männlichen Geschlechts und als Hb-Konzentration $< 12 \text{ g / dl}$ für nichtschwangere Erwachsene weiblichen Geschlechts [37]. Diese von der WHO definierten Grenzwerte stellen trotz gewisser Debatten die in epidemiologischen Studien am häufigsten genutzte Definition dar [38] und auch in den Leitlinien der ESC wird auf diese Definition verwiesen [1].

1.2.2 Epidemiologie und Ursachen

Mit einer Prävalenz von geschätzten 1,8 Milliarden Betroffenen weltweit stellt die Anämie eine große Herausforderung in der globalen Gesundheitsversorgung dar [39]. Dabei kommt es weltweit zu deutlichen topographischen Unterschieden in der Prävalenz. Grundsätzlich tritt Anämie in Entwicklungsländern deutlich häufiger auf als in Industrieländern [40, 41]. Da Anämie keine eigene Krankheit ist, sondern vielmehr Ausdruck einer zugrundeliegenden Erkrankung [42], begründen sich die weltweiten Unterschiede in der Prävalenz der Anämie vermutlich in der unterschiedlichen Prävalenz der jeweiligen Grunderkrankungen in den verschiedenen Ländern. Aufgrund dieser Unterschiede werden im Folgenden Entwicklungsländer und Industrieländer getrennt voneinander betrachtet.

Entwicklungsländer sind im Allgemeinen stärker als Industrieländer von Anämie betroffen, wobei es auch hier regionale Unterschiede gibt. Im Rahmen der *Global Burden of Disease Study* wurde geschätzt, dass Südasien mit einer Prävalenz von ca. 42 % der Gesamtbevölkerung, der westliche Teil Subsahara-Afrikas mit ca. 41 % und der zentrale Teil Subsahara-Afrikas mit ca. 37 % der Gesamtbevölkerung die Regionen mit der weltweit höchsten Anämieprävalenz sind [43]. Dabei zeigt sich insgesamt eine Assoziation von Anämie mit sozioökonomischem Status [44]. Die bei weitem häufigste Ursache für Anämie in Entwicklungsländern stellt Eisenmangel dar, welcher v.a. Kinder und Frauen im gebärfähigen Alter betrifft [41]. Zur hohen Prävalenz des Eisenmangels in Entwicklungsländern tragen neben Mangelernährung mit einer geringen Verfügbarkeit eisenhaltiger Lebensmittel möglicherweise auch schlechte Hygiene und mangelnder Zugang zu sicherem Trinkwasser bei [45]. Hinzu kommen infektiöse Ursachen wie Hakenwürmer, Schistosomen, Trichuris, Malaria und humanes Immundefizienz-Virus (HIV), welche über

Blutverlust einerseits und chronische Inflammation andererseits zur Aggravation von Eisenmangelanämie beitragen [46]. Während Blutverlust direkt zu einem Verlust von Eisen führt, bedingen chronische Inflammationen eine geringere Bioverfügbarkeit körpereigenen Eisens (ggf. trotz ausreichender Eisenreserven), was in Abgrenzung zum klassischen Eisenmangel auch als „funktioneller Eisenmangel“ bezeichnet wird [47]. Ein zusätzlicher Grund für die hohe Prävalenz von Eisenmangel könnte die im Vergleich zu Industrieländern höhere Geburtenrate pro Frau sein. Dies äußert sich im zwei- bis dreimal so häufigen Auftreten von Eisenmangel bei Schwangerschaft in Entwicklungsländern verglichen mit Industrieländern [45, 46]. Abgesehen von Eisenmangel stellen genetische Erkrankungen wie Sichelzellanämie [48-50] oder Thalassämie [51-53] seltenere Ursachen für Anämie in Entwicklungsländern dar.

Industrieländer sind insgesamt weniger von Anämie betroffen. Laut der *Global Burden of Disease Study* sind in Westeuropa ca. 5%, in Australasien ca. 7% und im einkommensstarken Teil Nordamerikas ca. 7% der Gesamtbevölkerung von Anämie betroffen [43]. Ursächlich kann wie in Entwicklungsländern auch ein Eisenmangel sein, wovon auch hier vor allem Kinder und junge Frauen betroffen sind [54]. Davon abgesehen ist es sinnvoll, hier eine weitere Bevölkerungsgruppe hervorzuheben: Ältere Menschen, welche aufgrund der zunehmenden Alterung in westlichen Ländern eine wachsende Population darstellen, die ebenfalls häufig von Anämie betroffen ist. Ab einem Alter von 50 Jahren nimmt die Prävalenz von Anämie kontinuierlich zu und liegt in der Alterskohorte von mindestens 85 Jahren bei über 20 % [38]. In Seniorenheimen wird die Prävalenz von Anämie auf 50 % geschätzt und ist unabhängig von anderen Risikofaktoren mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert [55-58]. Schätzungen gehen davon aus, dass mit jedem Punkt, den die Hb-Konzentration in g / dl abnimmt, das Risiko für Gebrechlichkeit um ca. 14 % ansteigt [59]. Die zugrundeliegenden Ursachen für Anämie unterscheiden sich in dieser Population von denen in Kindern und jungen Frauen: es wird davon ausgegangen, dass in älteren Patienten nur etwa ein Drittel der Anämien durch defizitäre Ernährung (einschließlich Eisen, Folsäure und Vitamin B₁₂) bedingt wird. Ein weiteres Drittel wird bedingt durch chronische Erkrankungen einschl. chronischer Nierenerkrankungen. Das letzte Drittel wird von Anämien unklarer Ursache gebildet [60, 61]. Diese chronischen Erkrankungen können ebenfalls als Form funktionellen Eisenmangels angesehen werden, sind im Gegensatz zu den in Entwicklungsländern beobachteten Anämien jedoch häufig nichtinfektiöser Art und schließen neben anderen chronischen Erkrankungen wie Krebserkrankungen [62] die HI mit ein, eine typische Erkrankung des älteren Patienten, welche eine häufige Komorbidität der Anämie darstellt.

1.3 Anämie als Komorbidität der Herzinsuffizienz

Anämie ist eine häufige Komorbidität von HI. Ein systematisches *Review* aus dem Jahr 2024 kam zu dem Ergebnis, dass etwa jeder zweite Patient mit HI gleichzeitig an einer Anämie als Komorbidität leidet [63]. Dabei erhöht das gleichzeitige Vorliegen von Anämie in HI-Patienten Morbidität und Mortalität gegenüber solchen, die lediglich eine HI ohne begleitende Anämie aufweisen [64-70]. Es wird angenommen, dass mit jedem Punkt, den die Hb-Konzentration in g / dl abnimmt, die Mortalität um etwa 16 % ansteigt [71]. Diese Rolle von Anämie als Prädiktor für eine schlechte Prognose zeigt sich in bisherigen Studien

nicht nur in chronischer, sondern auch in akuter HI [72], und scheint sowohl in systolischer als auch in diastolischer HI aufzutreten [68].

Anämie kann nicht nur eine bestehende HI aggravieren, es haben sich auch Hinweise darauf gezeigt, dass Anämie das Risiko für das Neuauftreten einer HI erhöht [73], was sich durch eine gesteigerte Leistungsanforderung an das Herz bei Anämie erklären ließe. Diese These wird dadurch unterstützt, dass starke Anämie in Entwicklungsländern bereits als häufige Ursache für HI vorbeschrieben ist [74] und mittels Mendel'scher Randomisierung Hinweise auf eine bidirektional gerichtete Kausalität zwischen HI und Anämie gefunden wurde [75].

Bei der Betrachtung von HI und Anämie als Komorbiditäten ist stets zu beachten, dass beide Erkrankungen sehr ähnliche klinische Symptome verursachen können: Als häufigste Symptome werden der Anämie u.a. generalisierte Schwäche, Fatigue, Dyspnoe, Benommenheit (*light headedness*), Beinahe-Synkopen und verringerte körperliche Belastbarkeit zugeschrieben [76, 77]. Viele dieser Symptome sind ebenfalls typisch für HI, sodass eine genaue Zuschreibung, welche der beiden Erkrankungen für im Einzelfall vorliegende Symptome verantwortlich ist, nicht immer eindeutig möglich ist. Eine Studie an zwei Kohorten aus Norddeutschland mit insgesamt knapp 6.000 Patienten kam im Jahr 2023 zu dem Ergebnis, dass die Symptome Fatigue, Konzentrationsschwäche, Dyspnoe und Schwäche, welche als Symptome einer Anämie gelten, weniger mit Anämie als mit HI und anderen Erkrankungen wie Depression, chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und Asthma bronchiale assoziiert waren [78]. Darüber hinaus ist HI in der Vergangenheit selbst als „Symptom“ einer Anämie bezeichnet worden [79]. Diese große symptomatische Überschneidung zwischen HI und Anämie, auf welche auch in der Leitlinie der ESC hingewiesen wird [1], unterstreicht die Notwendigkeit, Anämie in HI zu erkennen, da sie die Symptome der HI aggravieren und zur geringen Lebensqualität der Betroffenen beitragen kann [80].

Obwohl sich in Zusammenschau dieser Evidenz einige Hinweise darauf zeigen, dass Anämie die Entstehung und progressive Verschlechterung von HI vorantreiben kann, sind Ausmaß und zugrundeliegender Mechanismus dieses scheinbar schädlichen Einflusses nicht abschließend geklärt.

1.4 Energiestoffwechsel des humanen Myokards

1.4.1 Grundlagen des Energiestoffwechsels

Zur Ausübung ihrer Funktionen bedürfen Zellen Energie, welche sie aus der Verbrennung von Substraten gewinnen (Abb. 1). Die beiden wichtigsten Substrate sind Fettsäuren und Glucose [81]. Diese werden nach der Aufnahme aus der Nahrung über das Blut zu den verschiedenen Organen des Körpers, einschließlich des Herzens, transportiert, und dort unter Verbrauch von Sauerstoff oxidiert. Der in der Lunge aufgenommene Sauerstoff erreicht die Organe ebenfalls über das Blut. Der Transport erfolgt dabei hauptsächlich über die Bindung an den roten Blutfarbstoff Hämoglobin, sodass die Menge an Hämoglobin im Blut ausschlaggebend ist für die Menge an Sauerstoff, welche mit dem Blut transportiert werden kann [82]. In der Zelle wird die Glucose über den Weg der Glucolyse und Fettsäuren über den Weg der β -Oxidation zunächst zu Acetyl-Coenzym A umgesetzt, welches anschließend

in den Citratzyklus eingeschleust wird. Neben diesen beiden Hauptstoffwechselwegen können außerdem noch Protein, Laktat und Ketonkörper zur Energiegewinnung genutzt werden. In allen Fällen wird den als Substrat dienenden Kohlenwasserstoffen schrittweise Wasserstoff entzogen, bis sie schließlich über die Zwischenstufe von Carboxylgruppen vollständig zu CO₂ oxidiert werden [83]. Der anfallende Wasserstoff hingegen wird auf die beiden als Cofaktoren dienenden Dinukleotide Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) übertragen und mithilfe der Atmungskettenkomplexe auf Sauerstoffmoleküle transferiert, mit denen er zum Produkt Wasser reagiert [84]. Gleichzeitig wird Adenosintriphosphat (ATP) durch Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) hergestellt. Diese Phosphorylierung ist energetisch an die oben beschriebene Oxidation gekoppelt, sodass auch von oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) gesprochen wird [85]. ATP enthält energiereiche Phosphorsäureanhydridbindungen, deren Hydrolyse wieder Energie freisetzt und damit als „universelle Energiewährung des Lebens“ zum Antrieb zahlreicher energieaufwändiger Prozesse wie Biosynthese, Zellhomöostase und Muskelkontraktion verwendet wird [86, 87]. Davon abgesehen spielt ATP eine wichtige Rolle in der Regulation von Signalwegen [88] und trägt maßgeblich zur Löslichkeit von Proteinen im Zytoplasma bei [89, 90].

Die OXPHOS erfolgt in den Mitochondrien. Die Mitochondrien sind Zellorganellen, die vermutlich im Rahmen endosymbiotischer Prozesse zwischen Bakterien und Archaea vor ca. 1 – 2 Milliarden Jahren entstanden [91]. Es wird geschätzt, dass diese Endosymbiose den neu entstehenden Organismen durch die Aufnahme mitochondrialer Gene eine ca. 200.000-fache Vergrößerung ihres Genoms ermöglichte und damit einen großen evolutionären Vorteil darstellte [92].

Die wichtigsten Aufgaben der Mitochondrien in komplexen Organismen sind OXPHOS, Calciumhomöostase, Steuerung des programmierten Zelltodes (Apoptose), der Autophagie [93] und der Stammzellentwicklung [94], ebenso wie Biosynthese, Aufgaben im Harnstoffzyklus [95] und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) [96-98], welche bei physiologischem Level wichtige Signalfunktionen im Rahmen der Regulation der Zellfunktion spielen [99-101]. Als Ort der OXPHOS stellen die Mitochondrien den primären Ort der zellulären Energiebereitstellung dar [102]. Dies erfolgt über die Komplexe der Atmungskette, welche in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Zugrundeliegendes Prinzip ist die chemiosmotische Kopplung [103, 104], bei welcher der Fluss von Elektronen von NADH und FADH₂ über die Atmungskettenkomplexe I bis V an die Beförderung von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gekoppelt ist. In der Folge kommt es zum Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran, welcher die Phosphorylierung von ADP zu ATP antreibt. Im Folgenden wird dieser Prozess nun genauer beschrieben: Elektronen aus dem Cofaktor NADH werden über Komplex I und aus dem Cofaktor FADH₂ über Komplex II in die Atmungskette eingespeist. Über Ubichinon (bezeichnet als *Q-Junction*) werden Elektronen weiter auf Komplex III und von dort aus über Cytochrom c auf Komplex IV weitergeleitet, welcher die Elektronen schließlich auf in der Matrix befindlichen elementaren Sauerstoff überträgt, wodurch H₂O entsteht. Die Komplexe I, III und IV pumpen im Laufe dieser Redox-Reaktionen Protonen in den Intermembranraum, sodass es zum Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran

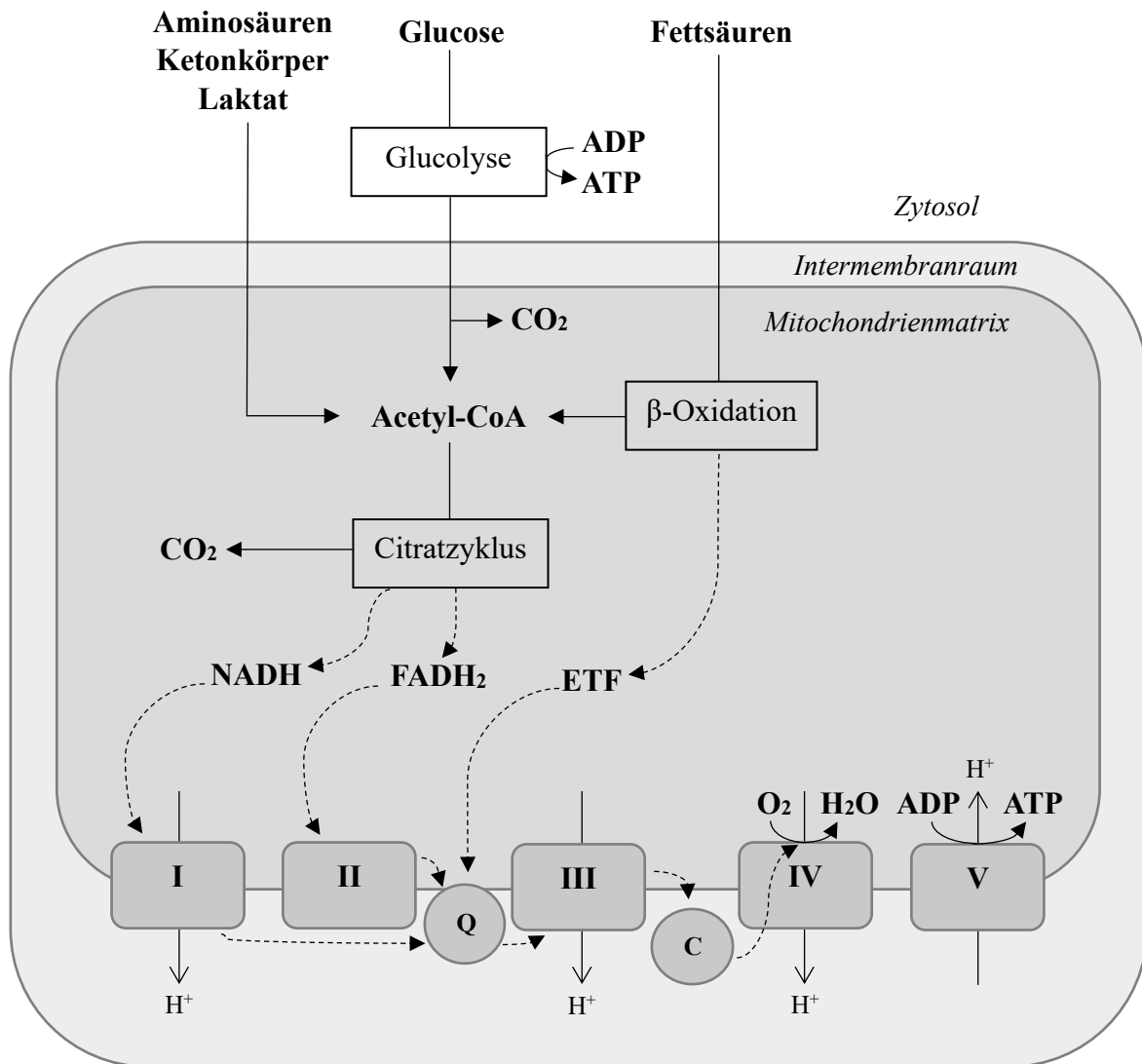


Abb. 1: Energiemetabolismus in Kardiomyozyten. Glucose und Fettsäuren dienen als Hauptsubstrate und werden neben den quantitativ weniger bedeutsamen Substraten (Aminosäuren, Ketonkörper und Laktat) aus dem Blut in den Kardiomyozyten aufgenommen. Die Substrate werden zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) umgesetzt, indem Fettsäuren die in der Mitochondrienmatrix stattfindende β-Oxidation und Glucose die im Zytosol stattfindende Glucolyse durchlaufen. Im Rahmen der Glucolyse wird in geringem Maße Adenosindiphosphat (ADP) unter Zunahme freier Phosphatanionen zu Adenosintriphosphat (ATP) phosphoryliert. Im nächsten Schritt wird Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust, in welchem die vollständige Oxidation zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) stattfindet. Die im Rahmen der Oxidation freiwerdenden Elektronen werden auf frei lösliches Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) und enzymgebundenes Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) übertragen, welche zu NADH und FADH₂ reduziert werden. Die Elektronenübertragung ist durch gestrichelte Pfeile dargestellt. NADH und FADH₂ übertragen ihrerseits die Elektronen weiter auf die Atmungskettenkomplexe I und II, welche in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Die Komplexe I und II reduzieren ihrerseits das membranständige mobile Ubichinon (Q) zu Ubichinol. Darüber hinaus wird Ubichinon FAD-abhängig durch das elektronentransferierende Flavoprotein (ETF) mit Elektronen aus der β-Oxidation reduziert. Ubichinol wiederum reduziert Atmungskettenkomplex III. Dieser reduziert über das im Intermembranraum befindliche Cytochrom c (C) den Atmungskettenkomplex IV, welcher die Elektronen schließlich auf molekularen Sauerstoff (O₂) überträgt, der unter Zunahme von Protonen zu Wasser (H₂O) reagiert. Die Komplexe I, III und IV pumpen im Rahmen dieses Vorgangs Protonen (H⁺) aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum, sodass ein Protonengradient aufgebaut wird. Die in diesem Gradienten gespeicherte Energie wird vom Atmungskettenkomplex V (ATP-Synthase) genutzt, um unter Rückschleusung von Protonen in die Matrix die Phosphorylierung von ADP zu ATP anzutreiben. Eigene Darstellung in Anlehnung an verschiedene Quellen [83, 85, 105].

kommt. Den letzten Atmungskettenkomplex (V) stellt die ATP-Synthase dar, welche Protonen aus dem Intermembranraum zurück in die Matrix schleust. Die beim Abbau des Protonengradienten freigesetzte Energie wird genutzt, um ADP zu ATP zu phosphorylieren [83].

1.4.2 Energiestoffwechsel im gesunden Myokard

Das Herz wird allgemein als das Organ mit dem höchsten Energieumsatz pro Gewicht betrachtet [106]. Ein Grund dafür könnte die hohe mechanische Arbeit des Herzens sein, das im Leben eines Menschen im Durchschnitt ca. 3 Milliarden mal schlägt [107]. Dafür müssen große Mengen Energie u.a. für den Ablauf des Querbrückenzyklus bereitgestellt werden [108]. Der hohe Energieumsatz des Herzens zeigt sich gegenüber anderen Organen in einer sehr hohen Mitochondriendichte: ca. 25 % des Zellvolumens in myokardialen Zellen besteht aus Mitochondrien, was die Mitochondriendichte aller anderen Organe im menschlichen Körper übersteigt [109]. Darüber hinaus weisen die myokardialen Mitochondrien eine hohe Zahl an Cristae, Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran, auf [110], was auf eine hohe Leistung der in der inneren Membran lokalisierten Atmungskettenkomplexe hinweisen dürfte. Trotz seines enormen Energiebedarfes von 30 kg ATP pro Tag [111] besitzt das Herz keine großen Energiespeicher, sodass es seinen gesamten ATP-Speicher alle 10 Sekunden einmal umwälzt [112]. Daraus folgt, dass das Herz bei einem Erliegen der ATP-Produktion nur etwa 12 Schläge lang weiterschlagen könnte [113]. Aus diesem Grund ist das Herz neben der einwandfreien Funktion des Energiemetabolismus auch auf eine ständige Versorgung mit Substraten und Sauerstoff angewiesen, wodurch sich die hohe Empfindlichkeit des Herzens gegenüber Durchblutungsstörungen erklärt, wie sie sich etwa an Myokardinfarkten zeigt.

Um kontinuierlich neues ATP generieren zu können, ist das Herz in der Lage, eine Vielzahl an Substraten zu verwenden und wurde in diesem Zusammenhang bereits als „Allesfresser“ bezeichnet [112]. Dabei besitzt es die Fähigkeit, dynamisch zwischen der Verwertung verschiedener Substrate zu wechseln, je nachdem, wie die individuelle Ernährung und Stoffwechsellage des einzelnen Menschen es vorgeben. Diese hohe metabolische Flexibilität unterscheidet das Herz von anderen Organen wie etwa dem Gehirn [114]. Gleichzeitig erschwert die hohe Flexibilität des Herzens die Angabe allgemeingültiger Aussagen zur Substratverwertung. Ein Konsens herrscht jedoch darüber, dass Fettsäuren die wichtigste Energiequelle für das Myokard darstellen (ca. 40 – 60 % der ATP-Produktion), gefolgt von Glucose (ca. 20 – 40 %). Der restliche Energiebedarf wird u.a. durch Ketonkörper (ca. 10 – 12 %) und Proteine (ca. 1 – 2 %), sowie Laktat gedeckt [106, 115]. Interessanterweise werden von der Gesamtmenge an produziertem ATP im gesunden Herzen 95 % in den Mitochondrien und nur 5 % durch Glucolyse im Zytosol gewonnen, was den Stellenwert oxidativer Energiegewinnung unter physiologischen Bedingungen und die große Abhängigkeit des Herzens von Sauerstoff weiter unterstreicht.

1.4.3 Energiestoffwechsel des Myokards bei Herzinsuffizienz

Eine mitochondriale Einschränkung wurde bereits an einer Vielzahl an Erkrankungen nachgewiesen [116-121]. Auch in der Entstehung einer HI spielt die Dysfunktion myokardialer Mitochondrien eine zentrale Rolle, insbesondere das resultierende kardiale Energiedefizit, was auch als „*energy depletion hypothesis*“ bezeichnet wird [122]. Bisherige

Arbeiten an humanen Endomyokardbiopsien (EMB) konnten zeigen, dass die myokardiale mitochondriale oxidative Kapazität bei Menschen mit HI gegenüber Menschen ohne HI reduziert ist [105, 123]. In weiteren Studien, welche hochauflösende Respirometrie (*high resolution respirometry*; HRR) nicht an kathetergestützten EMBs, sondern an humanem Myokard aus herzchirurgischen Operationen anwendeten, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die oxidative Kapazität im menschlichen Myokard bereits früh bei kardialen Erkrankungen vor dem klinischen Auftreten einer HI im Vergleich zu gesunden Herzen verringert ist [124].

Neben einer eingeschränkten mitochondrialen Funktion kommt es bei HI zu weiteren Veränderungen im Energiestoffwechsel. Das Herz verliert seine Flexibilität, verschiedene Substrate zu verwenden, wobei der Anteil an Fettsäuren an der ATP-Gewinnung gegenüber dem Anteil von Glucose reduziert wird [125]. Dabei erfolgt die Verschiebung von mitochondrialer ATP-Generation hin zu nicht sauerstoffabhängiger ATP-Gewinnung durch zytosolische Glucolyse, welche von der mitochondrialen Glucoseoxidation entkoppelt wird [113, 126, 127]. Diese verhältnismäßige Hochregulation der extramitochondrialen Energiebereitstellung durch zytosolische Glucolyse stellt möglicherweise eine Antwort im Sinne eines Kompensationsmechanismus auf die eingeschränkte mitochondriale Funktion dar. Da die anaerobe Glucolyse verglichen mit dem mitochondrialen Energiestoffwechsel jedoch nur etwa ein Zehntel der Menge an ATP pro Molekül Glucose liefert [128], kann das kardiale Energiedefizit durch diese Anpassung nicht vollständig kompensiert werden. Die Rolle anderer Energieträger wie Ketonkörper oder Aminosäuren ist im Zusammenhang dieser energetischen Veränderungen noch weitgehend unklar, stößt jedoch in der Forschung auf zunehmendes Interesse [129].

Bei der Betrachtung von Veränderungen im myokardialen Energiestoffwechsel bei HI ist stets zu beachten, dass Komorbiditäten einen wichtigen Einfluss nehmen: Ein Diabetes mellitus verringert die Aufnahme von Glucose in die Zelle [109, 126, 130, 131] und wirkt damit der Hochregulation der Energiebereitstellung aus Glucose entgegen. Die gegenseitige Hemmung von Glucose und Fettsäuren als Substrate wird nach ihrem Erstbeschreiber als *Randle cycle* bezeichnet [132]. Ähnlich wie Diabetes mellitus scheint auch myokardiale Ischämie den Abbau von Fettsäure gegenüber Glucose zu begünstigen [113, 133-135]. Dies erscheint kontraintuitiv, da bei der Fettsäureoxidation mehr Sauerstoff pro gebildetem ATP-Molekül benötigt wird als bei der Glucoseoxidation [136, 137]. Da die Energiegewinnung aus Fettsäuren jedoch in hohem Maße von der Funktion der Mitochondrien abhängt, welche bei HI eingeschränkt ist, trägt eine vermehrte Aufnahme von Fettsäuren nicht zur Besserung der Energieversorgung bei HI bei, und kann diese, da die Aufnahme von Glucose über den *Randle cycle* gehemmt wird, sogar verschlechtern.

Eine weitere häufige Komorbidität von HI ist Anämie. Der Einfluss von Anämie auf den myokardialen Mitochondrienstoffwechsel ist bisher nur wenig erforscht. Eine Studie von Maeder et al. [138] fand eine Assoziation zwischen Anämie und verringerter Transferrinsättigung in Menschen mit HI, was auf eine verringerte systemische Verfügbarkeit von Eisen bei Anämie in Menschen mit HI hindeutet. Darüber hinaus konnte die Studie einen verringerten myokardialen Eisengehalt in Menschen mit HI verglichen zu Menschen ohne HI nachweisen. Melenovsky et al. [139] konnten dieses Ergebnis in einer größeren Kohorte bestätigen und kamen darüber hinaus zu dem Ergebnis, dass in Menschen mit HI ein myokardialer Eisenmangel mit stärkerer Koronarer Herzerkrankung, verringerter Aktivität von Aconitase und Citratsynthase, sowie verringerter Expression von Katalase,

Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase 2 bei erhaltener Aktivität der Atmungskettenkomplexe assoziiert ist. Ein direkter Einfluss von Anämie auf die myokardiale Mitochondrienfunktion ist bisher allerdings noch nicht untersucht worden und könnte einen wichtigen Schritt in der Aufklärung der Pathogenese von HI darstellen.

1.4.4 Grundlagen der Respirometrie

Eine der am häufigsten angewendeten Methode zur Quantifizierung des mitochondrialen Stoffwechsels ist die Respirometrie. Diese basiert auf dem Grundprinzip, dass Mitochondrien im Rahmen der OXPHOS Sauerstoff verbrauchen. In einer geschlossenen Kammer wird die Sauerstoffkonzentration über einen polarographischen Sauerstoffsensor (*polarographic oxygen sensor*; POS) gemessen [140-143]. Anschließend wird anhand der Veränderung der Sauerstoffkonzentration im Medium die Sauerstoffverbrauchsrate berechnet. Dieser Sauerstoffverbrauch errechnet sich zunächst aus der über die Zeit gemessenen Sauerstoffkonzentration in Form einer negativen Ableitung als O_2 -Slope. Nach Normierung auf das Probengewicht bzw. die Zellzahl erhält man den O_2 -Flux. Wird dieser um den Sauerstoffverbrauch des POS selbst (*instrumental background correction*) sowie den Sauerstoffverbrauch der extramitochondrialen Zellstrukturen (residualer Sauerstoffkonsum; *residual oxygen consumption*; ROX) korrigiert, so bleibt der Theorie nach allein der mitochondriale Sauerstoffverbrauch übrig.

Im Laufe der HRR wird die Probe verschiedenen Substraten, Entkopplern und Inhibitoren einzelner Atmungskettenkomplexe ausgesetzt, was als *Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration*- (SUIT-) Protokoll bezeichnet wird [144]. Auf diese Weise lassen sich verschiedene Respirationsstadien messen, da die oxidative Aktivität der Mitochondrien je nach Substratangebot, Zahl der aktiven Atmungskettenkomplexe und Kopplungszustand variiert. Physiologisch sind die Atmungskettenkomplexe I bis IV über den Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran an die ATP-Synthase gekoppelt. Dies lässt sich jedoch über Entkoppler wie Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy)phenylhydrazon (FCCP) ändern. FCCP transportiert Protonen über die innere Mitochondrienmembran und hebt somit den über die Atmungskette aufgebauten Protonengradienten auf. Bei der Titration von FCCP sollte vorsichtig vorgegangen werden, da es bei größeren Konzentrationen zu erheblichen Schäden an den Mitochondrien kommen kann [145].

Prinzipiell lässt sich Respirometrie mit isolierten Mitochondrien, intakten Zellen oder permeabilisierten Zellen durchführen [143, 146]. Da jedoch die Respiration maßgeblich von den in der Zelle vorhandenen Substratkonzentrationen abhängig ist und die Zellmembran für viele Substrate nur semi- oder impermeabel ist, ist eine Messung maximaler Kapazitäten in intakten Zellen praktisch nicht möglich. Aus diesem Grund wird in der Regel entweder mit permeabilisierten Zellen oder isolierten Mitochondrien gearbeitet. Dabei bieten permeabilisierte Zellen gegenüber isolierten Mitochondrien einige Vorteile: zunächst wird eine natürliche zelluläre Umgebung aufrechterhalten, sodass die Interaktion mit anderen zellulären Bestandteilen weiterhin möglich bleibt [145, 147] und diese Methode im Allgemeinen als die dem physiologischen Zustand nähere gilt [148, 149]. Darüber hinaus bleibt die mitochondriale Morphologie besser erhalten [150], es gehen dabei keine Mitochondrien verloren und es kommt zu geringeren strukturellen Schäden an Mitochondrien [151, 152]. Zuletzt wird für die Isolierung von Mitochondrien mehr Probenmaterial benötigt, was die Anwendbarkeit dieser Methode bei eingeschränkter

Probenverfügbarkeit limitieren kann. Ein möglicher Nachteil bei der Verwendung permeabilisierter Zellen liegt allerdings in der möglichen interpersonellen Variabilität bei der manuellen mechanischen Separierung der Muskelfasern [151]. Insgesamt hat sich die Verwendung permeabilisierter Muskelfasern auch speziell für die HRR in Myokardproben als effektive Methode erwiesen [123, 124, 146, 153-158].

Die Respiration von Zellen und Geweben hängt wie oben beschrieben stark von äußeren Rahmenbedingungen wie der Verfügbarkeit von Substraten ab. Aus diesem Grund werden in der Respirometrie vordefinierte Rahmenbedingungen hergestellt, die als Stadien bezeichnet werden. Diese Stadien sollen Experimente untereinander vergleichbar machen.

Historisch wurden häufig die von B. Chance und G. R. Williams definierten Stadien genutzt [159-165]. Heutzutage ist demgegenüber eine überarbeitete Nomenklatur geläufig, die nur für isolierte Mitochondrien und permeabilisierte Zellen verwendet wird und welche sich u.a. am Kopplungszustand des Systems orientiert [166]: Die oxidative Phosphorylierungs-Kapazität (OXPHOS-Kapazität; P) entspricht der maximalen Respiration nach Substratzugabe im gekoppelten System, d.h. in einem System, in dem der Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran möglich ist, und somit die Aktivität der Atmungskettenkomplexe an die Synthese von ATP gekoppelt ist. Dabei ist anzumerken, dass die Auswahl der verwendeten Substrate je nach Organpräferenz im Experiment angepasst wird; bei Verwendung von Herzmuskelgewebe etwa ist u.a. die Verwendung von Fettsäuren geläufig. Nach Hemmung der ATP-Synthase durch Substanzen wie Oligomycin lässt sich die mitochondriale Respiration messen, die durch den Protonenrückstrom durch die Membran (englisch: *leak*) an der ATP-Synthase vorbei zustande kommt [83], und welche somit in vivo nicht zur ATP-Synthese beiträgt. Dieser Marker für die Integrität der inneren Mitochondrienmembran wird als LEAK-Respiration (L) bezeichnet. Nach Zugabe eines Entkopplers wie FCCP lässt sich die maximal erreichbare Respiration im entkoppelten Zustand messen. Dieses Respirationsstadium wird als *Electron-Transfer-System*-Kapazität (ETS-Kapazität; E) bezeichnet, da die Respiration in diesem Stadium komplett von der Phosphorylierung von ADP zu ATP durch die ATP-Synthase entkoppelt ist. Geläufig ist darüber hinaus die Berechnung von Quotienten aus den genannten Stadien, insbesondere die *respiratory control ratio* (RCR) und die *LEAK control ratio* (LCR), welche folgendermaßen berechnet werden:

$$(1) \quad RCR = P / L$$

$$(2) \quad LCR = L / E$$

Da diese Quotienten keine absoluten, sondern relative Angaben sind, gelten sie im Allgemeinen als weniger anfällig gegenüber Messunterschieden zwischen Experimentatoren und werden häufig als Marker für die mitochondriale Kopplungseffizienz herangezogen [167].

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Assoziation zwischen Anämie und der mitochondrialen Funktion im humanen Ventrikelmyokard zu untersuchen.

Konkret sollten folgende Hypothesen im Rahmen der Arbeit überprüft werden:

- I. Bei Menschen ohne HI ist Anämie mit einer verringerten mitochondrialen oxidativen Kapazität und Kopplungseffizienz im Myokard assoziiert.
- II. Bei Menschen mit nichtischämisch bedingter HI ist Anämie mit einer verringerten mitochondrialen oxidativen Kapazität und Kopplungseffizienz im Myokard assoziiert.
- III. Bei Menschen mit terminaler ischämisch bedingter HI ist Anämie mit einer verringerten mitochondrialen oxidativen Kapazität und Kopplungseffizienz, sowie einem verringerten Mitochondriengehalt im Myokard assoziiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden findet sich eine Auflistung aller im Rahmen der Arbeit verwendeten Materialien, aufgeteilt in Chemikalien, Kits, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software. Alle Einträge beinhalten neben dem Produktnamen zusätzlich den Namen der herstellenden Firma, den Ort ihrer Niederlassung und, sofern vorhanden, die Angabe einer Katalognummer (Kat.-Nr.).

2.1.1 Chemikalien

- *Adenosin-5'-diphosphat Monokaliumsalz Dihydrat*
(Kat.-Nr. A5285, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz Hydrat*
(Kat.-Nr. A2383, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Antimycin A aus Streptomyces sp.*
(Kat.-Nr. A8674, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Bovines Serumalbumin, minimum 98 %*
(Kat.-Nr. A7030, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Calciumcarbonat*
(Kat.-Nr. C4830, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy)phenylhydrazon (FCCP)*
(Kat.-Nr. C2920, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Cytochrom c aus Pferdeherz*
(Kat.-Nr. C7752, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
(Kat.-Nr. D8537, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Ethanol absolut $\geq 99,8 \%$*
(Kat.-Nr. 20821.330, *VWR International GmbH*, Darmstadt, Deutschland)
- *Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)*
(Kat.-Nr. E-4378, *Sigma chemical company*, St. Louis, USA)
- *L-Glutaminsäure Mononatriumsalz*
(Kat.-Nr. G1626, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)*
(Kat.-Nr. HN78.3, *Carl Roth GmbH & Co. KG*, Karlsruhe, Deutschland)

- *Imidazol*
(Kat.-Nr. 56750, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Kaliumdihydrogenphosphat*
(Kat.-Nr. 1.04873.1000, *Merck*, Darmstadt, Deutschland)
- *Kaliumhydroxid*
(Kat.-Nr. 1.05033.1000, *Merck*, Darmstadt, Deutschland)
- *Kreatinphosphat Dinatriumsalz Hydrat*
(Kat.-Nr. P7936, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Lactobionsäure*
(Kat.-Nr. 153516, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Magnesiumchlorid-Hexahydrat zur Analyse*
(Kat.-Nr. 1.05833.0250, *Merck*, Darmstadt, Deutschland)
- *L-(-)-Malonsäure*
(Kat.-Nr. M1000, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *2-Morpholino-ethansulfonsäuremonohydrat (MES-hydrat)*
(Kat.-Nr. 69890, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Natriumsuccinat dibasisch Hexahydrat*
(Kat.-Nr. S2378, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *(±)-Octanoylcarnitinchlorid*
(Kat.-Nr. 0605, *TOCRIS Bio-Techne GmbH*, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
- *Oligomycin aus Streptomyces diastatochromogenes*
(Kat.-Nr. O4876, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Rotenon*
(Kat.-Nr. R8875, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *D-Saccharose*
(Kat.-Nr. S1888, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Saponin*
(Kat.-Nr. 47036, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Taurin*
(Kat.-Nr. T8691, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)

2.1.2 Kits

- *Citrate Synthase Assay Kit*
(Kat.-Nr. CS0720, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- Zelllysereagens *CellLytic™ MT Cell Lysis Reagent*
(Kat.-Nr. C3228, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *Protease Inhibitor Cocktail*
(Kat.-Nr. P8340, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- *DC™ Protein Assay Kit* (Reagenzien A, B und S)
(Kat.-Nr. 5000113, 5000114 und 5000115, *Bio-Rad Laboratories, Inc.*, Hercules, USA)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- 6-Well-Platte *Cellstar 6 Well Cell Culture Plate, sterile, with lid*
(Kat.-Nr. 657 160, *Greiner Bio-One international GmbH*, Kremsmünster, Österreich)
- 96-Well-Platte *Greiner-CELLSTAR®-96-Well-Platten*
(Kat.-Nr. 6555180, M0812, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland)
- Aufziehkanüle *BDTM Blunt Fill Needle*
(Kat.-Nr. 303129, *Becton, Dickinson and Company*, Franklin Lakes, USA)
- Blutabnahmeröhrchen Serum, *BD Vacutainer®*
(Kat.-Nr. 366566, *Becton, Dickinson and Company*, Franklin Lakes, USA)
- Blutabnahmeröhrchen EDTA, *BD Vacutainer®*
(Kat.-Nr. 368499, *Becton, Dickinson and Company*, Franklin Lakes, USA)
- Blutabnahmeset *BD Vacutainer® Safety-Lok™ 21G (0,8 x 19 mm), 305 mm Schlauch, Luer Adapter*
(Kat.-Nr. 367286, *Becton, Dickinson and Company*, Franklin Lakes, USA)
- *Cardiobiopsiezange - nicht formbar*
(Kat.-Nr. EH1518.02-120, *H. + H. Maslanka GmbH*, Tuttlingen, Deutschland)
- Dosierpumpenspritze *Original-Perfusor®-Spritze 50 ml*
(Kat.-Nr. 8728852F-06, *B. Braun SE*, Melsungen, Deutschland)

- Glasfläschchen *Chromacol 300 µl Fixed insert vial, clear, snap cap*,
Thermo Fisher Scientific
(Kat.-Nr. 03-FIRV, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt, Deutschland)
- Katheterschleuse *Long Sheath Introducer*
(Kat.-Nr. 501-613A, *Cordis Corporation*, Miami Lakes, USA)
- Mikroreaktionsgefäße *Eppendorf Tubes Protein LoBind Tube 1,5 ml*
(Kat.-Nr. 022431081, *Eppendorf AG*, Hamburg, Deutschland)
- Pipette *Costar Stripette 5 ml*
(Kat.-Nr. 4487, *Corning Incorporated*, Glendale, USA)
- Pipettenspitzen *epT.I.P.S. Racks Biopur 500 – 2500 µl*
(Kat.-Nr. E4820CCB94932449, *Eppendorf AG*, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen *SurPhob Spitzen 1000 µl, farblos, steril*
(Kat.-Nr. VT0168, *Biozym Scientific GmbH*, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Pipettenspitzen *TipOne 10 / 20 µl*
(Kat.-Nr. S1110-3700, *Starlab Schweiz AG*, Affoltern am Albis, Schweiz)
- Pipettenspitzen *TipOne 1000 µl*
(Kat.-Nr. S1122-1830, *Starlab Schweiz AG*, Affoltern am Albis, Schweiz)
- Pipettenspitzen *TipOne 300 µl*
(Kat.-Nr. K131253O-2146, *Starlab Schweiz AG*, Affoltern am Albis, Schweiz)
- Rundfilter 595, *Schleicher & Schuell*, Durchmesser 55 mm
(Kat.-Nr. 311 607, *Hahnemühle FineArt GmbH*, Dassel, Deutschland)
- Sterile Skalpellschlingen
(*C. Bruno Bayha GmbH*, Tuttlingen, Deutschland)
- Vernichtungsbeutel 2 l, 300 x 200 mm, PP, transparent, ohne Druck
(Kat.-Nr. 86.1197, *Sarstedt AG & Co. KG*, Nümbrecht, Deutschland)
- Verschlusskappen *Chromacol 11 mm Snap cap silicone/PTFE Seal, Blue*
(Kat.-Nr. 11-PSN(B)-ST1, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt, Deutschland)
- Wägeschalen *Rotilabo, blau, antistatisch, 8 ml*
(Kat.-Nr. 2149.2, *Carl Roth GmbH & Co. KG*, Karlsruhe, Deutschland)
- Wägeschalen *Weigh Boat small blue antistatic*
(Kat.-Nr. HS120222, *Heathrow Scientific LLC*, Vernon Hills, USA)
- Zentrifugenröhrchen *Cellstar Tubes 50 ml, konischer Boden*
(Kat.-Nr. 227261, *Greiner Bio-One International GmbH*, Kremsmünster, Österreich)

2.1.4 Geräte

- Feinwaage *Sartorius A 120 S*
(Kat.-Nr. 014128, 50609650, *Sartorius AG*, Göttingen, Deutschland)
- Flockeneisbereiter *NordCap SPR-80*
(Kat.-Nr. 41320750600, *NordCap GmbH & Co. KG*, Bremen, Deutschland)
- Inkubator *Incubator Classic-Line*
(*BINDER GmbH*, Tuttlingen, Deutschland)
- Magnetrührer *RCT Basic IKA Labortechnik*
(*IKA-Werke GmbH & Co. KG*, Staufen, Deutschland)
- Mikroplattenleser *FLUOStar Omega Microplatereader*
(*BMG LABTECH GmbH*, Ortenberg, Deutschland)
- Oxygraph *O2k-FluoRespirometer*
(*Oroboros Instruments*, Innsbruck, Österreich)
- pH-Meter *Lab 870, Schott Instruments*
(*Schott AG*, Mainz, Deutschland)
- Pinzette *FST Mirror Finish Forceps, straight, Inox, 11 cm*
(Kat.-Nr. 11251-23, *Manufactures D'Outils Dumont SA*, Montignez, Schweiz)
- Pinzette *FST Student Dumont Forceps, gebogen, Inox, 11 cm*
(Kat.-Nr. 91197-00, *Manufactures D'Outils Dumont SA*, Montignez, Schweiz)
- Pipettierhilfe *Pipetus junior*
(Kat.-Nr. 9902000, *Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG*, Eberstadt, Deutschland)
- Pipette *Eppendorf Reference 0,5 - 10 µl*
(*Eppendorf AG*, Hamburg, Deutschland)
- Pipette *Eppendorf Reference 10 – 100 µl*
(*Eppendorf AG*, Hamburg, Deutschland)
- Pipette *Eppendorf Reference 100 – 1000 µl*
(*Eppendorf AG*, Hamburg, Deutschland)
- Pipette *Eppendorf Reference 500 – 2500 µl*
(*Eppendorf AG*, Hamburg, Deutschland)
- Reinstwassersystem *Milli-Q*
(*Merck*, Darmstadt, Deutschland)

- Taumelschüttler *Biometra WT12*
(*Analytik Jena GmbH & Co. KG*, Jena, Deutschland)
- Ultratiefkühlgerät -80 °C
(*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA)
- *Vortex-Mischer*
(Kat.-Nr. 444-1372, *VWR International GmbH*, Dietikon, Schweiz)
- *Wasserbad VWB 12*, 37 °C
(*VWR International GmbH*, Dietikon, Schweiz)
- Zentrifuge *HeraeusTM FrescoTM 17 Microcentrifuge*
(Kat.-Nr. 75002420, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA)

2.1.5 Software

- *DatLab*, Version 7.4.0.4
(*Oroboros Instruments*, Innsbruck, Österreich)
- *IBM SPSS Statistics*, Version 29.0.0.0
(*International Business Machines Corporation*, Armonk, USA)
- *Microsoft Office 365*
(*Microsoft Corporation*, Redmond, USA)
- *Overleaf*
(*Digital Science UK Unlimited*, London, UK)

2.2 Studiendesign

Zur Beantwortung der drei aufgestellten Hypothesen wurden im Zeitraum von Mai 2016 bis Oktober 2022 in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikum Düsseldorf Studienteilnehmer für die drei folgenden Kohorten rekrutiert:

1. Menschen, denen in der Vergangenheit im Rahmen einer Herztransplantation (HTX) ein Herz transplantiert worden war, und denen im Rahmen des regelmäßigen Screenings auf Abstoßungsreaktionen kathetergestützte EMBs entnommen wurden, und bei denen sich aktuell keine Abstoßungsreaktion gegen das implantierte Herz zeigte (definiert als histologisches *grading* > 0 gemäß der Einteilung der *International Society for Heart and Lung Transplantation* [168] oder LVEF < 50 %), um einen störenden Einfluss von Abstoßungen auf die Messung zu vermeiden [153] (Post-HTX-Kohorte).

2. Menschen mit nichtischämisch bedingter HI, denen aus diagnostischen Gründen kathetergestützte EMBs entnommen wurden (Nichtischämische-HI-Kohorte).
3. Menschen mit ischämisch bedingter terminaler HI, denen ein Linksventrikuläres Unterstützungssystem (*left ventricular assist device*; LVAD) implantiert wurde (Ischämische-HI-Kohorte).

Alle in die Studie eingeschlossenen Teilnehmer waren zwischen 20 und 85 Jahre alt. Ausgeschlossen wurden Menschen, auf die mindestens eines der folgenden Kriterien zutraf:

- Akute Infektionserkrankungen innerhalb der letzten zwei Wochen vor der Untersuchung
- Schwangerschaft
- Infektionen mit oder Risiko für Infektionen mit HIV, Hepatitis-B-Virus oder Hepatitis-C-Virus
- Einnahme von Alkohol oder sonstigen Rauschmitteln im Sinne einer Suchterkrankung
- Schwerwiegende psychiatrische Erkrankungen
- Aktive Krebserkrankungen

Jeder potenzielle Studienteilnehmer wurde durch einen Studienarzt aufgeklärt und erhielt eine Bedenkzeit über die eigene Studienteilnahme von mindestens einem Tag. Nach Einwilligung zur Studienteilnahme wurden Herzgewebeproben gewonnen, wie es im folgenden Kapitel beschrieben ist. Darüber hinaus wurden als weitere Untersuchungen eine kardiale MRT und eine venöse Blutabnahme durchgeführt. Eine Studienteilnahme war ebenfalls möglich, wenn eine oder beide dieser zusätzlichen Untersuchungen selektiv abgelehnt wurden, der Gewinnung von Herzgewebeproben jedoch zugestimmt wurde. In der Regel erfolgte die Aufklärung im Rahmen der prästationären Vorstellung. Zwei Tage später erfolgte die elektive Wiedervorstellung und es wurden Herzgewebeproben und Blut am nüchternen Studienteilnehmer abgenommen. Die kardiale MRT wurde in der Regel am letzten Morgen vor der Entlassung am nicht nüchternen Studienteilnehmer durchgeführt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität unter den Studiennummern 5263R, 2021-1635 und 2022-1962 genehmigt. Alle durchgeführten Versuche standen im Einklang mit der Deklaration von Helsinki [169].

2.3 Probengewinnung

2.3.1 Gewinnung von Herzgewebe bei Endomyokardbiopsien

Die EMBs stammten in allen Fällen aus der rechten Seite des interventrikulären Septums. Die Entnahme erfolgte durch einen Facharzt für Kardiologie mittels einer Cardiobiopsiezange (*Cardiobiopsiezange – nicht formbar*, Kat.-Nr. EH1518.02-120, H. + H. Maslanka GmbH, Tuttlingen, Deutschland), welche über die V. femoralis links oder rechts in den rechten Ventrikel vorgeschoben wurde. Auf die Entnahme von EMBs zu Studienzwecken wurde verzichtet, wenn diese vom Sondeur als zusätzliches Risiko für den Studienteilnehmer eingeschätzt wurde. Nach Entnahme wurden die EMBs sofort mit einer

sterilen Skalpellklinge aus der Cardiobiopsiezange genommen und in ein Mikroreaktionsgefäß (*Eppendorf Tubes Protein LoBind Tube 1,5 ml*, Kat.-Nr. 022431081, *Eppendorf AG*, Hamburg, Deutschland) gegeben, welches mit 0,7 ml BIOPS gefüllt war und bis zur Biopsieentnahme auf Eis gelagert wurde. Das Gewicht der EMBs betrug jeweils zwischen 0,1 und 3 mg.

2.3.2 Gewinnung von Herzgewebe bei LVAD-Implantationen

Studienteilnehmer der Ischämische-HI-Kohorte wurden im Rahmen der Routinetherapie der herzchirurgischen Implantation eines LVAD unterzogen. Dabei wurde als Teil der Operation aus dem Bereich der Herzspitze ein Stück Herzgewebe entfernt. Aus diesem Stück entfernten Gewebes wurde zu Studienzwecken eine Probe von ca. 15 g Masse herausgeschnitten und sofort in ein mit BIOPS gefülltes Zentrifugenröhrchen (*Cellstar Tubes 50 ml, konischer Boden*, Kat.-Nr. 227261, *Greiner Bio-One International GmbH*, Kremsmünster, Österreich) gegeben, welches sofort auf Eis gelagert wurde. Das so gewonnene Gewebe wurde aufgeteilt in jeweils zwei kleine Biopsien, die vom Gewicht äquivalent mit den EMBs waren, und ein großes verbleibendes Gewebestück. Die beiden kleinen Gewebestücke wurden sofort im Anschluss der HRR zugeführt wurden (siehe Kapitel 2.4.2) und das große Gewebestück wurde bei -80 °C eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt eine Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität (CSA) durchzuführen (siehe Kapitel 2.5).

2.4 Hochauflösende Respirometrie

2.4.1 Herstellung der Reagenzien zur hochauflösenden Respirometrie

Vor Beginn der Studie wurden einmalig Vorräte an den für die HRR benötigten Lösungen *biopsy preservation solution* (BIOPS) und *mitochondrial respiration medium 05* (MiR05), sowie die Injektionslösungen für das SUIT-Protokoll hergestellt. BIOPS wurde hergestellt wie zuvor beschrieben [170] und auf ein pH von 7,1 eingestellt. Bestandteile und Konzentrationen in mmol / l (mM) des fertigen BIOPS sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der *biopsy preservation solution* (BIOPS). Hergestellt nach [170].

Chemikalie	Konzentration in mM
H ₂ O	-
CaK ₂ EGTA	2,8
K ₂ EGTA	7,2
Na ₂ ATP	5,8
MgCl ₂ ·6H ₂ O	6,6
Taurin	20
Na ₂ Phosphokreatin	15
Imidazol	20
Dithiothreitol	0,5
MES-hydrat	50

ATP: Adenosintriphosphat; Ca: Calcium; Cl: Chlor; EGTA: Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure; H₂O: Wasser; K: Kalium; MES-hydrat: 2-Morpholinoethansulfon-säuremonohydrat; Mg: Magnesium; mM: Millimol / Liter; Na: Natrium.

MiR05 wurde hergestellt wie zuvor beschrieben [171] und auf ein pH von 7,1 eingestellt. Bestandteile und Konzentrationen des fertigen MiR05 sind dargestellt in Tabelle 2.

Tabelle 2: Zusammensetzung des *mitochondrial respiration medium 05* (MiR05). Hergestellt nach [171].

Bestandteil	Konzentration
H ₂ O	-
EGTA	0,5 mM
MgCl ₂	3 mM
Lactobionsäure	60 mM
Taurin	20 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
HEPES	20 mM
D-Saccharose	110 mM
Bovines Serumalbumin	1 g / l

Cl: Chlor; H: Wasserstoff; H₂O: Wasser; HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; EGTA: Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure; g: Gramm; K: Kalium; l: Liter; Mg: Magnesium; mM: Millimol / Liter; O: Sauerstoff; P: Phosphor.

BIOPS und MiR05 wurden in Zentrifugenröhrchen zu je 40 ml abgefüllt und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Um Injektionslösungen für das SUIT-Protokoll gemäß [170] herzustellen, wurden Malat, Octanoylcarnitin, Adenosindiphosphat (ADP), Glutamat, Succinat und Cytochrom c jeweils in Wasser, und Oligomycin, FCCP, Rotenon und Antimycin A jeweils in Ethanol zu den in Tabelle 3 dargestellten Konzentrationen gelöst. Lösungen mit Malat, ADP, Glutamat und Succinat wurden nach Zubereitung jeweils mit Kalilauge auf einen pH-Wert von pH = 7 titriert. Die ADP-Lösung wurde bei -80 °C eingefroren, alle anderen Lösungen wurden bei -20 °C eingefroren. Zur jeweiligen Nutzung im Rahmen der Experimente wurden die benötigten Reagenzien je nach Bedarf aufgetaut.

Tabelle 3: Lösungen für die *Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration* (SUIT).

Reagenz	Konzentration (mM)	Lösungsmedium	Titrationvolumen (μ l)	Finale Konzentration (mM)
Malat	800	H ₂ O	5	2
Octanoylcarnitin	100	H ₂ O	20	1
ADP	500	H ₂ O	100	2,5
Glutamat	2000	H ₂ O	10	10
Succinat	500	H ₂ O	40	10

Cytochrom c	4	H ₂ O	5	0,01
Oligomycin	5	Ethanol	2	0,005
FCCP	1	Ethanol	0,4 pro Schritt	0,0002 pro Schritt
Rotenon	1	Ethanol	1	0,0005
Antimycin A	5	Ethanol	2	0,005

ADP: Adenosintriphosphat; FCCP: Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy)phenylhydrazone; H₂O: Wasser; mM: Millimol / Liter; µl: Mikroliter.

2.4.2 Durchführung der hochauflösenden Respirometrie

Herzgewebeproben, die für die HRR bestimmt waren, wurden auf Eis in BIOPS ins Labor transportiert und für die HRR vorbereitet. Standardmäßig wurde die HRR pro Studienteilnehmer in Duplikaten durchgeführt. Zunächst wurden Proben in einer 6-Well-Platte (*Cellstar 6 Well Plate, sterile, with lid*, Kat.-Nr. 657 160, *Greiner Bio-One international GmbH*, Kremsmünster, Österreich) wie im Folgenden beschrieben für die HRR vorbereitet: Zunächst wurde die Probe in ein Well mit 2,5 ml BIOPS gegeben und mit zwei Pinzetten vorsichtig mechanisch separiert, soweit die Probengröße dies zuließ. Anschließend wurde für jedes Experiment eine Saponinlösung mit einer Konzentration von 5 mg / ml frisch hergestellt. 25 µl dieser Saponinlösung wurden dem Well hinzugegeben, um eine finale Saponinkonzentration von 50 µg / ml zu erreichen. Hierdurch wurde die Permeabilisierung der Muskelfasern gestartet. Saponin löst selektiv Zellmembranen auf, wobei mitochondriale Membranen aufgrund ihres niedrigeren Cholesteringehalts intakt bleiben [172]. Um trotz dieser Selektivität die Intaktheit mitochondrialer Membranen zu überprüfen, wurde im Rahmen der unten beschriebenen SUIT-Titration Cytochrom c als Kontrolle verwendet [145]: dieses befindet sich im Intermembranraum der Mitochondrien und ist an der Übertragung von Elektronen im Rahmen der Atmungskette beteiligt. Da es die äußere Mitochondrienmembran nicht überwinden kann, sollte eine Injektion an Cytochrom c in die Respirationsskammer zu keinem relevanten Anstieg der Respiration führen. Kommt es doch zu einem Anstieg, so weist dies auf eine Schädigung der äußeren Mitochondrienmembran hin [141]. Die 6-Well-Platte wurde mit ihrem Deckel verschlossen und mit Aluminiumfolie abgedeckt, um Lichteinwirkung zu vermeiden, und auf Eis auf einen Taumelschüttler (*Biometra WT12, Analytik Jena GmbH & Co. KG*, Jena, Deutschland) gestellt. Nach 30 Minuten Inkubation mit Saponin wurde die Probe im nächsten Schritt zur Auswaschung des Saponins vorsichtig in ein neues Well mit 2,5 ml MiR05 überführt, erneut abgedeckt und auf Eis auf dem Taumelschüttler für 10 Minuten gewaschen. Dieser Schritt wurde anschließend ein weiteres Mal durchgeführt. Eine schematische Darstellung der Probenzubereitung findet sich in Abb. 2. Anschließend wurde die Probe vorsichtig mit der Pinzette für eine Sekunde auf Filterpapier getrocknet und gewogen. Das Gewicht der Proben betrug zwischen 0,1 und 3 mg. Nach dem Wiegen war die Probe bereit für die HRR und wurde bis zum Start des Experiments in das letzte Well mit MiR05 zurückgegeben, um eine Schädigung des Gewebes durch Austrocknung zu verhindern.

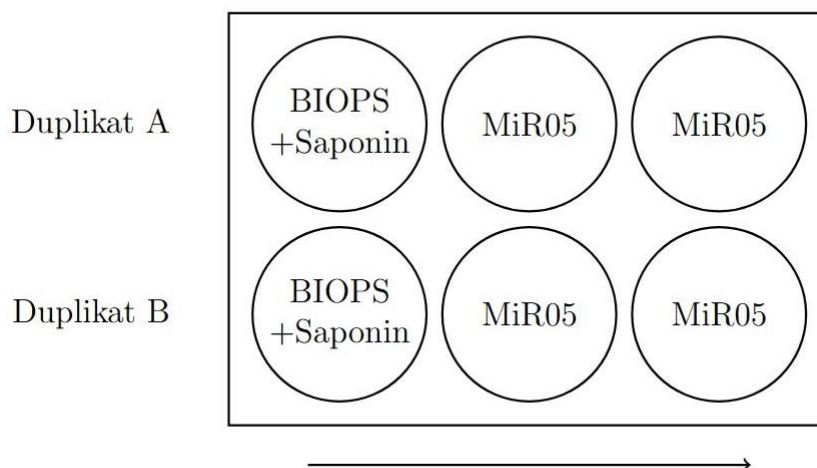


Abb. 2: Schematische Darstellung der Probenzubereitung für die hochauflösende Respirometrie. Duplikat A durchlief die obere, Duplikat B die untere Reihe der 6-Well-Platte. Zunächst wurde jede Probe mit zwei Pinzetten mechanisch in 2,5 μ l *biopsy preservation solution* (BIOPS) separiert und nach anschließender Zugabe von Saponinlösung 30 Minuten lang bei einer finalen Saponinkonzentration von 50 μ g / ml permeabilisiert. Anschließend erfolgten zwei jeweils zehnmünütige Waschungen in je 2,5 ml *mitochondrial respiration medium 05* (MiR05). Die gesamte Probenzubereitung erfolgte auf Eis. ml: Milliliter; μ g: Mikrogramm; μ l: Mikroliter

Parallel zur Vorbereitung der Proben wurde der Oxygraph (*O2k-FluoRespirometer*, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich) für die HRR vorbereitet. Hierfür wurden beide Kammern mit je 2,3 ml MiR05 gefüllt und, nachdem eine stabile Temperatur von 37 °C erreicht war, ein Rührfischtest (*stirrer test*) und eine Kalibrierung bei Raumluft (*air calibration*) gemäß der Angaben des Herstellers [140] durchgeführt. Ein *instrumental O₂ background test* bei hoher O₂-Konzentration wurde separat durchgeführt gemäß [173] und der ermittelte instrumentelle Hintergrundwert wurde bei den jeweiligen HRRs zur *instrumental O₂ background correction* angewendet.

Sobald sowohl die Proben als auch der Oxygraph vorbereitet waren, wurde die HRR initiiert. Dazu wurden die Proben in die Kammern des Oxygraphen gegeben. Die Zeit zwischen Entnahme der Proben und Start der HRR betrug unter 6 Stunden. Beide Kammern wurden hyperoxygeniert, um eine Sauerstoffkonzentration von ca. 450 μ M zu erreichen und eine Limitation der Sauerstoffdiffusion zu vermeiden. Für die HRR wurde ein bereits etabliertes SUIT-Protokoll verwendet [105, 123, 153, 154, 156], bei dem die in Tabelle 3 aufgeführten Lösungen jeweils nacheinander in die Kammern injiziert wurden. Mit Ausnahme von FCCP erfolgte die jeweils nächste Injektion, nachdem ein stabiles Stadium der Respiration erreicht war. Nach Zugabe von Oligomycin, Rotenon und Antimycin A wurde jeweils 10 Minuten gewartet. Die Zugabe von FCCP erfolgte in einzelnen Titrationsschritten, bis der *O₂-Flux* nicht mehr weiter zunahm (i.d.R. 2 bis 4 Schritte). Fiel die Sauerstoffkonzentration in der Kammer während des SUIT-Protokolls unter 200 μ M wurde die betreffende Kammer erneut auf eine Konzentration von ca. 400 bis 450 μ M hyperoxygeniert, um konstante Reaktionsbedingungen zu schaffen und eine Verfälschung der Messungen, wie sie durch starke Schwankungen der Sauerstoffkonzentration hervorgerufen werden kann [174, 175], zu vermeiden. Eine repräsentative *O₂-Flux*-Kurve, wie sie während eines HRR-

Experimentes gemessen wurde, ist in Abb. 3 dargestellt. Nach Beendigung des SUIT-Protokolls wurden die Gewebeproben gesammelt und bei -80 °C gelagert.

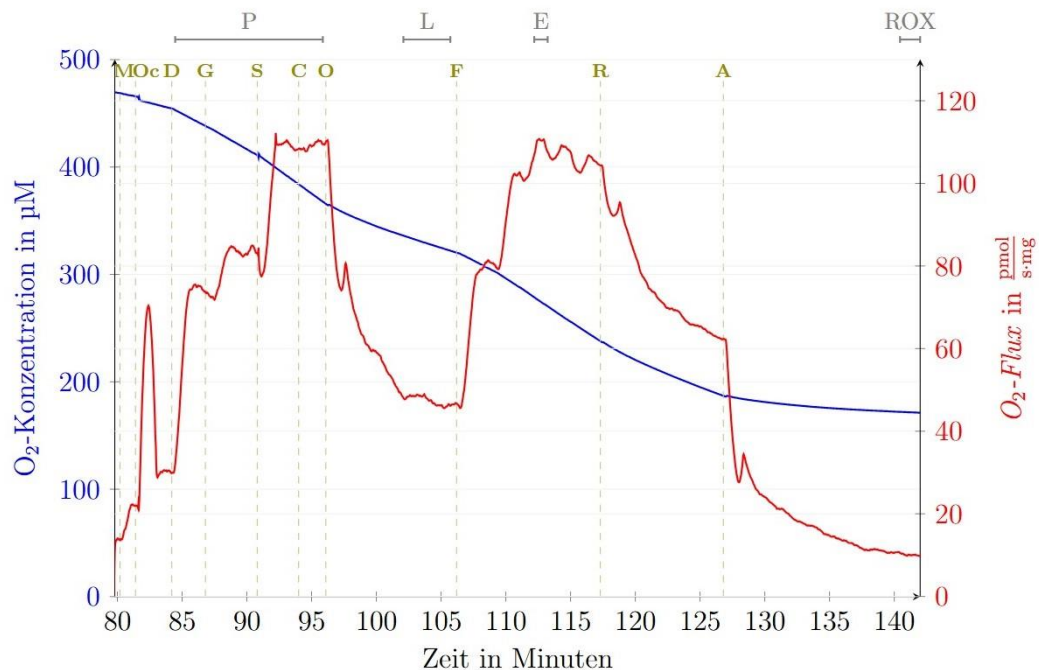


Abb. 3: Repräsentative O_2 -Flux-Kurve, die im Rahmen einer hochauflösenden Respirometrie (HRR) gemessen wurde. Blau dargestellt (linke Y-Achse) ist die Sauerstoff-Konzentration (O_2 -Konzentration) in der Kammer, welche vom *polarographic oxygen sensor* (POS) gemessen wird. Aus dem Verlauf der O_2 -Konzentration über die Zeit (X-Achse) wird mittels *DatLab* (Version 7.4.0.4, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich) der auf das Probengewicht normierte O_2 -Flux in $\text{pmol} / (\text{s} \cdot \text{mg})$ errechnet, welcher als rote Kurve (rechte Y-Achse) dargestellt ist. Der O_2 -Flux verändert sich im Zuge des *Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration* (SUIT-) Protokolls, dessen Injektionen in olivgrün (gestrichelte vertikale Linien), und die entsprechenden respiratorischen Stadien in grau (P, L, E) dargestellt sind. Im Zuge des SUIT-Protokolls wurden nacheinander Malat (M), Octanoylcarnitin (Oc), ADP (D), Glutamat (G) und Succinat (S) injiziert, um die oxidative Phosphorylierungs-Kapazität (OXPHOS-Kapazität; P) zu messen. Anschließend wurde Cytochrom c (C) injiziert, um die Integrität der mitochondrialen Membran zu überprüfen. Als nächstes wurde Oligomycin (O) injiziert und die LEAK-Respiration (L) gemessen. Danach wurde der Entkoppler FCCP (F) in Form mehrerer Titrationsschritte injiziert, bis der O_2 -Flux nicht weiter zunahm und die höchste erreichte Respiration als *Electron-Transfer-System*-Kapazität (ETS-Kapazität; E) gemessen wurde. Nach Zugabe von Rotenon (R) und Antimycin A (A) wurde der residuale Sauerstoffverbrauch (*residual oxygen consumption*; ROX) gemessen. Alle respiratorischen Messungen wurden um den ROX korrigiert, indem dieser jeweils von allen vorherigen Respirationswerten subtrahiert wurde. mg: Milligramm; μM : Mikromol / Liter, pmol: Pikomol; s: Sekunde

Alle respirometrischen Messungen wurden um den ROX-Wert korrigiert, um ausschließlich den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zu evaluieren. Als Marker für die oxidative Kapazität der Mitochondrien wurden die OXPHOS-Kapazität (vor Zugabe von Cytochrom c) und die ETS-Kapazität evaluiert [141]. Darüber hinaus wurde die LEAK-Respiration gemessen, um zusammen mit der OXPHOS-Kapazität (nach Zugabe von Cytochrom c) die RCR zu berechnen wie in Kapitel 1.4.4 dargestellt.

2.5 Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität

Die Quantifizierung des Mitochondriengehalts in den Myokardproben erfolgte anhand der Bestimmung der CSA. Die CSA zeigt eine starke Assoziation mit dem Mitochondriengehalt [176] und wird daher häufig als Marker für diesen verwendet [177, 178]. Laborinterne Versuche lieferten Hinweise darauf, dass die CSA-Bestimmung erst in größeren Myokardproben (> 10 mg) reproduzierbare Ergebnisse lieferte [105]. Aus diesem Grund erfolgte die CSA-Bestimmung allein aus den Proben der Ischämische-HI-Kohorte, da in der Nichtischämische-HI-Kohorte und der Post-HTX-Kohorte aufgrund der geringen Probengröße der EMBs nicht von einer ausreichenden Validität der Ergebnisse ausgegangen werden konnte.

Die Bestimmung der CSA erfolgte mittels *Citrate Synthase Assay Kit* (Kat.-Nr. CA0720, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Deutschland), indem das Protokoll des Herstellers befolgt wurde. Zu diesem Zweck wurden Myokardproben von jeweils ca. 15 mg Masse auf Eis aufgetaut und in Zelllysereagenz, welches zu 1 % mit *Protease Inhibitor Cocktail* supplementiert war, im Verhältnis von 6 µl supplementiertem Puffer pro mg Gewebe homogenisiert. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 12.000g zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde im Verhältnis von 1:10 mit dem *Assay Buffer for Citrate Synthase* gemischt und im Anschluss für die Bestimmung sowohl der CSA als auch des Proteingehaltes verwendet.

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte in Duplikaten mittels *DC™ Protein Assay Kit* (Kat.-Nr. 5000113, 5000114 und 5000115, *Bio-Rad Laboratories, Inc.*, Hercules, USA). Hierzu wurde eine doppelt ausgeführte Standard-Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin in *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) auf einer 96-Well-Platte vorbereitet. Dabei betrugen die Konzentrationen 0 mg / ml, 25 mg / ml, 75 mg / ml, 100 mg / ml, 250 mg / ml, 500 mg / ml, 750 mg / ml, 1000 mg / ml, 1500 mg / ml und 2000 mg / ml. Jeweils 5 µl Probenlösung bzw. Standard wurden in die Wells pipettiert. Anschließend wurden je 25 µl Reagenz A (alkalische Kupferlösung) und 200 µl Reagenz B (Folin-Reagenz) in jedes Well gegeben, die Probenlösung oder Standard enthielt. Danach wurde die Platte abgedeckt bei Raumtemperatur für 15 Minuten auf einem Taumelschüttler inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 750 nm Wellenlänge mittels Mikroplattenlesers (*FLUOStar Omega Microplatereader*, *BMG LABTECH GmbH*, Ortenberg, Deutschland). Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben mittels Extrapolation der Standardkurven berechnet.

Für die Bestimmung der CSA wurden alle Proben anhand der zuvor bestimmten Proteinkonzentration mit DPBS auf dieselbe Proteinkonzentration verdünnt. Anschließend erfolgte die weitere Durchführung entsprechend dem Protokoll des Herstellers:

- *Assay Buffer*: 25 ml des *Assay Buffer for Citrate Synthase* 5x wurden mit 100 ml H₂O verdünnt, um 1x *Assay Buffer* herzustellen.
- Positivkontrolle: 5 µl der Positivkontrolle (*Positive control*) wurden mit 45 µl des 1x *Assay Buffer* gemischt.
- *Acetyl CoA*: 25 mg *Acetyl Coenzyme A Trilithium Salt* wurden in 1 ml H₂O aufgelöst, um eine Konzentration von 30 mM zu erhalten.
- DTNB: 4 mg 5,5'-*Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)* wurden in 1 ml absolutem Ethanol (≥ 99,8 % v/v) gelöst, um eine Konzentration von 10 mM zu erhalten.

- Oxalacetat: 3,9 mg Oxalacetat wurden in 3 ml des 1x *Assay Buffer* gelöst, um eine Konzentration von 19 mM zu erhalten.

Anschließend wurden 136 µl des 1x *Assay Buffer*, 2 µl Acetyl-CoA-Lösung (30 mM) und 2 µl DTNB-Lösung (10 mM) vermischt und zusammen mit jeweils 50 µl der Probelösung auf die 96-Well-Platte aufgetragen, sodass das Well jeder Probe insgesamt 190 µl enthielt.

Parallel wurden 184 µl 1x *Assay Buffer*, 2 µl Acetyl-CoA-Lösung (30 mM) und 2 µl DTNB-Lösung (10 mM) vermischt und zusammen mit 2 µl der gelösten Positivkontrolle auf die 96-Well-Platte aufgetragen, sodass jedes gefüllte Well der Positivkontrolle insgesamt 190 µl enthielt.

Die Absorption wurde mittels Mikroplattenlesers bei einer Wellenlänge von 412 nm minütlich gemessen, um die basale, nicht CSA-bedingte Veränderung der Absorption (Hintergrund) zu bestimmen. Als nächsten Schritt wurden jeweils 10 µl des gelösten Oxalacetats (10 mM) in jedes Well mit Probe oder Positivkontrolle hinzugegeben und die Absorption erneut bei 412 nm minütlich gemessen, um die maximale CSA zu ermitteln. Zuletzt wurde die Hintergrund-CSA von der maximalen CSA subtrahiert. Die Messung erfolgte jeweils in Duplikaten und der Mittelwert wurde anschließend für die statistische Analyse verwertet.

2.6 Ergänzende Diagnostik

2.6.1 Histopathologie

Im Rahmen der Routinediagnostik entnommene EMBs wurden von einem externen Labor histologisch untersucht, um das *grading* bezüglich Transplantatabstoßung (Post-HTX-Kohorte) [168] bzw. die Diagnose der histologischen Grunderkrankung (Nichtischämische-HI-Kohorte) zu bestimmen. Die erhaltenen Resultate wurden für diese Studienzwecke übernommen.

2.6.2 Venöse Blutentnahme

Studienteilnehmern der Post-HTX-Kohorte und Nichtischämische-HI-Kohorte wurde am Ende der Biopsieentnahme aus der Katheterschleuse venöses Blut mithilfe einer Dosierpumpenspritze entnommen und mit einer Aufziehkanüle in Blutabnehmeröhrchen gefüllt. Bei Studienteilnehmern der Ischämische-HI-Kohorte erfolgte die Blutentnahme mittels Blutabnahmeset. Alle Blutproben wurden einer laborchemischen Untersuchung durch das Zentrallabor des Universitätsklinikum Düsseldorf zugeführt. Hier wurden Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Harnstoffkonzentration und Serumkreatininkonzentration bestimmt. Die erhaltenen Resultate wurden für diese Studienzwecke übernommen.

2.6.3 Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion

Die Bestimmung der LVEF erfolgte mittels kardialer MRT. Auf die Durchführung einer MRT wurde verzichtet, wenn mindestens einer der folgenden Gründe vorlag:

- Kontraindikationen (z.B. nicht MRT-fähige Implantate)
- Zu großer Körperumfang
- Starke Platzangst
- Ablehnung durch den Studienteilnehmer

In diesen Fällen wurde die in der routinediagnostisch durchgeführten transthorakalen Echokardiographie (TTE) ermittelte LVEF für die Studie verwendet.

2.7 Statistik

2.7.1 Stratifizierung und Ausschluss der Patienten in der retrospektiven Analyse

Bevor die Studienteilnehmer den drei Kohorten zugeordnet wurden, erfolgte zunächst eine Qualitätskontrolle der respirometrischen Daten:

Um eine hohe Qualität der Daten zu gewährleisten, wurden von der weiteren Auswertung alle Experimente ausgeschlossen, welche als invalide eingestuft wurden. Als invalide eingestuft wurden alle Experimente, die mindestens eins der folgenden Kriterien erfüllten:

- Histologisches *grading* > 0 gemäß ISHLT
- Gewicht der EMB < 0,1 mg
- Fehlender Anstieg des *O₂-Flux* nach Zugabe von ADP
- Fehlender Anstieg des *O₂-Flux* nach Zugabe von Succinat
- OXPHOS-Kapazität < 50 pmol / (s · mg)
- Anstieg des *O₂-Flux* > 10 % nach Zugabe von Cytochrom c
- LCR > 1

Jedes Duplikat wurde mithilfe der o.g. Fehlerkriterien auf Invalidität geprüft. Wurde keines der Duplikate als invalide eingestuft, so wurde für die weitere Auswertung der Durchschnittswert beider Duplikate verwendet. Wurde eines der Duplikate als invalide eingestuft, so wurde das jeweils andere Duplikat zur weiteren Auswertung verwendet. Wurden beide Duplikate als invalide eingestuft, so wurde der betreffende Studienteilnehmer vollständig aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen

Innerhalb der drei Kohorten wurden anschließend die Studienteilnehmer, die nach Anwendung der Kriterien verblieben, anhand ihrer Plasma Hb-Konzentration in jeweils zwei Gruppen eingeteilt:

1. Kontrollgruppe (definiert als Hb-Konzentration ≥ 10 g / dl)
2. Anämiegruppe (definiert als Hb-Konzentration < 10 g / dl)

Im nächsten Schritt wurden die Kohorten auf ihre Charakteristika und mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht. Folgende Charakteristika wurden in allen Kohorten untersucht:

- Alter
- Geschlecht
- *Body mass index* (BMI)
- LVEF
- Diabetes
- Hypertension
- Dialysepflichtigkeit
- Hb-Konzentration
- Hämatokrit
- Leukozytenzahl
- Thrombozytenzahl
- Harnstoffkonzentration
- Serumkreatininkonzentration

In der Post-HTX-Kohorte wurden zusätzlich untersucht:

- Alter des Donors
- Geschlecht des Donors
- BMI des Donors
- Zeit seit HTX
- Tacrolimus-Einnahme
- Everolimus-Einnahme
- Mycophenolat-Einnahme
- Prednisolon-Einnahme

In der Nichtischämische-HI-Kohorte wurde zusätzlich untersucht:

- Histologische Grunderkrankung

In der Ischämische-HI-Kohorte wurden keine zusätzlichen Charakteristika untersucht.

2.7.2 Statistische Tests

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *IBM SPSS Statistics* (Version 29.0.0.0, *International Business Machines Corporation*, Armonk, USA). Die log-normalverteilten Variablen OXPPOS-Kapazität und ETS-Kapazität wurden durch dekadische Logarithmierung in eine Normalverteilung überführt. Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) erfolgte in allen Fällen zweiseitig. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $\alpha = 0,05$ festgelegt [179].

Im ersten Schritt wurden die Charakteristika der untersuchten Kohorten betrachtet. Skalenverteilte Variablen wurden auf Median und Standardabweichung untersucht und mittels Mann-Whitney-U-Test auf Homogenität zwischen den Gruppen getestet. Kategorial verteilte Variablen wurden auf absolute und relative Häufigkeiten untersucht und mittels Chi-Quadrat-Tests (bei unzureichender Fallzahl mittels *Fisher's exact tests* oder mittels Monte-Carlo-Simulation) auf Homogenität zwischen den Gruppen getestet. Bei diesem Vergleich der Charakteristika zwischen den Gruppen wurde keine Korrektur für multiples Testen durchgeführt. Charakteristika, die sich signifikant zwischen den Gruppen

unterschieden, wurden als potenzielle *Confounder* in den beiden folgenden Schritten berücksichtigt.

Nach der Untersuchung der Gruppencharakteristika wurde in einem zweiten Schritt innerhalb jeder Kohorte untersucht, ob sich Kontroll- und Anämiegruppe hinsichtlich OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität, RCR und ggf. CSA (nur Ischämische-HI-Kohorte) unterschieden. Dies erfolgte mittels unabhängigen t-Tests. Anschließend wurden unter Anwendung linearer Modelle die Unterschiede um die im ersten Schritt identifizierten potenziellen *Confounder* bereinigt. Effektstärken wurden als *Cohen's d* berechnet. Die Interpretation der Effektstärken folgte den Konventionen nach J. Cohen [180, 181], wobei bei $d \geq 0,2$ von einem kleinen, bei $d \geq 0,5$ von einem mittleren und bei $d \geq 0,8$ von einem großen Effekt ausgegangen wurde. Wenn eine Variable in Einzelfällen nicht durch Logarithmierung in eine Normalverteilung transformiert werden konnte, wurden die Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Tests auf Unterschiede untersucht.

In einem dritten Schritt wurde untersucht, ob die Hb-Konzentration mit OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität, RCR und ggf. CSA (nur Ischämische-HI-Kohorte) korrelierte. Dies erfolgte mittels Pearson-Korrelation. Anschließend wurde mittels linearer Modelle die Korrelation um die im ersten Schritt identifizierten potenziellen *Confounder* bereinigt. Effektstärken wurden als *Pearson's r* berechnet. Die Interpretation der Effektstärken folgte auch hier den Konventionen nach J. Cohen [180, 181], wobei bei $r \geq 0,1$ von einem kleinen, bei $r \geq 0,3$ von einem mittleren und bei $r \geq 0,5$ von einem großen Effekt ausgegangen wurde. Wenn eine Variable in Einzelfällen nicht durch Logarithmierung in eine Normalverteilung transformiert werden konnte, wurden die Gruppen mittels Spearman-Korrelation auf Unterschiede untersucht und die Effektstärke als *Spearman's ρ* berechnet.

Im Fall der Nichtischämische-HI-Kohorte wurden zusätzlich Subkohortenanalysen durchgeführt. Im Rahmen dieser Subkohortenanalysen wurde die gesamte Nichtischämische-HI-Kohorte nach histologischer Grunderkrankung in eine Dilatative-Kardiomyopathie- (DCM-) Subkohorte, Myokarditis-Subkohorte, Speichererkrankung-Subkohorte, Amyloidose-Subkohorte, Andere-Nichtischämische-HI-Subkohorte und Unklare-Nichtischämische-HI-Subkohorte aufgeteilt. Anschließend wurde der o.g. dritte Schritt für jede der Subkohorten, welche eine hinreichende Fallzahl von $n \geq 10$ aufwies, noch einmal einzeln durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Post-HTX-Kohorte

3.1.1 Charakteristika

Es wurden 130 herztransplantierte Menschen ohne HI (Post-HTX-Kohorte) in die Auswertung eingeschlossen. Von diesen 130 Studienteilnehmern wurden aufgrund ihrer Hb-Konzentration 95 Studienteilnehmer der Kontrollgruppe und 35 Studienteilnehmer der Anämiegruppe zugeteilt. Neben der Hb-Konzentration und dem Hämatokrit unterschieden sich die Gruppen in der seit der Transplantation vergangenen Zeit. Alle anderen untersuchten Marker unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Eine ausführliche Darstellung der Charakteristika der Post-HTX-Kohorte findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Charakteristika der Post-HTX-Kohorte.

	Kontrollgruppe	Anämiegruppe	NHST
Anzahl	95	35	
Alter [Jahre]	55,8 ($\pm$ 12,7)	57 ($\pm$ 9,9)	p = 0,879
Männliches Geschlecht	73 / 94 (77,7 %)	29 / 35 (82,9 %)	p = 0,630
BMI [kg / (m ²)]	25,8 ($\pm$ 4,7)	25,8 ($\pm$ 5,2)	p = 0,707
LVEF [%]	65,8 ($\pm$ 7,4)	63 ($\pm$ 4,8)	p = 0,142
Diabetes in der Vorgeschichte	32 / 95 (33,7 %)	15 / 35 (42,9 %)	p = 0,411
Hypertension	45 / 91 (49,5 %)	15 / 33 (45,5 %)	p = 0,839
Dialysepflichtigkeit	8 / 91 (8,8 %)	7 / 34 (20,6 %)	p = 0,117
Hb-Konzentration [g / dl]	12,5 ($\pm$ 1,6)	8,9 ($\pm$ 1)	p < 0,001
Hämatokrit [%]	37,9 ($\pm$ 4,5)	27,7 ($\pm$ 3,2)	p < 0,001
Leukozytenzahl [1 / μ l]	7017 ($\pm$ 3106)	6104 ($\pm$ 3263)	p = 0,071
Thrombozytenzahl [1000 / μ l]	219,6 ($\pm$ 71,3)	211,5 ($\pm$ 141,5)	p = 0,126
Harnstoffkonzentration [mg / dl]	55,1 ($\pm$ 24,7)	71,1 ($\pm$ 37,2)	p = 0,051
Serumkreatininkonzentration [mg / dl]	1,6 ($\pm$ 0,9)	2,2 ($\pm$ 1,7)	p = 0,125

Donoralter [Jahre]	40,5 (± 12,8)	42 (± 13,4)	p = 0,679
Männlicher Donor	34 / 57 (59,6 %)	17 / 24 (70,8 %)	p = 0,452
Donor-BMI [kg / (m ²)]	25,1 (± 3,2)	25,8 (± 5,2)	p = 0,926
Zeit seit HTX [Monate]	41 (± 148,6)	12,3 (± 20,7)	p = 0,004
Einnahme von Tacrolimus	91 / 94 (96,8 %)	34 / 35 (97,1 %)	p = 0,922
Einnahme von Everolimus	28 / 95 (29,5 %)	9 / 34 (26,5 %)	p = 0,740
Einnahme von Mycophenolat	67 / 95 (70,5 %)	27 / 35 (77,1 %)	p = 0,455
Einnahme von Prednisolon	90 / 95 (94,7 %)	35 / 35 (100 %)	p = 0,166

Männliches Geschlecht, Diabetes in der Vorgeschichte, Hypertonie, Dialysepflichtigkeit, Männlicher Donor, Einnahme von Tacrolimus, Einnahme von Everolimus, Einnahme von Mycophenolat und Einnahme von Prednisolon sind angegeben als absolute und relative Häufigkeit; für diese Variablen erfolgte die Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) mittels Chi-Quadrat-Tests. Alle anderen Variablen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung; in diesen Fällen erfolgte die NHST mittels Mann-Whitney-U-Tests. Eine Korrektur für multiples Testen erfolgte nicht. BMI: *body mass index*; dl: Deziliter; g: Gramm; Hb: Hämoglobin; HTX: Herztransplantation; kg: Kilogramm; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; mg: Milligramm; m: Meter; µl: Mikroliter.

3.1.2 Myokardiale mitochondriale Funktion und Effizienz

Im ventrikulären Myokard herztransplantierten Menschen ohne HI war Anämie mit einer verminderten mitochondrialen Funktion (OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität) assoziiert (Abb. 4). Diese Assoziation zeigte sich auch weiterhin nach Korrektur für die seit der HTX vergangene Zeit. Demgegenüber war Anämie nicht mit einer verminderten ventrikulären myokardialen mitochondrialen Kopplungseffizienz (RCR und LCR) assoziiert.

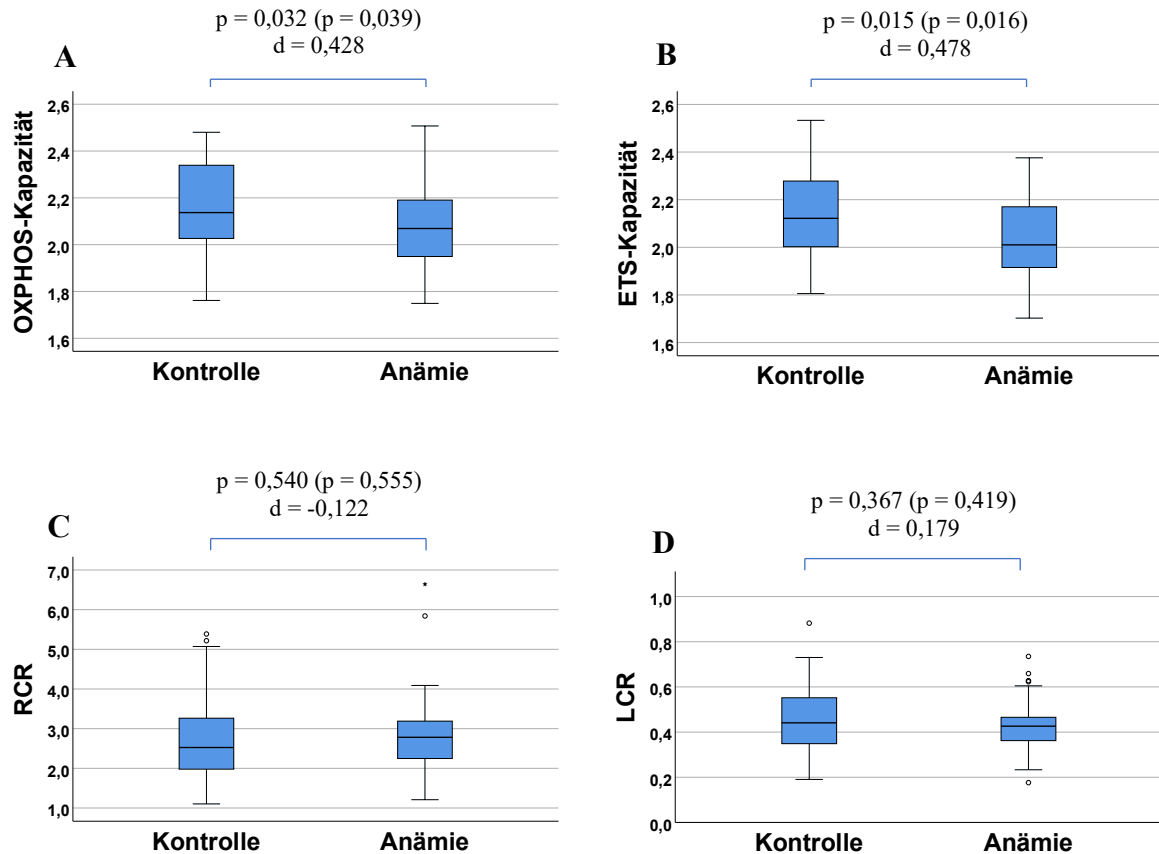


Abb. 4: Niedrigere mitochondriale oxidative Kapazität bei Anämie in nicht-insuffizienten menschlichen Herzen. Bei herztransplantierten Menschen ist Anämie mit (A) verminderter oxidativer Phosphorylierungs-Kapazität (OXPHOS-Kapazität) und (B) verminderter *Electron-Transfer-System*-Kapazität (ETS-Kapazität) bei (C) unveränderter *respiratory control ratio* (RCR) und (D) unveränderter *LEAK control ratio* (LCR) in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien assoziiert. OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität sind jeweils angegeben als O_2 -Flux in $\text{pmol} / (\text{s} \cdot \text{mg})$ und wurden dekadisch logarithmiert. Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) erfolgte zweiseitig mittels unabhängigen t-Tests. Werte nach Korrektur für die Zeit seit Herztransplantation (HTX) sind in Klammern angegeben. Effektstärken wurden berechnet als *Cohen's d*. Es gilt jeweils $n = 95$ für die Kontrollgruppe und $n = 35$ für die Anämiegruppe. mg: Milligramm; pmol: Pikomol; s: Sekunde

In Kongruenz zu diesem Ergebnis korrelierte die Hb-Konzentration in herztransplantierten Menschen ohne HI mit der ventrikulären myokardialen Mitochondrienfunktion (OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität; dargestellt in Abb. 5). Auch diese Korrelationen zeigten sich weiterhin nach Korrektur für die seit der HTX vergangene Zeit im linearen Modell. Mit der myokardialen mitochondrialen Kopplungseffizienz (RCR und LCR) korrelierte die Hb-Konzentration jedoch nicht.

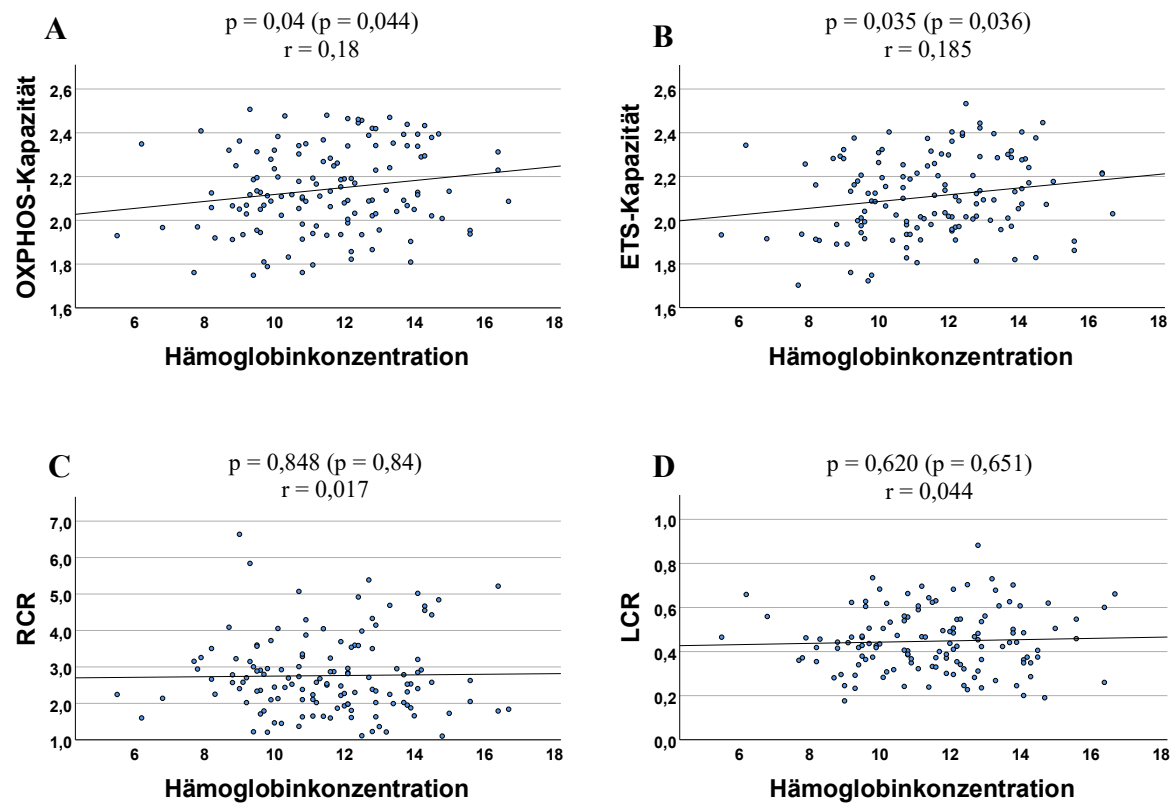


Abb. 5: Korrelation zwischen Hämoglobinkonzentration und mitochondrialer oxidativer Kapazität in nicht-insuffizienten menschlichen Herzen. Bei herztransplantierten Menschen ohne Herzinsuffizienz korreliert die Serumhämoglobinkonzentration positiv mit (A) oxidativer Phosphorylierungs-Kapazität (OXPHOS-Kapazität) und (B) *Electron-Transfer-System*-Kapazität (ETS-Kapazität), nicht aber mit (C) *respiratory control ratio* (RCR) oder (D) *LEAK control ratio* (LCR) in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien. Darstellungen als *scatter plots* mit Ausgleichsgeraden. OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität sind jeweils angegeben als O_2 -Flux in $\text{pmol} / (\text{s} \cdot \text{mg})$ und wurden dekadisch logarithmiert. Die Hämoglobinkonzentration ist jeweils angegeben in g / dl . Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) erfolgte zweiseitig. Werte nach Korrektur für die Zeit seit Herztransplantation (HTX) sind in Klammern angegeben. Effektstärken wurden errechnet als *Pearson's r*. Es gilt jeweils $n = 130$. dl: Deziliter; g: Gramm; mg: Milligramm; pmol: Pikomol; s: Sekunde

3.2 Nichtischämische-HI-Kohorte

3.2.1 Charakteristika

Es wurden 152 Menschen mit nichtischämisch bedingter HI in die Auswertung eingeschlossen (Nichtischämische-HI-Kohorte). Von diesen 152 Studienteilnehmern wurden aufgrund ihrer Hb-Konzentration 141 Studienteilnehmer der Kontrollgruppe und 11 Studienteilnehmer der Anämiegruppe zugeteilt. Die beiden Gruppen unterschieden sich bezüglich der untersuchten Charakteristika neben der Hb-Konzentration und dem Hämatokrit in der Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Harnstoffkonzentration und Serumkreatininkonzentration. Eine ausführliche Darstellung der Charakteristika der Nichtischämische-HI-Kohorte findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Charakteristika der Nichtischämische-HI-Kohorte.

	Kontrollgruppe	Anämiegruppe	NHST
Anzahl	141	11	
Alter [Jahre]	57,3 ($\pm$ 14,4)	65,3 ($\pm$ 12,6)	p = 0,102
Männliches Geschlecht	101 / 141 (71,6 %)	6 / 11 (54,5 %)	p = 0,303
BMI [kg / (m ²)]	28,2 ($\pm$ 6,5)	26,2 ($\pm$ 5,5)	p = 0,289
LVEF [%]	39,2 ($\pm$ 15,9)	46,3 ($\pm$ 17,8)	p = 0,278
Diabetes in der Vorgeschichte	36 / 139 (25,9 %)	4 / 11 (36,4 %)	p = 0,485
Hypertension	91 / 138 / 65,9 %)	7 / 11 (63,6 %)	p = 1,000
Dialysepflichtigkeit	8 / 141 (5,7 %)	1 / 11 (9,1 %)	p = 0,501
Hb-Konzentration [g / dl]	13,3 ($\pm$ 1,6)	9,1 ($\pm$ 0,7)	p < 0,001
Hämatokrit [%]	39,6 ($\pm$ 4,4)	28,4 ($\pm$ 2,9)	p < 0,001
Leukozytenzahl [1 / μ l]	6798 ($\pm$ 2197)	8945 ($\pm$ 3626)	p = 0,043
Thrombozytenzahl [1000 / μ l]	230 ($\pm$ 125,6)	323,1 ($\pm$ 98,2)	p < 0,001
Harnstoffkonzentration [mg / dl]	43,6 ($\pm$ 25,9)	66,7 ($\pm$ 20,6)	p = 0,001
Serumkreatininkonzentration [mg / dl]	1,4 ($\pm$ 1,3)	1,9 ($\pm$ 0,7)	p = 0,003
Histologische Grunderkrankung			p = 0,372
- DCM	65 / 141 (46,1 %)	3 / 11 (27,3 %)	

- Myokarditis	25 / 141 (17,7 %)	4 / 11 (36,4 %)	
- Speichererkrankung	3 / 141 (2,1 %)	0 / 11	
- Amyloidose	15 / 141 (10,6 %)	0 / 11	
- Andere Nichtischämische HI	30 / 141 (21,3 %)	4 / 11 (36,4 %)	
- Unklare Nichtischämische HI	3 / 141 (2,1 %)	0 / 11	

Männliches Geschlecht, Diabetes in der Vorgeschichte, Hypertension, Dialysepflichtigkeit und Histologische Grunderkrankung sind als absolute und relative Häufigkeiten angegeben. Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) erfolgte mittels Chi-Quadrat-Tests für Männliches Geschlecht und Hypertension, mittels *Fisher's exact tests* für Diabetes in der Vorgeschichte und Dialysepflichtigkeit und mittels Monte-Carlo-Simulation für histologische Grunderkrankung. Alle anderen Variablen sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Für diese Variablen erfolgte die NHST mittels Mann-Whitney-U-Tests. Eine Korrektur für multiples Testen erfolgte nicht. BMI: *body mass index*; dl: Deziliter; g: Gramm; Hb: Hämoglobin; HI: Herzinsuffizienz; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; kg: Kilogramm; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; m: Meter; mg: Milligramm; μ l: Mikroliter.

3.2.2 Myokardiale mitochondriale Funktion und Effizienz

In Menschen mit nichtischämischer HI war Anämie mit keiner Veränderung der ventrikulären myokardialen mitochondrialen Funktionen (OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität) oder Kopplungseffizienz (RCR und LCR) assoziiert (Abb. 6). Darüber hinaus korrelierte die Hb-Konzentration in Menschen mit nichtischämischer HI weder mit der OXPHOS-Kapazität oder der ETS-Kapazität, noch mit der RCR oder LCR (Abb. 7).

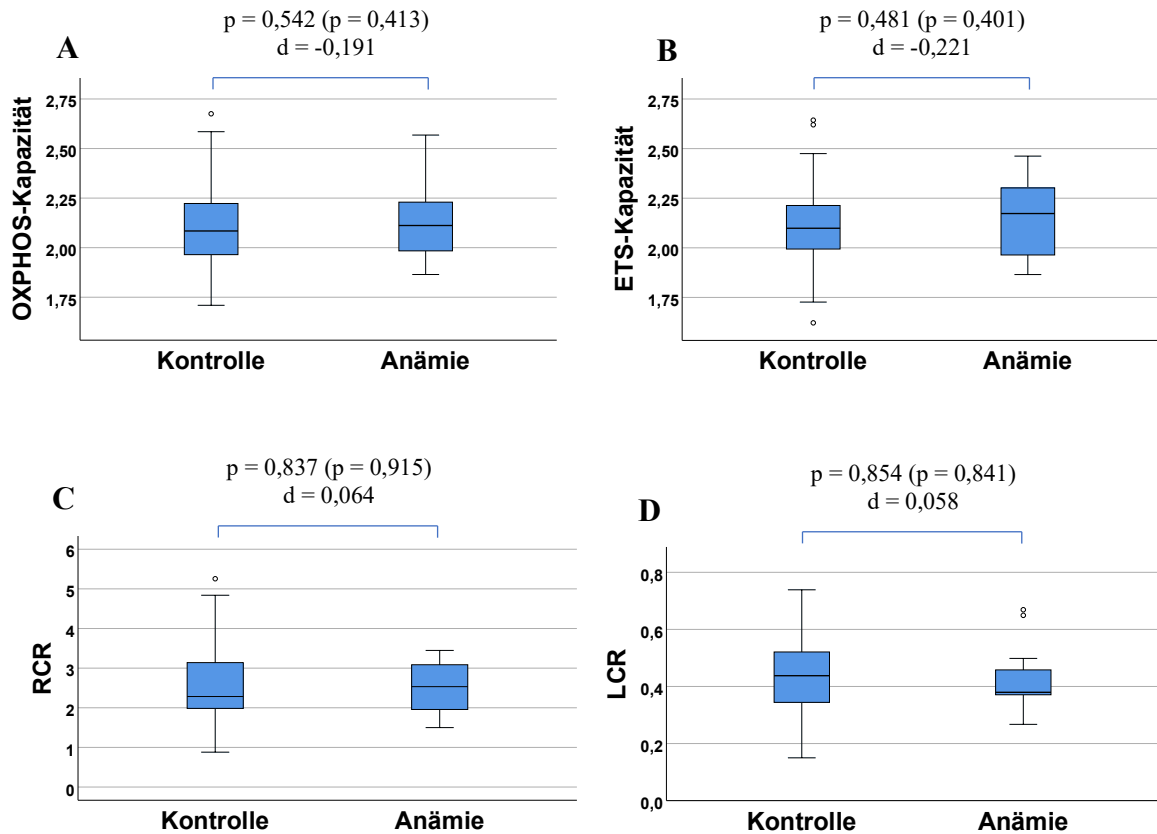


Abb. 6: Keine niedrigere mitochondriale oxidative Kapazität bei Anämie in nichtischämisch bedingt insuffizienten menschlichen Herzen. Bei Menschen mit nichtischämisch bedingter Herzinsuffizienz ist Anämie nicht mit einer Verringerung von (A) oxidativer Phosphorylierungskapazität (OXPHOS-Kapazität), (B) *Electron-Transfer-System*-Kapazität (ETS-Kapazität), (C) *respiratory control ratio* (RCR) oder (D) *LEAK control ratio* (LCR) in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien assoziiert. OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität sind jeweils angegeben als O_2 -Flux in $\text{pmol} / (\text{s} \cdot \text{mg})$ und wurden dekadisch logarithmiert. Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) erfolgte zweiseitig mittels unabhängigen t-Tests. Werte nach Korrektur für Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Harnstoffkonzentration und Serumkreatininkonzentration (jeweils dekadisch logarithmiert) im linearen Modell sind in Klammern angegeben. Effektstärken wurden berechnet als *Cohen's d*. Es gilt jeweils $n = 141$ für die Kontrollgruppe und $n = 11$ für die Anämiegruppe. mg: Milligramm; pmol: Pikomol; s: Sekunde

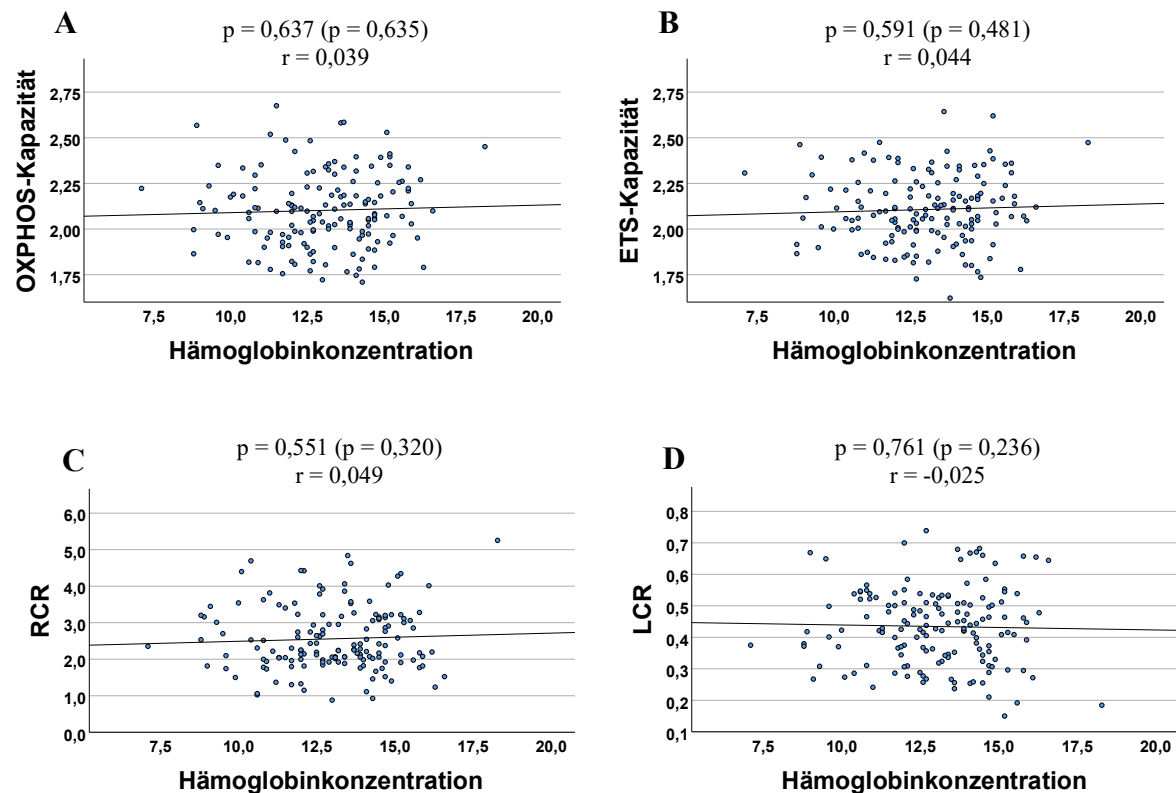


Abb. 7: Keine Korrelation zwischen Hämoglobinkonzentration und mitochondrialer oxidativer Kapazität in nichtischämisch bedingten insuffizienten menschlichen Herzen. Bei Menschen mit nichtischämisch bedingter Herzinsuffizienz korreliert die Serumhämoglobinkonzentration nicht mit (A) oxidativer Phosphorylierungskapazität (OXPHOS-Kapazität), (B) *Electron-Transfer-System*-Kapazität (ETS-Kapazität), (C) *respiratory control ratio* (RCR) oder (D) *LEAK control ratio* (LCR) in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien. Darstellungen als *scatter plots* mit Ausgleichsgeraden. OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität sind jeweils angegeben als O_2 -Flux in $\text{pmol} / (\text{s} \cdot \text{mg})$ und wurden dekadisch logarithmiert. Die Hämoglobinkonzentration ist jeweils angegeben in g / dl . Nullhypothesen-signifikanztestung (NHST) erfolgte zweiseitig. Werte nach Korrektur für Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Harnstoffkonzentration und Serumkreatininkonzentration (jeweils dekadisch logarithmiert) im linearen Modell sind in Klammern angegeben. Effektstärken wurden errechnet als *Pearson's r*. Es gilt jeweils $n = 152$. dl: Deziliter; g: Gramm; mg: Milligramm; pmol: Pikomol; s: Sekunde

3.2.3 Subkohortenanalysen

Da die Nichtischämische-HI-Kohorte aus Studienteilnehmern großer Heterogenität bestand, wurde hier zusätzlich eine gesonderte Aufschlüsselung nach Ursache durchgeführt. Hierfür wurden die Patienten anhand ihrer histologischen Diagnose in Subkohorten mit gleicher Grunderkrankung wie in Tabelle 5 dargestellt eingeteilt. In der DCM-Subkohorte ($n = 68$), der Myokarditis-Subkohorte ($n = 29$) und der Andere-Nichtischämische-HI-Subkohorte ($n = 34$) zeigten sich keine Assoziationen zwischen der Hb-Konzentration und der OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität oder RCR (Abb. 8). In der Amyloidose-Subkohorte ($n = 15$) zeigten sich tendenzielle Korrelationen zwischen der Hb-Konzentration und der OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität und RCR mit kleiner bis mittlerer Effektstärke. In der Speichererkrankung-Subkohorte ($n = 3$) und der Unklare-Nichtischämische-HI-Subkohorte ($n = 3$) wurden wegen der geringen Fallzahlen keine statistischen Analysen durchgeführt.

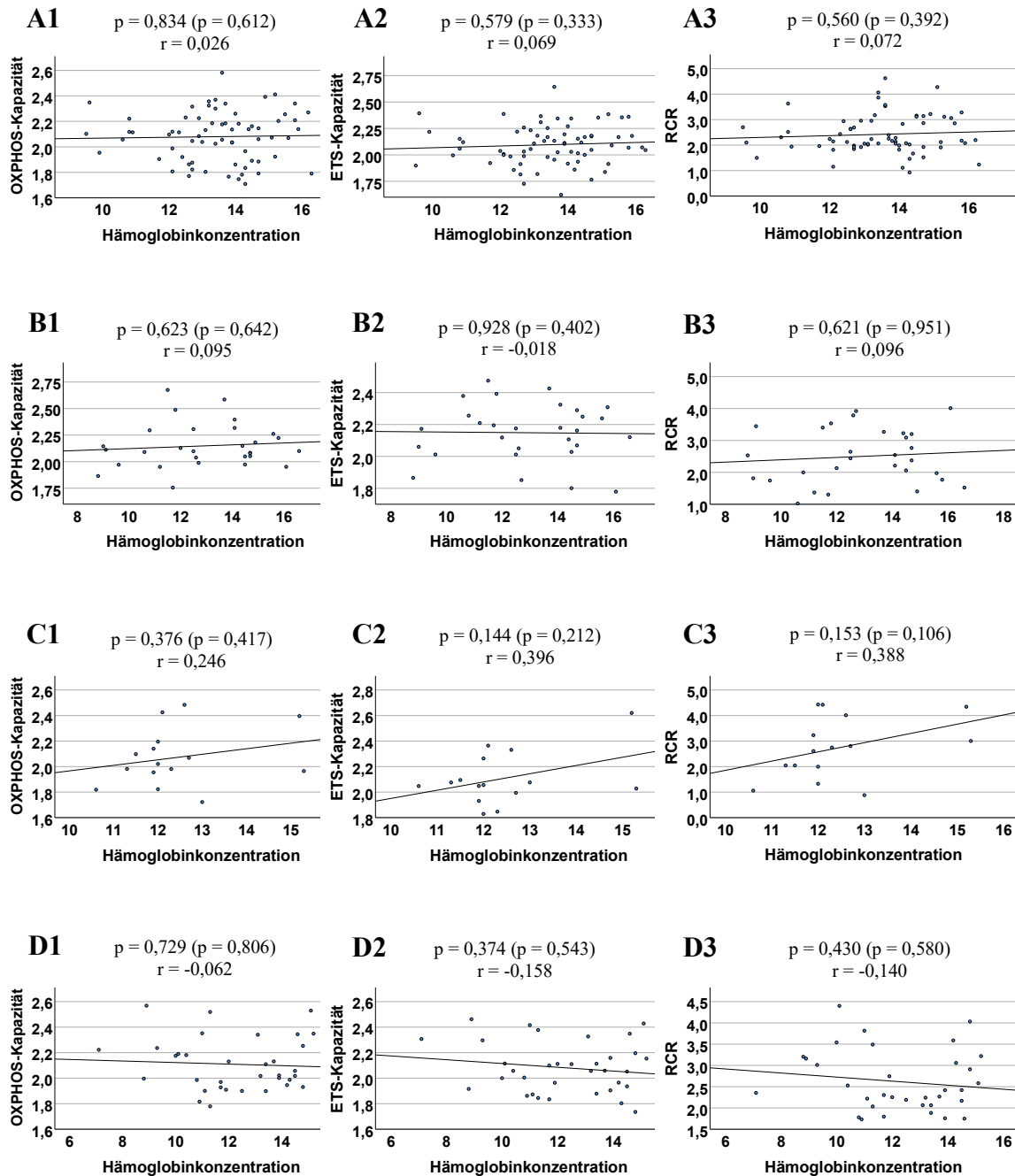


Abb. 8: Tendenzielle Korrelation zwischen Hämoglobinkonzentration und mitochondrialer oxidativer Kapazität in menschlichen Herzen mit Amyloidose, nicht jedoch in solchen mit dilatativer Kardiomyopathie, Myokarditis oder anderer nichtischämischer Herzinsuffizienz. Korrelationsanalyse zwischen Serumhämoglobinkonzentration und (1) oxidativer Phosphorylierungskapazität (OXPHOS-Kapazität), (2) *Electron-Transfer-System*-Kapazität (ETS-Kapazität) und (3) *respiratory control ratio* (RCR) in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien von Menschen mit Herzinsuffizienz aufgrund von (A) Dilatativer Kardiomyopathie, (B) Myokarditis, (C) Amyloidose und (D) anderer Ursache. Darstellungen als *scatter plots* mit Ausgleichsgeraden. OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität sind jeweils angegeben als O_2 -Flux in $\text{pmol} / (\text{s} \cdot \text{mg})$ und wurden dekadisch logarithmiert. Die Hämoglobinkonzentration ist jeweils angegeben in g / dl . Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) erfolgte zweiseitig. Werte nach Korrektur für Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Harnstoffkonzentration und Serumkreatininkonzentration (jeweils dekadisch logarithmiert) im linearen Modell sind in Klammern angegeben. Effektstärken wurden berechnet als *Pearson's r*. Es gilt jeweils $n = 68$ für A1 – A3, $n = 29$ für B1 – B3, $n = 15$ für C1 – C3 und $n = 34$ für D1 – D3. dl: Deziliter; g: Gramm; mg: Milligramm; pmol: Pikomol; s: Sekunde

3.3 Ischämische-HI-Kohorte

3.3.1 Charakteristika

Es wurden 38 Menschen mit ischämisch bedingter terminaler HI in die Auswertung eingeschlossen (Ischämische-HI-Kohorte), bei welchen eine LVAD-Implantation durchgeführt wurde. Von diesen 38 Studienteilnehmern wurden aufgrund ihrer Hb-Konzentration 20 Studienteilnehmer der Kontrollgruppe und 18 Studienteilnehmer der Anämiegruppe zugeteilt. Die beiden Gruppen unterschieden sich bezüglich der untersuchten Charakteristika neben der Hb-Konzentration im BMI. Eine ausführliche Darstellung der Charakteristika der Ischämische-HI-Kohorte findet sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Charakteristika der Ischämische-HI-Kohorte.

	Kontrollgruppe	Anämiegruppe	NHST
Anzahl	20	18	
Alter [Jahre]	59 ($\pm$ 8,3)	63,4 ($\pm$ 5,5)	p = 0,059
Männliches Geschlecht	17 / 20 (85 %)	16 / 18 (88,9 %)	p = 1,000
BMI [kg / (m ²)]	30,7 ($\pm$ 5,4)	26 ($\pm$ 3,7)	p = 0,003
LVEF [%]	18,6 ($\pm$ 8,2)	20,5 ($\pm$ 4,8)	p = 0,733
Diabetes in der Vorgeschichte	5 / 20 (25 %)	7 / 18 (38,9 %)	p = 0,489
Hypertension	13 / 20 (65 %)	10 / 18 (55,6 %)	p = 0,741
Dialysepflichtigkeit	1 / 20 (5 %)	1 / 17 (5,9 %)	p = 0,715
Hb-Konzentration [g / dl]	12,1 ($\pm$ 4,9)	9,1 ($\pm$ 0,8)	p < 0,001
Hämatokrit [%]	35,7 ($\pm$ 4,9)	31,4 ($\pm$ 3,7)	p = 0,075
Leukozytenzahl [1 / μ l]	9600 ($\pm$ 2748)	7274 ($\pm$ 3598)	p = 0,109
Thrombozytenzahl [1000 / μ l]	288,6 ($\pm$ 133,1)	217,8 ($\pm$ 128,2)	p = 0,238
Harnstoffkonzentration [mg / dl]	58,1 ($\pm$ 29,3)	68,3 ($\pm$ 38,6)	p = 0,657
Serumkreatininkonzentration [mg / dl]	1,4 ($\pm$ 0,7)	1,7 ($\pm$ 0,8)	p = 0,657

Männliches Geschlecht, Diabetes in der Vorgeschichte, Hypertension und Dialysepflichtigkeit sind als absolute und relative Häufigkeiten angegeben. Für diese Variablen erfolgte Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) mittels Chi-Quadrat-Tests. Alle anderen Variablen sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Für diese Variablen erfolgte die NHST mittels Mann-Whitney-U-Tests. Eine Korrektur für multiples Testen erfolgte

nicht. BMI: *Body mass index*; dl: Deziliter; g: Gramm; Hb: Hämoglobin; HI: Herzinsuffizienz; kg: Kilogramm; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; m: Meter; mg: Milligramm; µl: Mikroliter.

3.3.2 Myokardiale mitochondriale Funktion und Effizienz

Menschen mit terminaler ischämischer HI und Anämie wiesen eine geringere mitochondriale Kopplungseffizienz (RCR) im ventrikulären Myokard auf als solche ohne Anämie. Dieser Unterschied zeigte eine große Effektstärke und blieb auch nach Korrektur für den BMI bestehen (Abb. 9). Die LCR als Marker für den Entkopplungsgrad war hingegen in Studienteilnehmern mit Anämie nicht signifikant erhöht, auch wenn sich eine geringe Effektstärke im Sinne eines erhöhten mitochondrialen Entkopplungsgrades im ventrikulären Myokard von Menschen mit Anämie zeigte. Die mitochondriale Funktion (OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität) und der myokardiale Mitochondriengehalt (CSA pro Gewebe- bzw. Proteinmasse) unterschieden sich nicht signifikant zwischen Menschen mit und ohne Anämie, auch wenn sich bei allen Variablen konstante geringe Effektstärken als Hinweis auf eine mögliche eingeschränkte myokardiale Mitochondrienfunktion und -dichte bei Anämie zeigten.

Die Hb-Konzentration im Serum korrelierte tendenziell mit der RCR, wobei dieser Zusammenhang nicht statistisch signifikant war, und sich eine geringe Effektstärke zeigte (Abb. 10). Die LCR als Marker für den mitochondrialen Entkopplungsgrad wies eine negative Korrelation geringer Effektstärke mit der Hb-Konzentration auf, auch wenn diese Korrelation nicht statistisch signifikant war. Gleichmaßen korrelierten Marker der myokardialen Mitochondrienfunktion (OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität) und der myokardialen Mitochondriendichte (CSA pro Probengewicht und CSA pro Proteinmasse) nicht signifikant mit der Hb-Konzentration, obwohl in allen Fällen die Korrelationskoeffizienten auf eine nicht signifikante geringe positive Korrelation mit der Hb-Konzentration hindeuteten.

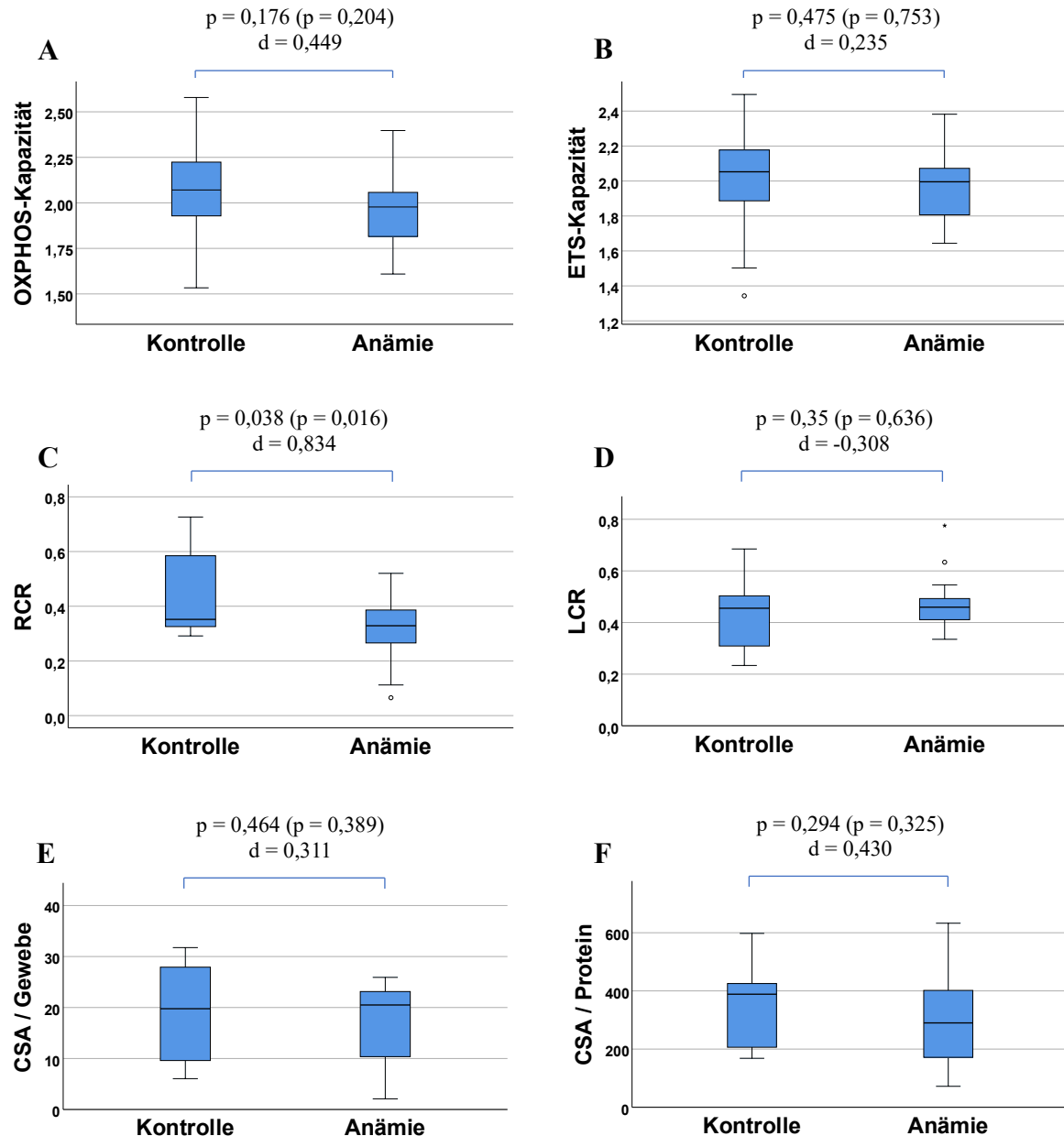


Abb. 9: Niedrigere mitochondriale Kopplungseffizienz, oxidative Kapazität und Mitochondriendichte bei Anämie in ischämisch bedingt insuffizienten menschlichen Herzen. Bei Menschen mit ischämisch bedingter terminaler Herzinsuffizienz ist Anämie mit (C) einer starken Verringerung der *respiratory control ratio* (RCR), und mit (D) einer tendenziellen Erhöhung der *LEAK control ratio* (LCR), sowie einer tendenziell niedrigeren (A) oxidativen Phosphorylierungskapazität (OXPHOS-Kapazität), (B) *Electron-Transfer-System*-Kapazität (ETS-Kapazität), (E) Citrat-Synthase-Aktivität (CSA) pro Gewebemasse und (F) CSA pro Proteinmasse im ventrikulären Myokard assoziiert, welches herzchirurgisch bei Implantation von *left ventricular assist devices* (LVAD) gewonnen wurde. OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität sind jeweils angegeben als O_2 -Flux in $\text{pmol} / (\text{s} \cdot \text{mg})$ und wurden dekadisch logarithmiert, ebenso wie die RCR. Die CSA ist jeweils angegeben in $\text{nmol} / (\text{min} \cdot \text{mg Gewebe})$ bzw. $\text{nmol} / (\text{min} \cdot \text{mg Protein})$. Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) erfolgte jeweils zweiseitig mittels Mann-Whitney-U-Tests im Fall der RCR und mittels unabhängigen t-Tests in allen anderen Fällen. Werte nach Korrektur für BMI im linearen Modell sind in Klammern dargestellt. Effektstärken wurden berechnet als *Cohen's d*. Für A - D gilt jeweils $n = 20$ für die Kontrollgruppe und $n = 18$ für die Anämiegruppe. Für E gilt $n = 12$ für die Kontrollgruppe und $n = 11$ für die Anämiegruppe. Für F gilt $n = 13$ für die Kontrollgruppe und $n = 12$ für die Anämiegruppe. mg: Milligramm; min: Minute; nmol: Nanomol; pmol: Pikomol; s: Sekunde

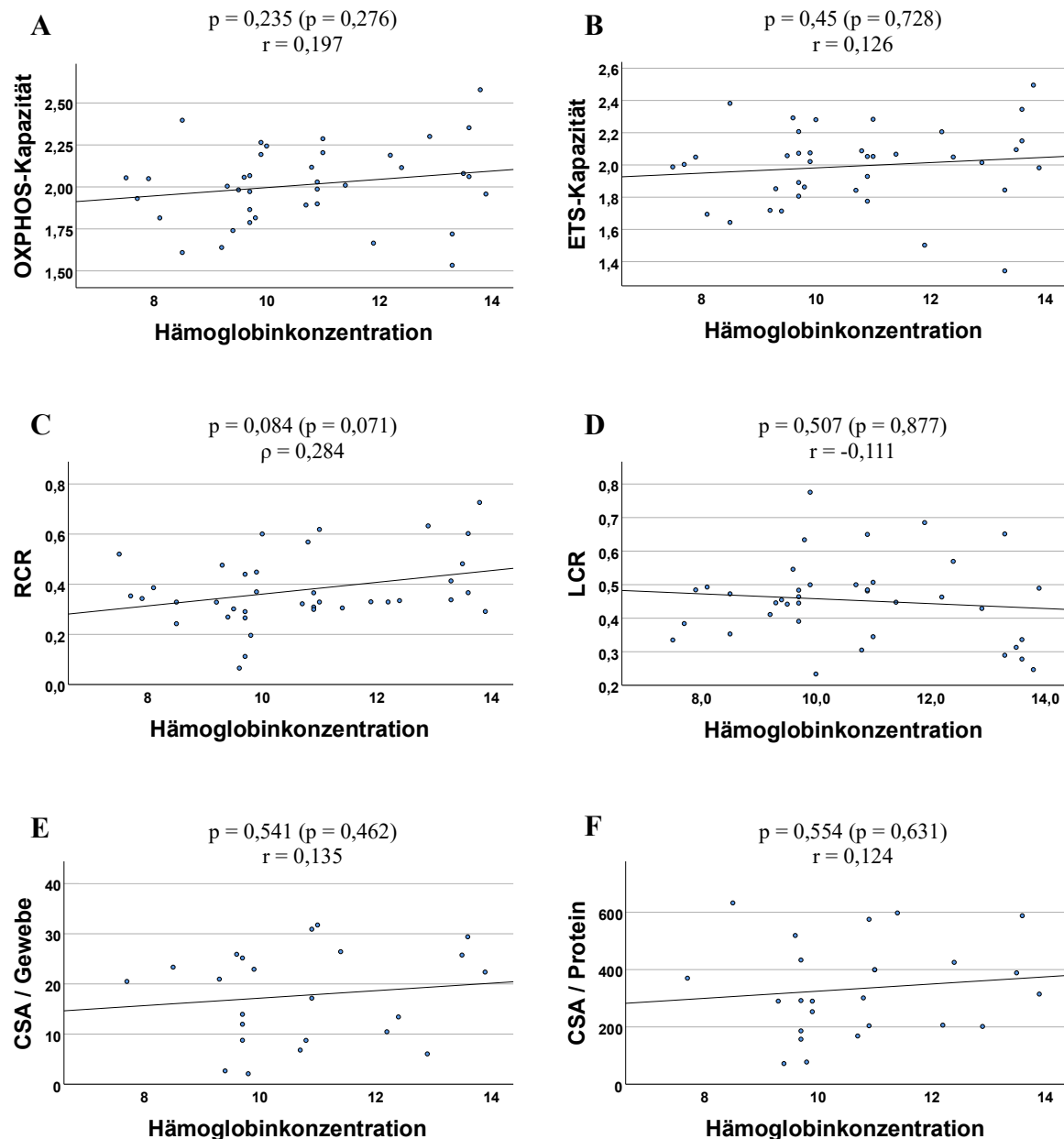


Abb. 10: Tendenzielle Korrelation zwischen Hämoglobinkonzentration und mitochondrialer oxidativer Kapazität, mitochondrialer Kopplungseffizienz und Mitochondriengehalt in ischämisch bedingt insuffizienten menschlichen Herzen. Bei Menschen mit ischämisch bedingter terminaler Herzinsuffizienz korreliert die Serumhämoglobinkonzentration jeweils tendenziell, wenn auch nicht signifikant, (A) mit der oxidativen Phosphorylierungskapazität (OXPHOS-Kapazität) und (B) mit der Electron-Transfer-System-Kapazität (ETS-Kapazität), ebenso wie mit (C) der respiratory control ratio (RCR), (D) der LEAK control ratio (LCR), (E) der Citrat-Synthase-Aktivität (CSA) pro Gewebemasse und (F) der CSA pro Proteinmasse im ventrikulären Myokard, welches herzchirurgisch bei Implantation von *left ventricular assist devices* (LVAD) gewonnen wurde. In allen Fällen zeigten sich konkordante geringe Effektstärken ohne statistische Signifikanz in der untersuchten Kohorte. Darstellungen als *scatter plots* mit Ausgleichsgeraden. OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität sind jeweils angegeben als O_2 -Flux in $\text{pmol} / (\text{s} \cdot \text{mg})$ und wurden dekadisch logarithmiert, ebenso wie die RCR. Die CSA ist jeweils angegeben in $\text{nmol} / (\text{min} \cdot \text{mg Gewebe})$ bzw. $\text{nmol} / (\text{min} \cdot \text{mg Protein})$. Die Hämoglobinkonzentration ist jeweils angegeben in g / dl . Nullhypothesensignifikanztestung (NHST) erfolgte zweiseitig. Werte nach Korrektur für BMI sind in Klammern dargestellt. Effektstärken wurden errechnet als *Spearman's ρ* im Falle der RCR und als *Pearson's r* in allen anderen Fällen. Es gilt jeweils $n = 38$ für A – D. Für E gilt $n = 23$ und für F gilt $n = 25$. dl: Deziliter; g: Gramm; mg: Milligramm; min: Minute; nmol: Nanomol; pmol: Pikomol; s: Sekunde

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals der Zusammenhang zwischen Anämie und myokardialer Mitochondrienfunktion in Menschen ohne HI und Menschen mit HI unterschiedlicher Genese untersucht. In Bezug auf die Ausgangshypothesen lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit folgendermaßen zusammenfassen:

- I. Bei Menschen ohne HI ist Anämie mit einer niedrigeren mitochondrialen oxidativen Kapazität bei erhaltener mitochondrialer Kopplungseffizienz im Myokard assoziiert.
- II. Bei Menschen mit nichtischämischer HI ist Anämie weder mit veränderter mitochondrialer oxidativer Kapazität noch mit veränderter mitochondrialer Kopplungseffizienz im Myokard assoziiert.
- III. Bei Menschen mit terminaler ischämischer HI ist Anämie mit einer niedrigeren mitochondrialen Kopplungseffizienz im Myokard assoziiert. Es zeigt sich eine tendenzielle nicht statistisch signifikante Assoziation von Anämie mit niedrigerer mitochondrialer oxidativer Kapazität und erniedrigtem myokardialen Mitochondriengehalt.

4.1 Charakteristika der Kohorten

Die in der Studie untersuchten Teilnehmer stellten über alle drei Kohorten hinweg eine typische Population kardial erkrankter Menschen dar und wiesen mit einem erhöhten Alter, hauptsächlich männlichem Geschlecht, erhöhtem BMI und häufigen Komorbiditäten wie arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus typische Charakteristika dieser Population auf. Im Folgenden werden die Unterschiede zwischen Menschen mit und ohne Anämie hinsichtlich der Charakteristika in den drei untersuchten Kohorten diskutiert.

In der Post-HTX-Kohorte zeigte sich, dass bei Menschen mit Anämie die HTX signifikant weniger lang zurücklag. Dies lässt sich als Hinweis darauf interpretieren, dass Menschen mit Anämie eine höhere Mortalität nach einer HTX aufweisen als solche ohne Anämie. Frühere Studien zu diesem Thema kamen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen: Grundsätzlich ist Anämie vor kardiochirurgischen Operationen zwar als Marker für postoperative Mortalität gut etabliert [182]. Auch speziell in Empfängern einer Herztransplantation zeigte eine retrospektive Studie eine höhere Prävalenz von Anämie in verstorbenen Menschen im Vergleich mit überlebenden [183]. Andere Studien lieferten jedoch Hinweise darauf, dass lediglich eine präoperative, nicht jedoch die postoperative Anämie einen Prädiktor für die Mortalität nach einer HTX darstellt [184, 185].

In Menschen mit nichtischämischer HI war Anämie mit einem niedrigeren Hämatokrit assoziiert. Dies ist logisch nachvollziehbar, da der Hämatokrit selbst ein Maß für die Menge korpuskulärer Bestandteile im Blut darstellt, welche größtenteils den Erythrozyten entsprechen. Darüber hinaus war Anämie mit einer höheren Serumkreatinin- und Harnstoffkonzentration assoziiert. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sowohl eine erhöhte Serumkreatininkonzentration [186-189] als auch eine erhöhte Konzentration von Harnstoff im Blut [190-192] Zeichen einer gestörten Nierenfunktion sind. Eine gestörte Nierenfunktion wiederum ist eine häufige Ursache für Anämie [193-195]. Dementsprechend sind erhöhte Level von Harnstoff mit Anämie assoziiert [196]. Auch in Menschen mit HI ist

die Korrelation von erhöhten Serumkreatininkonzentrationen mit Anämie bereits beschrieben [63]. Als weiteres Charakteristikum wiesen in der Nichtischämische-HI-Kohorte Menschen mit Anämie höhere Konzentrationen an Leukozyten und Thrombozyten auf als solche ohne Anämie. Inflammation spielt häufig eine Rolle in der Pathogenese von Anämie, sodass auch eine Erhöhung von Leukozyten und Thrombozyten, welche bei Infektionen typischerweise erhöht sind, in Patienten mit Anämie bekannt und bereits beschrieben ist [197, 198]. Es sei angemerkt, dass jedoch vereinzelt auch dem widersprechende Ergebnisse publiziert wurden, wie in einer kleinen Studie aus Indien, welche verringerte Thrombozytenzahlen in Patienten mit Anämie feststellte [199]. Dies könnte auf einen Mangel in der Ernährung zurückzuführen sein. Insgesamt kann, insbesondere in Deutschland als einem Land, in dem Mangelernährung ein weniger gravierendes Problem darstellt, und in chronisch kardial erkrankten Patienten, dennoch von tendenziell höheren Leukozyten- und Thrombozytenzahlen ausgegangen werden.

In der Ischämische-HI-Kohorte wiesen Patienten mit Anämie einen signifikant niedrigeren BMI auf als Patienten ohne Anämie. In der Vergangenheit sind verschiedene Untersuchungen zu unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf den Zusammenhang zwischen BMI und Hb-Konzentration gekommen. Ursächlich könnten zwei entgegengesetzte Mechanismen sein: einerseits ist in einer Reihe von Schwellen- und Entwicklungsländern eine negative Korrelation zwischen BMI und Anämierisiko beschrieben worden [200-205], was daran liegen könnte, dass Unterernährung das Risiko für Eisenmangel, den häufigsten Grund für Anämie in Entwicklungsländern, erhöht. Dabei sei angemerkt, dass viele der genannten Studien an Kindern oder Frauen im gebärfähigen Alter durchgeführt wurden. Demgegenüber ist Übergewicht bekanntermaßen mit chronischen Entzündungsprozessen im Körper assoziiert [206], welche ihrerseits mit Anämie assoziiert sind. Dies könnte erklären, warum eine Studie aus Marokko kürzlich zum Ergebnis einer positiven Korrelation zwischen BMI und Anämierisiko gekommen ist [207]. Insbesondere in Ländern mit einem größeren Risiko für Über- als Untergewicht könnte dieser Mechanismus stärker ins Gewicht fallen als mögliche Risiken eines Eisenmangels bei Unterernährung. Eine Studie aus den Vereinigten Staaten von Amerika fand in Patienten mit Übergewicht zwar höhere Ferritinkonzentrationen und niedrigere Transferrinsättigungen, so wie es bei chronischen Entzündungen zu erwarten ist, jedoch kein signifikant verändertes Risiko für Anämie [208].

In allen drei Kohorten führte eine Korrektur um die sich zwischen den Gruppen unterscheidenden Charakteristika im linearen Modell nicht zu einer bemerkenswerten Änderung der Ergebnisse.

4.2 Anämie als therapeutisches Ziel bei Herzinsuffizienz

Die Behandlung von Anämie ist ein vielversprechender und vieldiskutierter Ansatz in der Therapie von HI [209-211]. Zwei häufige Ursachen von Anämie in Menschen mit HI sind Eisenmangel und chronische Nierenerkrankungen [212-214]. Aus diesem Grund bestehen zwei wichtige Ansätze zur Behandlung von Anämie in dieser Gruppe in der oralen oder intravenösen Eisensubstitution und der Gabe Erythropoese-induzierender Substanzen. Intravenöse Eisensubstitution hat sich bisher als effektiver herausgestellt als orale

Eisensubstitution [215]. Erythropoese-induzierende Substanzen werden kontrovers diskutiert, insbesondere wegen ihres Nebenwirkungsprofils [213, 215, 216].

Im Einklang mit diesen Ergebnissen empfiehlt die ESC aktuell in ihren Leitlinien zur HI [1] ein regelmäßiges Screening auf Anämie und Eisenmangel (welche laut Leitlinien unabhängig voneinander bestehen können) mittels Blutbild, Serumferritinkonzentration und Transferrinsättigung. Während sowohl orale Eisensubstitution als auch Erythropoetin-stimulierende Substanzen ausdrücklich nicht empfohlen werden, soll gemäß Leitlinien eine intravenöse Eisensubstitution mittels Eisencarboxymaltose bei laborchemisch nachgewiesenem Eisenmangel und LVEF < 45 % zur Symptumlinderung erwogen werden. Bei kürzlich erfolgter Hospitalisation wird bei bestehendem Eisenmangel bereits ab einer LVEF < 50 % empfohlen, eine intravenöse Eisensubstitution zu erwägen, um das Risiko für Re-Hospitalisierung zu senken [217]. In diesen Fällen unterscheiden die Leitlinien interessanterweise nicht zwischen HI unterschiedlicher Genese, sondern empfehlen die Erwägung einer Eisensubstitution unabhängig von der Ursache der HI. Eine mögliche Ursache für den positiven Effekt einer Eisensubstitution auf HI könnte darin bestehen, dass die Enzyme der Atmungskette Eisen-Schwefel-Cluster enthalten [83] und damit vom Vorhandensein ausreichender Eisenspeicher abhängig sind. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass ein Eisenmangel mit einer verringerten Aktivität der Atmungskettenkomplexe [218] und einer vermehrt glucolytischen Stoffwechsellage im Herzmuskel assoziiert ist [219]. Auch in Zellkulturen menschlicher Kardiomyozyten führte die Induktion von Eisenmangel durch Chelatoren zu einer verminderten Aktivität der Atmungskettenkomplexe, des intrazellulären ATP-Spiegels und der Kontraktilität [220]. Diese Effekte waren durch Eisensubstitution reversibel.

Die vorliegende Arbeit untersucht zwar keine Intervention, trotzdem zeigen die hier erhobenen Daten einen Zusammenhang zwischen Anämie und myokardialer Mitochondrienfunktion. Ob Anämie mit verringerter myokardialer Mitochondrienfunktion in dieser Studie assoziiert war, hing u.a. von der Ursache der HI ab. Im Folgenden werden die verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Gruppen einzeln betrachtet.

4.3 Anämie in Menschen ohne Herzinsuffizienz

Die vorliegenden Daten weisen entsprechend dem o.g. Ergebnis darauf hin, dass in Menschen ohne HI Anämie sowie die damit einhergehende verringerte Hämoglobinkonzentration mit einer verminderten OXPHOS- und ETS-Kapazität assoziiert sind. Ob Anämie dabei einen ursächlichen Faktor oder lediglich einen begleitenden Marker der verschlechterten Mitochondrienfunktion darstellt, ist jedoch nicht abschließend geklärt. Ein positiver Effekt der Behandlung von Anämie auf die Prognose herztransplantierte Menschen ist bisher nur wenig belegt. Ein systematisches Review aus dem Jahr 2015 kam zu dem Ergebnis, dass in kardiochirurgischen Operationen generell nur sehr unzureichende Evidenz für den positiven Effekt perioperativer Anämiebehandlung auf die Prognose existiert [221]. Es ist zu beachten, dass in dieses systematische Review keine Studien miteingeschlossen wurden, die Herztransplantationen untersuchten. Eine kleine Studie an Menschen mit Herztransplantation und Niereninsuffizienz kam jedoch zu dem Ergebnis, dass eine Therapie von Anämie mit Erythropoetin mit einer Verbesserung der Lebensqualität assoziiert war [222].

Blickt man über die relativ kleine Population herztransplantierte Menschen hinaus, so kann das transplantierte Herz auch als Modell für gesunde Herzen betrachtet werden [105, 223], und kann damit als Modell für frühe Stadien in der Entstehung von HI vor dem klinischen Auftreten einer manifesten HI interpretiert werden. Die aus den vorliegenden Daten entstehende Beobachtung, dass in der frühen, subklinischen Entwicklung von HI das Auftreten von Anämie mit einer verschlechterten myokardialen Mitochondrienfunktion assoziiert ist, deckt sich mit der Beobachtung aus früheren Studien, dass in Menschen ohne klinisch manifeste HI das Vorliegen von Anämie das Risiko für die Entwicklung von HI erhöht [73, 75].

Es ist anzumerken, dass in der Vergangenheit nicht alle Studien einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung von HI und verringerter myokardialer Mitochondrienfunktion gefunden haben: einige Studien unterstützen die Hypothese abnehmender Mitochondrienfunktion mit zunehmender HI [158, 224], andere jedoch beschreiben eine erhaltene [225] oder sogar gesteigerte [226] mitochondriale Funktion im Myokard herzinsuffizienter Menschen verglichen mit gesunden Donorherzen. Dabei sind jedoch die geringen Fallzahlen in den Studien zu beachten. In Zusammenschau der bisherigen Evidenz zeigt sich insgesamt das Bild einer eingeschränkten myokardialen Mitochondrienfunktion bei HI [227, 228], was zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit passt.

Jedoch ist auch hier nicht abschließend geklärt, ob Anämie eine Ursache oder lediglich einen Marker in der Entstehung von HI darstellt. Zukünftige Studien sollten sich mit der Frage beschäftigen, ob eine Behandlung von Anämie in Menschen ohne HI das Auftreten von HI verzögern oder sogar verhindern kann.

4.4 Anämie bei Menschen mit nichtischämischer Herzinsuffizienz

In Menschen mit bestehender HI ist der negative Effekt von Anämie auf die Prognose bereits belegt [64-66, 68, 72, 74, 229]. Erste Studien haben in den vergangenen Jahren Hinweise darauf geliefert, dass die Behandlung von Anämie mittels intravenöser Eisensubstitution in Menschen mit HI die Symptomlast und Lebensqualität [213] sowie kardiovaskuläre Mortalität und Gesamtmortalität [230] senken kann, was sich mit den Empfehlungen aus den Leitlinien der ESC zur intravenösen Eisensubstitution deckt [1]. Vergangene Studien haben jedoch die Ursache der HI nicht berücksichtigt. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten sprechen interessanterweise gegen einen relevanten Effekt der Anämie auf den myokardialen Energiestoffwechsel bei Menschen mit nichtischämischer HI.

In einer Aufschlüsselung nach spezifischer Ursache sprachen die in dieser Arbeit vorliegenden Daten insbesondere gegen einen relevanten Effekt von Anämie bei HI durch DCM oder Myokarditis. Seltener Ursachen sind aufgrund der niedrigen Fallzahlen schwieriger zu beurteilen. Eine Ausnahme könnte in der durch Amyloidose bedingten HI liegen: Die in der Arbeit ermittelten Effektstärken weisen auf eine geringe bis mittelstarke Assoziation der Anämie mit mitochondrialer oxidativer Kapazität und Kopplungseffizienz hin, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Das könnte möglicherweise an der geringen Fallzahl von $n = 15$ liegen. Hier ist weitere gezielte Forschung mit mehr

Studienteilnehmern notwendig, um einen Effekt von Anämie auf die Mitochondrienfunktion zu beweisen oder widerlegen.

Insgesamt ließ sich ein relevanter Einfluss von Anämie auf die myokardiale Mitochondrienfunktion in Menschen mit nichtischämisch bedingter HI nicht bestätigen. Es werden weitere Studien benötigt, um herauszufinden, ob der positive Effekt, den eine Korrektur von Anämie in Menschen mit HI zu haben scheint [213], in allen Menschen mit HI auftritt, oder ob bestimmte Formen der HI, insbesondere nichtischämisch bedingte Formen, möglicherweise von diesem positiven Effekt ausgenommen sind.

4.5 Anämie in Menschen mit terminaler ischämischer Herzinsuffizienz

In Menschen mit terminaler ischämischer HI weisen die vorliegenden Daten auf einen Zusammenhang zwischen Anämie und verminderter mitochondrialer Kopplungseffizienz hin. Gleichzeitig zeigen die Daten keinen Einfluss von Anämie auf oxidative Kapazität oder Mitochondriengehalt. Das deutet darauf hin, dass bei gleichbleibendem oder leicht verringertem Mitochondriengehalt und gleicher oxidativer Kapazität ein erhöhter Teil der Respiration nicht zur ATP-Generierung beiträgt, was zumindest in der Theorie die Energiebereitstellung einschränkt. Wie oben beschrieben stellt eine eingeschränkte Energiebereitstellung einen Schlüsselmechanismus in der Entstehung von HI dar [122]. Vor diesem Hintergrund könnte eine Behandlung von Anämie bei Menschen mit ischämischer HI die Schwere und ggf. den Progress von HI vermindern. Die vorliegende Arbeit liefert damit einen möglichen Mechanismus, der die Verbesserung von Symptomlast und Lebensqualität durch die Behandlung von Anämie in Menschen mit ischämischer HI erklären könnte, wie sie an anderer Stelle festgestellt wurde [213]. Es ist zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit lediglich Patienten mit terminaler ischämischer HI untersucht wurden, bei denen eine LVAD-Implantation notwendig war. Weniger schwere Krankheitsstadien der ischämischen HI wurden nicht untersucht.

Dass in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang von Anämie mit verringerter myokardialer mitochondrialer Kopplung in Menschen mit ischämischer HI, nicht aber in Menschen mit nichtischämischer HI gefunden wurde, deckt sich mit einer Arbeit von Duicu et al. [231]. In dieser Arbeit wurde chirurgisch gewonnenes atriales Myokard permeabilisiert und einer HRR unterzogen, wobei sich in ischämisch erkrankten Herzen eine niedrigere RCR (sowie OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität) verglichen mit valvulär erkrankten Herzen zeigte. Obwohl in jener Arbeit nicht der Einfluss von Anämie untersucht wurde und geringe methodische Unterschiede zur vorliegenden Arbeit bestehen, lässt sich hypothesieren, dass bei ischämischer Herzerkrankung die mitochondriale Kopplungseffizienz stärker eingeschränkt ist als bei valvulären Herzerkrankungen, welche dem nichtischämischen Spektrum zugeordnet werden müssen. Möglicherweise reagieren Letztere aus diesem Grund empfindlicher auf Anämie, was die mitochondriale Kopplungseffizienz weiter einschränkt. Melenovsky et al. [139] kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass in Menschen mit HI myokardialer Eisenmangel mit stärkerer koronarer Herzerkrankung und mit einer verringerten Expression von antioxidativ wirkenden Enzymen wie Katalase, Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase 2 assoziiert ist. Dies passt zu dem in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnis eines Zusammenhangs von

Anämie mit einer erhöhten myokardialen mitochondrialen Entkopplung in Menschen mit ischämisch bedingter HI, nicht aber in Menschen mit nichtischämisch bedingter HI.

4.6 Limitationen

Eine mögliche Limitation der Arbeit besteht darin, dass für die Untersuchung von Menschen ohne HI als modellhafte Population Menschen mit Herztransplantation herangezogen wurden. Auch wenn diese Kohorte herztransplantierte Menschen in der Vergangenheit bereits wiederholt als Modell vormals gesunder Herzen genutzt wurde [156, 223], muss dennoch beachtet werden, dass herztransplantierte Menschen oft ein ausgeprägtes Profil an Komorbiditäten besitzen und häufig Medikamente, insbesondere Immunsuppressiva, einnehmen. Um diesem Problem zu begegnen, wurden in der statistischen Auswertung die Charakteristika der Gruppen, einschließlich der Einnahme verschiedener Immunsuppressiva, verglichen, um einer Verzerrung der Ergebnisse entgegenzuwirken. Eine weitere Limitation bestand in der geringen Fallzahl in einigen Subkohorten, die aus Menschen mit nichtischämischer HI seltenerer Ursachen gebildet wurden. Insbesondere sind hier Menschen mit Amyloidose und Menschen mit Speichererkrankungen zu nennen, bei denen die Fallzahl in der vorliegenden Arbeit nicht zu interpretierbaren Ergebnissen ausreichte. Insbesondere in diesen Fällen sind weitere Studien an größeren Kohorten notwendig, um den möglichen Zusammenhang zwischen Anämie und myokardialer Mitochondrienfunktion zu untersuchen. Darüber hinaus konnte bei der Akquisition von EMBs nicht genug Myokard gewonnen werden, um eine Bestimmung der CSA durchzuführen, sodass der myokardiale Mitochondriengehalt in Menschen ohne HI und Menschen mit nichtischämisch bedingter HI leider nicht untersucht werden konnte. Darüber hinaus sollte beachtet werden, dass bei der Verwendung von EMBs die subendokardialen Anteile des Myokards repräsentiert werden. Subepikardiale Anteile des Myokards werden in der Messung hingegen nicht erfasst. Außerdem stammten die verwendeten EMBs ausschließlich aus der rechten Seite des interventrikulären Septums oder – im Fall der LVAD-Proben – aus dem Bereich der Herzspitze. Es bleibt daher unklar, ob die erhaltenen Ergebnisse auf das gesamte Ventrikelmyokard übertragbar sind, wenngleich neuere Studien diese Übertragbarkeit bezüglich der mitochondrialen oxidativen Kapazität postulieren [105, 123, 124, 158, 232]. Eine weitere Limitation der Arbeit besteht darin, dass das verwendete SUIT-Protokoll die kombinierte Respiration über mehrere Atmungskettenkomplexe misst. Es sollte daher beachtet werden, dass keine spezifischen Aussagen über einzelne Atmungskettenkomplexe getroffen werden können. Zuletzt sollte angemerkt werden, dass in der vorliegenden Arbeit keine Ursachen für Anämie wie beispielsweise Eisenmangel miteinbezogen wurden. Es bleibt daher unklar, ob die Ursache der Anämie einen Einfluss auf die Assoziation zwischen Hb-Konzentration und myokardialer Mitochondrienfunktion nimmt.

5 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals eine direkte Assoziation zwischen Anämie und einer verringerten myokardialen Mitochondrienfunktion. Diese Assoziation zeigt sich in Menschen ohne HI und in Menschen mit ischämisch bedingter terminaler HI, nicht aber in Menschen mit nichtischämisch bedingter HI. Die Arbeit unterstreicht damit die wichtige Rolle von Anämie in der Pathogenese von HI. Ob eine therapeutische Korrektur von Anämie die myokardiale Mitochondrienfunktion verbessern kann, und ob die Behandlung von Anämie über diesen Mechanismus die Entstehung und das Voranschreiten von HI verlangsamen kann, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. McDonagh, T.A., et al., *2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.* Eur J Heart Fail, 2022. **24**(1): p. 4-131.
2. Heidenreich, P.A., et al., *2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines.* J Am Coll Cardiol, 2022. **79**(17): p. e263-e421.
3. Rigolli, M., et al., *Bias associated with left ventricular quantification by multimodality imaging: a systematic review and meta-analysis.* Open Heart, 2016. **3**(1): p. e000388.
4. White, P.D. and M. Myers, *The classification of cardiac diagnosis.* Jama, 1921. **77**(18): p. 1414-1415.
5. Caraballo, C., et al., *Clinical Implications of the New York Heart Association Classification.* J Am Heart Assoc, 2019. **8**(23): p. e014240.
6. Baldus, S., et al., *Die Nationale Herz-Allianz – Update 2023.* Die Kardiologie, 2023. **17**(2): p. 65-71.
7. Dornquast, C., et al., *Regional Differences in the Prevalence of Cardiovascular Disease.* Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(42): p. 704-711.
8. Ensminger, S., et al., *Der Deutsche Herzbericht – Update 2024 – Eine Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse.* Die Kardiologie, 2024. **18**(6): p. 476-484.
9. Dörr, M., et al., *Hospitalizations for heart failure: still major differences between East and West Germany 30 years after reunification.* ESC Heart Fail, 2021. **8**(4): p. 2546-2555.
10. Störk, S., et al., *Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study.* Clin Res Cardiol, 2017. **106**(11): p. 913-922.
11. Christ, M., et al., *Heart failure epidemiology 2000-2013: insights from the German Federal Health Monitoring System.* Eur J Heart Fail, 2016. **18**(8): p. 1009-18.
12. Christa, M. and C. Maack, *Systemerkrankung Herzinsuffizienz.* Die Kardiologie, 2024. **18**(2): p. 135-142.
13. Roller-Wirnsberger, R. and J.M. Bauer, *Prävention im Alter: Eine verpasste Chance in Zeiten des demografischen Wandels?* Z Gerontol Geriatr, 2024. **57**(6): p. 431-434.
14. Schmidt, S., et al., *Demographic change and its impact on the health-care budget for heart failure inpatients in Germany during 1995-2025.* Herz, 2013. **38**(8): p. 862-7.
15. Ziaeian, B. and G.C. Fonarow, *Epidemiology and aetiology of heart failure.* Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(6): p. 368-78.
16. Gong, F.F., et al., *Risk factors for incident heart failure with preserved or reduced ejection fraction, and valvular heart failure, in a community-based cohort.* Open Heart, 2018. **5**(2): p. e000782.
17. He, J., et al., *Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study.* Arch Intern Med, 2001. **161**(7): p. 996-1002.
18. Jacobs, L., et al., *Risk for Incident Heart Failure: A Subject-Level Meta-Analysis From the Heart "OMics" in AGEing (HOMAGE) Study.* J Am Heart Assoc, 2017. **6**(5).

19. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3068-72.
20. Chamberlain, A.M., et al., *Risk Factors for Heart Failure in the Community: Differences by Age and Ejection Fraction*. Am J Med, 2020. **133**(6): p. e237-e248.
21. Lawson, C.A., et al., *Risk Factors for Heart Failure: 20-Year Population-Based Trends by Sex, Socioeconomic Status, and Ethnicity*. Circ Heart Fail, 2020. **13**(2): p. e006472.
22. Borné, Y., et al., *Country of birth and risk of hospitalization due to heart failure: a Swedish population-based cohort study*. Eur J Epidemiol, 2011. **26**(4): p. 275-83.
23. Visseren, F.L.J., et al., *2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice*. Eur Heart J, 2021. **42**(34): p. 3227-3337.
24. Pandey, A., et al., *Dose-Response Relationship Between Physical Activity and Risk of Heart Failure: A Meta-Analysis*. Circulation, 2015. **132**(19): p. 1786-94.
25. Ferreira, J.P., et al., *Proteomic Bioprofiles and Mechanistic Pathways of Progression to Heart Failure*. Circ Heart Fail, 2019. **12**(5): p. e005897.
26. Triposkiadis, F., A. Xanthopoulos, and J. Butler, *Cardiovascular Aging and Heart Failure: JACC Review Topic of the Week*. J Am Coll Cardiol, 2019. **74**(6): p. 804-813.
27. Caturano, A., et al., *Cardiac Hypertrophy: From Pathophysiological Mechanisms to Heart Failure Development*. Rev Cardiovasc Med, 2022. **23**(5): p. 165.
28. de Oliveira, M.T., Jr., et al., *Heart failure management with β -blockers: can we do better?* Curr Med Res Opin, 2024. **40**(sup1): p. 43-54.
29. Dirkx, E., P.A. da Costa Martins, and L.J. De Windt, *Regulation of fetal gene expression in heart failure*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(12): p. 2414-24.
30. Jia, G., M.A. Hill, and J.R. Sowers, *Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity*. Circ Res, 2018. **122**(4): p. 624-638.
31. Luo, M. and M.E. Anderson, *Mechanisms of altered Ca^{2+} handling in heart failure*. Circ Res, 2013. **113**(6): p. 690-708.
32. Tsutsui, H., S. Kinugawa, and S. Matsushima, *Oxidative stress and heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(6): p. H2181-90.
33. Huss, J.M. and D.P. Kelly, *Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 547-55.
34. Gallo, G., S. Rubattu, and M. Volpe, *Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure: From Pathophysiological Mechanisms to Therapeutic Opportunities*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(5).
35. Bayeva, M., M. Gheorghiade, and H. Ardehali, *Mitochondria as a therapeutic target in heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(6): p. 599-610.
36. Wu, Q.Q., et al., *Mechanisms contributing to cardiac remodelling*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(18): p. 2319-2345.
37. Organization, W.H., *Guideline on haemoglobin cutoffs to define anaemia in individuals and populations*. 2024, Geneva.
38. Patel, K.V., *Epidemiology of anemia in older adults*. Semin Hematol, 2008. **45**(4): p. 210-7.
39. Pasricha, S.R. and G. Moir-Meyer, *Measuring the global burden of anaemia*. Lancet Haematol, 2023. **10**(9): p. e696-e697.
40. Chaparro, C.M. and P.S. Suchdev, *Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries*. Ann N Y Acad Sci, 2019. **1450**(1): p. 15-31.
41. Tolentino, K. and J.F. Friedman, *An update on anemia in less developed countries*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(1): p. 44-51.

42. Saxena, R., S. Chamoli, and M. Batra, *Clinical evaluation of different types of anemia*. World, 2018. **2**(1): p. 26-30.
43. Safiri, S., et al., *Burden of anemia and its underlying causes in 204 countries and territories, 1990-2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019*. J Hematol Oncol, 2021. **14**(1): p. 185.
44. Prasanth, R. *Prevalence of Anemia in both Developing and Developed Countries around the World*. 2017.
45. Gupta, A. and A. Gadipudi, *Iron deficiency anaemia in pregnancy: developed versus developing countries*. Hematology, 2018. **6**(1): p. 101-9.
46. Shaw, J.G. and J.F. Friedman, *Iron deficiency anemia: focus on infectious diseases in lesser developed countries*. Anemia, 2011. **2011**: p. 260380.
47. Begum, S. and G.O. Latunde-Dada, *Anemia of Inflammation with An Emphasis on Chronic Kidney Disease*. Nutrients, 2019. **11**(10).
48. Lindenau, J.D., et al., *The effects of old and recent migration waves in the distribution of HBB*S globin gene haplotypes*. Genet Mol Biol, 2016. **39**(4): p. 515-523.
49. Mohammed, A.O., et al., *Relationship of the sickle cell gene to the ethnic and geographic groups populating the Sudan*. Community Genet, 2006. **9**(2): p. 113-20.
50. Nagel, R.L., et al., *Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type*. N Engl J Med, 1985. **312**(14): p. 880-4.
51. Colah, R., A. Gorakshakar, and A. Nadkarni, *Global burden, distribution and prevention of β -thalassemias and hemoglobin E disorders*. Expert Rev Hematol, 2010. **3**(1): p. 103-17.
52. Kumar, R., et al., *β -globin genes: mutation hot-spots in the global thalassemia belt*. Hemoglobin, 2015. **39**(1): p. 1-8.
53. Rao, E., et al., *Global distribution of β -thalassemia mutations: An update*. Gene, 2024. **896**: p. 148022.
54. Yip, R., *Prevention and control of iron deficiency in developing countries*. Curr Issues Public Health, 1996. **2**(5-6): p. 253-63.
55. Artz, A.S., et al., *Prevalence of anemia in skilled-nursing home residents*. Arch Gerontol Geriatr, 2004. **39**(3): p. 201-6.
56. Landi, F., et al., *Anemia status, hemoglobin concentration, and mortality in nursing home older residents*. J Am Med Dir Assoc, 2007. **8**(5): p. 322-7.
57. Robinson, B., et al., *Prevalence of anemia in the nursing home: contribution of chronic kidney disease*. J Am Geriatr Soc, 2007. **55**(10): p. 1566-70.
58. Pires Corona, L., et al., *The Relationship between Anemia, Hemoglobin Concentration and Frailty in Brazilian Older Adults*. J Nutr Health Aging, 2015. **19**(9): p. 935-40.
59. Steinmeyer, Z., et al., *Hemoglobin concentration; a pathway to frailty*. BMC Geriatr, 2020. **20**(1): p. 202.
60. Guralnik, J.M., et al., *Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2263-8.
61. 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.
62. Koh, J.S. and I.C. Song, *Functional iron deficiency anemia in patients with cancer*. Blood Res, 2024. **59**(1): p. 26.
63. Mirghani, H., et al., *Updates on the Association Between Anemia and Heart Failure: A Systematic Review*. Cureus, 2024. **16**(9): p. e69101.

64. Chairat, K., et al., *Relationship of anemia and clinical outcome in heart failure patients with preserved versus reduced ejection fraction in a rural area of Thailand*. Int J Cardiol Heart Vasc, 2020. **30**: p. 100597.
65. Sabah, Z.U., et al., *The association of anemia as a risk of heart failure*. J Family Med Prim Care, 2020. **9**(2): p. 839-843.
66. Young, J.B., et al., *Relation of low hemoglobin and anemia to morbidity and mortality in patients hospitalized with heart failure (insight from the OPTIMIZE-HF registry)*. Am J Cardiol, 2008. **101**(2): p. 223-30.
67. Sirbu, O., et al., *Anemia in heart failure - from guidelines to controversies and challenges*. Anatol J Cardiol, 2018. **20**(1): p. 52-59.
68. Groenveld, H.F., et al., *Anemia and mortality in heart failure patients a systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(10): p. 818-27.
69. Klutstein, M.W. and D. Tzivoni, *Anaemia and heart failure: aetiology and treatment*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20 Suppl 7**(suppl_7): p. vii7-10.
70. Horwich, T.B., et al., *Anemia is associated with worse symptoms, greater impairment in functional capacity and a significant increase in mortality in patients with advanced heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(11): p. 1780-6.
71. Anand, I., et al., *Anemia and Its Relationship to Clinical Outcome in Heart Failure*. Circulation, 2004. **110**(2): p. 149-154.
72. Pan, J., et al., *Impact of anemia on clinical outcomes in patients with acute heart failure: A systematic review and meta-analysis*. Clin Cardiol, 2024. **47**(2): p. e24228.
73. Ni, T., et al., *Association Between Anemia Status and the Risk of Different Types of Heart Failure: A RCSCD-TCM Study in China*. Angiology, 2024. **75**(2): p. 190-196.
74. Shaddy, R.E., et al., *Systematic Literature Review on the Incidence and Prevalence of Heart Failure in Children and Adolescents*. Pediatr Cardiol, 2018. **39**(3): p. 415-436.
75. Gan, T., et al., *Causal Association Between Anemia and Cardiovascular Disease: A 2-Sample Bidirectional Mendelian Randomization Study*. J Am Heart Assoc, 2023. **12**(12): p. e029689.
76. Mutlaq, H.S., et al., *Anemia: An Updated Review for Healthcare Professionals*. Journal of Ecohumanism, 2024. **3**(8): p. 13225– 13237.
77. Aryal, D., et al., *Clinical Profile of Patients with Anemia in a Tertiary Care Hospital*. Journal of Universal College of Medical Sciences, 2023. **11**(02): p. 20-24.
78. Weckmann, G., et al., *Association of Anemia with Clinical Symptoms Commonly Attributed to Anemia-Analysis of Two Population-Based Cohorts*. J Clin Med, 2023. **12**(3).
79. Ludwig, H. and K. Strasser, *Symptomatology of anemia*. Semin Oncol, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 7-14.
80. von Haehling, S., et al., *Anemia in chronic heart failure: can we treat? What to treat?* Heart Fail Rev, 2012. **17**(2): p. 203-10.
81. Chen, L., et al., *Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease*. Sci China Life Sci, 2019. **62**(11): p. 1420-1458.
82. Brandes, R., F. Lang, and R.F. Schmidt, *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. 32 ed. 2019, Deutschland: Springer Verlag GmbH Deutschland.
83. Heinrich, P.C., M. Müller, and L. Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. ed. 2014, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
84. Xiao, W., et al., *NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(3): p. 251-272.
85. Tang, J.X., et al., *Mitochondrial OXPHOS Biogenesis: Co-Regulation of Protein Synthesis, Import, and Assembly Pathways*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(11): p. 3820.

86. Bonora, M., et al., *ATP synthesis and storage*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 343-57.
87. Pinna, S., et al., *A prebiotic basis for ATP as the universal energy currency*. PLoS Biol, 2022. **20**(10): p. e3001437.
88. Deng, J. and A. Walther, *ATP-Responsive and ATP-Fueled Self-Assembling Systems and Materials*. Adv Mater, 2020. **32**(42): p. e2002629.
89. Rice, A.M. and M.K. Rosen, *ATP controls the crowd*. Science, 2017. **356**(6339): p. 701-702.
90. Greiner, J.V. and T. Glonek, *Intracellular ATP Concentration and Implication for Cellular Evolution*. Biology (Basel), 2021. **10**(11).
91. Youle, R.J., *Mitochondria-Striking a balance between host and endosymbiont*. Science, 2019. **365**(6454).
92. Lane, N. and W. Martin, *The energetics of genome complexity*. Nature, 2010. **467**(7318): p. 929-34.
93. Abate, M., et al., *Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence*. Semin Cell Dev Biol, 2020. **98**: p. 139-153.
94. Picard, M. and O.S. Shirihai, *Mitochondrial signal transduction*. Cell Metab, 2022. **34**(11): p. 1620-1653.
95. Haskins, N., et al., *Mitochondrial Enzymes of the Urea Cycle Cluster at the Inner Mitochondrial Membrane*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 542950.
96. Dan Dunn, J., et al., *Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis*. Redox Biol, 2015. **6**: p. 472-485.
97. Hamanaka, R.B. and N.S. Chandel, *Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes*. Trends in Biochemical Sciences, 2010. **35**(9): p. 505-513.
98. Zhang, B., et al., *Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation*. Redox Report, 2022. **27**(1): p. 45-52.
99. Lennicke, C. and H.M. Cochemé, *Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function*. Mol Cell, 2021. **81**(18): p. 3691-3707.
100. Forrester, S.J., et al., *Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling*. Circulation Research, 2018. **122**(6): p. 877-902.
101. Sies, H. and D.P. Jones, *Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020. **21**(7): p. 363-383.
102. Harrington, J.S., et al., *Mitochondria in health, disease, and aging*. Physiol Rev, 2023. **103**(4): p. 2349-2422.
103. Mitchell, P. and J. Moyle, *Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria*. Eur J Biochem, 1969. **7**(4): p. 471-84.
104. Nicholls, D.G., *Forty years of Mitchell's proton circuit: From little grey books to little grey cells*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 550-6.
105. Zweck, E., *Energiestoffwechsel des humanen Myokards bei Herzinsuffizienz und Diabetes Mellitus Typ 2*, in *Institut für klinische Diabetologie, Deutsches Diabetes-Zentrum, Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung*. 2021, Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf.
106. Karwi, Q.G., A.R. Jörg, and G.D. Lopaschuk, *Allosteric, transcriptional and post-translational control of mitochondrial energy metabolism*. Biochem J, 2019. **476**(12): p. 1695-1712.
107. Levine, H.J., *Rest heart rate and life expectancy*. J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(4): p. 1104-6.
108. Squire, J., *Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).

109. Bornstein, M.R., R. Tian, and Z. Arany, *Human cardiac metabolism*. Cell Metab, 2024. **36**(7): p. 1456-1481.
110. Taegtmeyer, H. *Fueling the Heart: Multiple Roles for Cardiac Metabolism*. 2007.
111. Ashrafian, H. and S. Neubauer, *Metabolomic profiling of cardiac substrate utilization: fanning the flames of systems biology?* Circulation, 2009. **119**(13): p. 1700-2.
112. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.
113. Lopaschuk, G.D., *Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future*. Can J Cardiol, 2017. **33**(7): p. 838-849.
114. Romano, A., et al., *Fats for thoughts: An update on brain fatty acid metabolism*. Int J Biochem Cell Biol, 2017. **84**: p. 40-45.
115. Van Der Vusse, G.J. and M.J.M. De Groot, *Interrelationship between lactate and cardiac fatty acid metabolism*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1992. **116**(1-2): p. 11-17.
116. Liu, H., et al., *Harnessing natural saponins: Advancements in mitochondrial dysfunction and therapeutic applications*. Phytomedicine, 2025. **138**: p. 156383.
117. Jelenik, T. and M. Roden, *Mitochondrial plasticity in obesity and diabetes mellitus*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(3): p. 258-68.
118. Ferreira, I.L., et al., *Multiple defects in energy metabolism in Alzheimer's disease*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(10): p. 1193-206.
119. Haas, R.H., *Autism and mitochondrial disease*. Dev Disabil Res Rev, 2010. **16**(2): p. 144-53.
120. Belenichev, I., et al., *Targeting Mitochondrial Dysfunction in Cerebral Ischemia: Advances in Pharmacological Interventions*. Antioxidants, 2025. **14**(1): p. 108.
121. Fernyhough, P., S.K. Roy Chowdhury, and R.E. Schmidt, *Mitochondrial stress and the pathogenesis of diabetic neuropathy*. Expert Rev Endocrinol Metab, 2010. **5**(1): p. 39-49.
122. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. N Engl J Med, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
123. Scheiber, D., et al., *High-resolution respirometry in human endomyocardial biopsies shows reduced ventricular oxidative capacity related to heart failure*. Exp Mol Med, 2019. **51**(2): p. 1-10.
124. Lemieux, H., et al., *Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(12): p. 1729-38.
125. Karwi, Q.G., et al., *Loss of Metabolic Flexibility in the Failing Heart*. Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 68.
126. De Jong, K.A. and G.D. Lopaschuk, *Complex Energy Metabolic Changes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Heart Failure With Reduced Ejection Fraction*. Can J Cardiol, 2017. **33**(7): p. 860-871.
127. Fukushima, A., et al., *Myocardial Energy Substrate Metabolism in Heart Failure : from Pathways to Therapeutic Targets*. Curr Pharm Des, 2015. **21**(25): p. 3654-64.
128. Shen, Y., et al., *Mitochondrial ATP generation is more proteome efficient than glycolysis*. Nat Chem Biol, 2024. **20**(9): p. 1123-1132.
129. Lopaschuk, G.D. and J.R. Ussher, *Evolving Concepts of Myocardial Energy Metabolism: More Than Just Fats and Carbohydrates*. Circ Res, 2016. **119**(11): p. 1173-1176.
130. Glatz, J.F., et al., *Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart*. Cardiovasc Drugs Ther, 2006. **20**(6): p. 471-6.

131. Fillmore, N., J. Mori, and G.D. Lopaschuk, *Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(8): p. 2080-90.
132. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
133. Folmes, C.D., et al., *High rates of residual fatty acid oxidation during mild ischemia decrease cardiac work and efficiency*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(1): p. 142-8.
134. Liu, B., et al., *Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 940-8.
135. Liu, Q., et al., *High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(4): p. 718-25.
136. Schönfeld, P. and G. Reiser, *Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(10): p. 1493-9.
137. Mookerjee, S.A., et al., *Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements*. J Biol Chem, 2017. **292**(17): p. 7189-7207.
138. Maeder, M.T., et al., *Myocardial and systemic iron depletion in heart failure implications for anemia accompanying heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(5): p. 474-80.
139. Melenovsky, V., et al., *Myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure: a direct tissue analysis*. Eur J Heart Fail, 2017. **19**(4): p. 522-530.
140. Gnaiger, E., *O2k Quality Control 1: Polarographic oxygen sensors and accuracy of calibration* Mitochondrial Physiology Network, 2021. **06.03(19)**: p. 1-19.
141. Gnaiger, E., *Mitochondrial pathways and respiratory control. An Introduction to OXPHOS Analysis. 5th ed.* Bioenergetics Communications, 2020.
142. Lanza, I.R. and K.S. Nair, *Mitochondrial metabolic function assessed in vivo and in vitro*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. **13**(5): p. 511-7.
143. Palmeira, C.M. and A.J. Moreno, *Mitochondrial Bioenergetics. Methods and Protocols*. 1 ed. Methods in Molecular Biology. 2012.
144. Pesta, D. and E. Gnaiger, *High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle*. Methods Mol Biol, 2012. **810**: p. 25-58.
145. Brand, M.D. and D.G. Nicholls, *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*. Biochem J, 2011. **435**(2): p. 297-312.
146. Veksler, V.I., et al., *Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers*. Biochim Biophys Acta, 1987. **892**(2): p. 191-6.
147. Perry, C.G.R., et al., *Methods for Assessing Mitochondrial Function in Diabetes*. Diabetes, 2013. **62**(4): p. 1041-1053.
148. Saks, V.A., et al., *Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo*. Mol Cell Biochem, 1998. **184**(1-2): p. 81-100.
149. Pietka, T.A. and R.T. Brookheart, *Measurement of Mitochondrial Respiration in Human and Mouse Skeletal Muscle Fibers by High-Resolution Respirometry*. J Vis Exp, 2024(212).
150. Picard, M., et al., *Mitochondria: isolation, structure and function*. The Journal of Physiology, 2011. **589**(18): p. 4413-4421.
151. Larsen, S., et al., *The best approach: homogenization or manual permeabilization of human skeletal muscle fibers for respirometry?* Anal Biochem, 2014. **446**: p. 64-8.

152. Hubbard, W.B., et al., *Fractionated mitochondrial magnetic separation for isolation of synaptic mitochondria from brain tissue*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 9656.
153. Scheiber, D., et al., *Human myocardial mitochondrial oxidative capacity is impaired in mild acute heart transplant rejection*. ESC Heart Fail, 2021. **8**(6): p. 4674-4684.
154. Scheiber, D., et al., *Reduced Myocardial Mitochondrial ROS Production in Mechanically Unloaded Hearts*. J Cardiovasc Transl Res, 2019. **12**(2): p. 107-115.
155. Zweck, E., et al., *Impaired mitochondrial ketone body oxidation in insulin resistant states*. bioRxiv, 2025: p. 2024.06.27.600966.
156. Zweck, E., et al., *Exposure to Type 2 Diabetes Provokes Mitochondrial Impairment in Apparently Healthy Human Hearts*. Diabetes Care, 2021. **44**(5): p. e82-e84.
157. Zweck, E., et al., *Impaired Myocardial Mitochondrial Respiration in Humans With Prediabetes: A Footprint of Prediabetic Cardiomyopathy*. Circulation, 2022. **146**(15): p. 1189-1191.
158. Sharov, V.G., et al., *Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(12): p. 2361-7.
159. Chance, B. and G.R. Williams, *Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation I. Kinetics of oxygen utilization*. Journal of Biological Chemistry, 1955. **217**(1): p. 383-393.
160. Chance, B. and G.R. Williams, *Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation II. Difference Spectra*. Journal of Biological Chemistry, 1955. **217**(1): p. 395-407.
161. Chance, B. and G.R. Williams, *Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation III. The Steady State*. Journal of Biological Chemistry, 1955. **217**(1): p. 409-427.
162. Chance, B. and G.R. Williams, *Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation IV. The Respiratory Chain*. Journal of Biological Chemistry, 1955. **217**(1): p. 429-438.
163. Chance, B., et al., *Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation V. A Mechanism for Oxidative Phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 1955. **217**(1): p. 439-451.
164. Chance, B. and G.R. Williams, *Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation VI. The Effects of Adenosine Diphosphate on Azide-treated Mitochondria*. J Biol Chem, 1956. **221**(1): p. 477-89.
165. Chance, B. and H. Baltscheffsky, *Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation VII. Binding of Intramitochondrial Reduced Pyridine Nucleotide*. J Biol Chem, 1958. **233**(3): p. 736-9.
166. Gnaiger, E. and M.T. Group, *Mitochondrial physiology*. bioenergetic communications, 2020. **1**(1): p. 1-44.
167. Salin, K., et al., *The RCR and ATP/O Indices Can Give Contradictory Messages about Mitochondrial Efficiency*. Integr Comp Biol, 2018. **58**(3): p. 486-494.
168. Stewart, S., et al., *Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(11): p. 1710-20.
169. World Medical Association. *World Medical Association Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*. 2024 [21.07.2025]; Available from: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki/>.
170. Fontana-Ayoub, M., M. Fasching, and E. Gnaiger, *Selected media and chemicals for respirometry with mitochondrial preparations*. Mitochondrial Physiology Network, 2016. **03.02(18)**: p. 1-10.
171. Gnaiger, E., I. Plangger, and M. Hunger, *Mitochondrial respiration medium: MiR05-Kit*. Mitochondrial Physiology Network, 2019. **22.10(03)**: p. 1-2.

172. Kuznetsov, A.V., et al., *Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells*. Nature Protocols, 2008. **3**(6): p. 965-976.
173. Fasching, M. and E. Gnaiger, *O2k Quality Control 2: Instrumental oxygen background correction and accuracy of oxygen flux*. Mitochondrial Physiology Network, 2020. **14.06(08)**: p. 1-16.
174. Doerrier, C., et al., *Harmonization of experimental procedures to assess mitochondrial respiration in human permeabilized skeletal muscle fibers*. Free Radic Biol Med, 2024. **223**: p. 384-397.
175. Gnaiger, E., et al., *Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen*. J Bioenerg Biomembr, 1995. **27**(6): p. 583-96.
176. Larsen, S., et al., *Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects*. J Physiol, 2012. **590**(14): p. 3349-60.
177. Fleckenstein-Elsen, M., et al., *Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid differentially regulate adipogenesis, acquisition of a brite phenotype and mitochondrial function in primary human adipocytes*. Mol Nutr Food Res, 2016. **60**(9): p. 2065-75.
178. O'Brien, L.C., et al., *Skeletal muscle mitochondrial mass is linked to lipid and metabolic profile in individuals with spinal cord injury*. Eur J Appl Physiol, 2017. **117**(11): p. 2137-2147.
179. Field, A., *Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics*. 5. ed. 2018, London: SAGE Publications Ltd.
180. Cohen, J., *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2 ed. 1988: Routledge.
181. Cohen, J., *A power primer*. Psychological Bulletin, 1992. **112**(1): p. 155-159.
182. Padmanabhan, H., et al., *Preoperative Anemia and Outcomes in Cardiovascular Surgery: Systematic Review and Meta-Analysis*. Ann Thorac Surg, 2019. **108**(6): p. 1840-1848.
183. Alyaydin, E., et al., *Predisposing factors for late mortality in heart transplant patients*. Cardiol J, 2021. **28**(5): p. 746-757.
184. Kittleson, M., et al., *Chronic Anemia Is Not a Predictor for Poor Outcome after Heart Transplantation*. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2013. **32**(4): p. S254-S255.
185. Taegtmeier, A.B., et al., *The effects of pre- and post-transplant anemia on 1-year survival after cardiac transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2008. **27**(4): p. 394-9.
186. Jhee, J.H., et al., *Upper Normal Serum Creatinine Concentrations as a Predictor for Chronic Kidney Disease: Analysis of 14 Years' Korean Genome and Epidemiology Study (KoGES)*. J Clin Med, 2018. **7**(11).
187. Levey, A.S., *Defining AKD: The Spectrum of AKI, AKD, and CKD*. Nephron, 2022. **146**(3): p. 302-305.
188. Norris, K.C., et al., *Albuminuria, serum creatinine, and estimated glomerular filtration rate as predictors of cardio-renal outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and kidney disease: a systematic literature review*. BMC Nephrol, 2018. **19**(1): p. 36.
189. Pottel, H., P. Delanaye, and E. Cavalier, *Exploring Renal Function Assessment: Creatinine, Cystatin C, and Estimated Glomerular Filtration Rate Focused on the European Kidney Function Consortium Equation*. Ann Lab Med, 2024. **44**(2): p. 135-143.
190. Lau, W.L. and N.D. Vaziri, *Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(1): p. 3-12.

191. Laville, S.M., et al., *Urea levels and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2022. **38**(1): p. 184-92.
192. Vanholder, R., T. Gryp, and G. Glorieux, *Urea and chronic kidney disease: the comeback of the century? (in uraemia research)*. Nephrol Dial Transplant, 2018. **33**(1): p. 4-12.
193. Farrington, D.K., et al., *Anemia Prevalence, Type, and Associated Risks in a Cohort of 5.0 Million Insured Patients in the United States by Level of Kidney Function*. Am J Kidney Dis, 2023. **81**(2): p. 201-209.e1.
194. Hanna, R.M., E. Streja, and K. Kalantar-Zadeh, *Burden of Anemia in Chronic Kidney Disease: Beyond Erythropoietin*. Adv Ther, 2021. **38**(1): p. 52-75.
195. Portolés, J., et al., *Anemia in Chronic Kidney Disease: From Pathophysiology and Current Treatments, to Future Agents*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 642296.
196. Kim, H.J., et al., *Effects of blood urea nitrogen independent of the estimated glomerular filtration rate on the development of anemia in non-dialysis chronic kidney disease: The results of the KNOW-CKD study*. PLoS One, 2021. **16**(9): p. e0257305.
197. Chen, S., et al., *Association of the systemic immune-inflammation index with anemia: a population-based study*. Front Immunol, 2024. **15**: p. 1391573.
198. Lin, Q., et al., *Anemia-Associated Platelets and Plasma Prothrombin Time Increase in Patients with Adenomyosis*. J Clin Med, 2022. **11**(15).
199. Samanta, P. and L.K. Senapati, *Association of nutritional anemia with leukocyte and platelet counts in people of Odisha*. National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology, 2017. **8**: p. 526-529.
200. Acharya, S.R., D. Timilsina, and S. Acharya, *Association between blood hemoglobin levels, anemia, and body mass index in children and women of Myanmar: findings from a nationally representative health study*. Sci Rep, 2024. **14**(1): p. 32020.
201. Elzein, H.O., A.A. Hassan, and I. Adam, *The prevalence of anemia and its association with body mass index and obesity in adults: a community-based cross-sectional study*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2025.
202. Kamruzzaman, M., *Is BMI associated with anemia and hemoglobin level of women and children in Bangladesh: A study with multiple statistical approaches*. PLoS One, 2021. **16**(10): p. e0259116.
203. Kordas, K., et al., *Being overweight or obese is associated with lower prevalence of anemia among Colombian women of reproductive age*. J Nutr, 2013. **143**(2): p. 175-81.
204. Mocking, M., et al., *Does body mass index early in pregnancy influence the risk of maternal anaemia? An observational study in Indonesian and Ghanaian women*. BMC Public Health, 2018. **18**(1): p. 873.
205. Qin, Y., et al., *Anemia in relation to body mass index and waist circumference among Chinese women*. Nutr J, 2013. **12**: p. 10.
206. Saltiel, A.R. and J.M. Olefsky, *Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 1-4.
207. Mehdad, S., et al., *Association between overweight and anemia in Moroccan adolescents: a cross-sectional study*. Pan Afr Med J, 2022. **41**: p. 156.
208. Ausk, K.J. and G.N. Ioannou, *Is obesity associated with anemia of chronic disease? A population-based study*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(10): p. 2356-61.
209. Anand, I. and P. Gupta, *How I treat anemia in heart failure*. Blood, 2020. **136**(7): p. 790-800.
210. Silverberg, D.S., et al., *The use of subcutaneous erythropoietin and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves*

- cardiac and renal function and functional cardiac class, and markedly reduces hospitalizations. J Am Coll Cardiol, 2000. 35(7): p. 1737-44.*
211. Yang, T.Y., et al., *Anemia warrants treatment to improve survival in patients with heart failure receiving sacubitril-valsartan. Sci Rep, 2022. 12(1): p. 8186.*
 212. Anand, I.S., *Anemia and chronic heart failure implications and treatment options. J Am Coll Cardiol, 2008. 52(7): p. 501-11.*
 213. 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.*
 214. Grote Beverborg, N., D.J. van Veldhuisen, and P. van der Meer, *Anemia in Heart Failure: Still Relevant? JACC Heart Fail, 2018. 6(3): p. 201-208.*
 215. Bianchi, V.E. and S. von Haehling, *The treatment of chronic anemia in heart failure: a global approach. Clin Res Cardiol, 2024. 113(8): p. 1117-1136.*
 216. Kansagara, D., et al., *Treatment of Anemia in Patients With Heart Disease. Annals of Internal Medicine, 2013. 159(11): p. 746-757.*
 217. Ponikowski, P., et al., *Ferric carboxymaltose for iron deficiency at discharge after acute heart failure: a multicentre, double-blind, randomised, controlled trial. Lancet, 2020. 396(10266): p. 1895-1904.*
 218. Blayney, L., et al., *The effects of iron deficiency on the respiratory function and cytochrome content of rat heart mitochondria. Circulation Research, 1976. 39(5): p. 744-748.*
 219. Chung, Y.J., et al., *Iron-Deficiency Anemia Results in Transcriptional and Metabolic Remodeling in the Heart Toward a Glycolytic Phenotype. Front Cardiovasc Med, 2020. 7: p. 616920.*
 220. Hoes, M.F., et al., *Iron deficiency impairs contractility of human cardiomyocytes through decreased mitochondrial function. European Journal of Heart Failure, 2018. 20(5): p. 910-919.*
 221. Hogan, M., A.A. Klein, and T. Richards, *The impact of anaemia and intravenous iron replacement therapy on outcomes in cardiac surgery. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2015. 47(2): p. 218-226.*
 222. Gleissner, C.A., et al., *Role of erythropoietin in anemia after heart transplantation. Int J Cardiol, 2006. 112(3): p. 341-7.*
 223. Marfella, R., et al., *Lipid Accumulation in Hearts Transplanted From Nondiabetic Donors to Diabetic Recipients. J Am Coll Cardiol, 2020. 75(11): p. 1249-1262.*
 224. Stride, N., et al., *Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction. Eur J Heart Fail, 2013. 15(2): p. 150-7.*
 225. Holzem, K.M., et al., *Mitochondrial structure and function are not different between nonfailing donor and end-stage failing human hearts. Faseb j, 2016. 30(8): p. 2698-707.*
 226. Cordero-Reyes, A.M., et al., *Freshly isolated mitochondria from failing human hearts exhibit preserved respiratory function. J Mol Cell Cardiol, 2014. 68: p. 98-105.*
 227. Ng, S.M., S. Neubauer, and O.J. Rider, *Myocardial Metabolism in Heart Failure. Curr Heart Fail Rep, 2023. 20(1): p. 63-75.*
 228. Li, A.L., et al., *The role of mitochondria in myocardial damage caused by energy metabolism disorders: From mechanisms to therapeutics. Free Radic Biol Med, 2023. 208: p. 236-251.*
 229. Noda, E., et al., *Prognostic impact of moderate to severe anemia associated with renal dysfunction in patients with heart failure. Scientific Reports, 2025. 15(1): p. 3918.*

- 230. Gonzalez-Costello, J., et al., *Use of intravenous iron in patients with iron deficiency and chronic heart failure: Real-world evidence*. Eur J Intern Med, 2020. **80**: p. 91-98.
- 231. Duicu, O., et al., *Substrate-specific impairment of mitochondrial respiration in permeabilized fibers from patients with coronary heart disease versus valvular disease*. Mol Cell Biochem, 2013. **379**(1-2): p. 229-34.
- 232. Lee, S.H., et al., *Improvement of myocardial mitochondrial function after hemodynamic support with left ventricular assist devices in patients with heart failure*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 1998. **116**(2): p. 344-349.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Ralf Westenfeld und Julia Szendrödi, welche mir dieses Thema anvertraut haben, ebenso wie Amin Polzin und Christian Buchbender, die es mir ermöglicht haben, meine Promotion zum Abschluss zu bringen. Ebenso danke ich Malte Kelm für die Möglichkeit, in seiner Klinik promovieren zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Elric Zweck bedanken, für seine stete Begleitung, Hilfsbereitschaft und ununterbrochene Unterstützung.

Des Weiteren gilt mein Dank all denjenigen, die mir in der Klinik und im Labor zur Seite gestanden und mit ihrem Rat unter die Arme gegriffen haben, und von denen ich einige an dieser Stelle hervorheben möchte. Bei Sarah Piel bedanke ich mich für das Korrekturlesen meiner Dissertation. I thank Kaihui Lu for his advice regarding the experiments in the laboratory. Darüber hinaus danke ich Norbert Gerdes, Susanne Pfeiler und Alexander Lang, die mir jederzeit für Fragen zur Verfügung standen, sowie allen anderen Mitgliedern des kardiovaskulären Forschungslabors der Heinrich-Heine-Universität. Für die freundliche Zusammenarbeit danke ich Daniel Scheiber, Florian Bönner, Patrick Horn und Udo Boeken, sowie dem gesamten Team des Herzkatheterlabors, dem Team des Kardio-MRTs, der Stationen ME06, ME08 und ME09, sowie allen anderen Doktorandinnen und Doktoranden meiner Arbeitsgruppe.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, bei meiner Schwester Julia und meinen Eltern Heike und Frank, welche mir immerwährend mit Geduld, Verständnis und Zuspruch zur Seite gestanden und mich auf meinem Weg begleitet haben. Ihnen gilt mein tief empfundener Dank.

