

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
des Universitätsklinikums Halle (Saale)**

(Direktor: Prof. Dr. med. R.-E. Silber)

**Herzultraschalluntersuchungen
zu RAGE- und altersabhängigen Veränderungen
der Herzfunktion am Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mandy Kosel

geboren am 17.11.1977 in Altenburg

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. A. Simm

Prof. Dr. med. U. Müller-Werdan

Dr. rer. nat. habil. V. Adams

Tag der Verteidigung: 30.September 2013

Referat

Zielsetzung

Advanced Glycation End Products (AGEs) spielen eine wichtige Rolle beim Altern und bei chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ-II oder Arteriosklerose. Der Rezeptor für AGEs, RAGE, hat als wahrscheinlicher Vermittler der AGE-Wirkung daher eine wesentliche Bedeutung bei der Entwicklung und dem Fortschreiten von chronischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welchen Einfluss die kardiale RAGE-Expression auf die linksventrikuläre Herzfunktion in Bezug auf die Ejektionsfraktion (EF) während des Alterns hat.

Material und Methoden

Es wurden weibliche und männliche Tiere von den drei folgenden Genotypen von C57/Bl6-Mäusen im Alter von ca. 4 bzw. ca. 23 Monaten analysiert: Wildtyp (WT), RAGE-Knockouttyp (KO) und transgener kardialer RAGE-Überexpressionstyp (TGÜ). Untersucht wurde die globale systolische Herzpumpfunktion mittels Herzultraschall. Um herauszufinden, ob physische Aktivität einen positiven Einfluss auf die Herzfunktion im Alter hat, wurden alte, männliche Tiere unter freiwilliger Laufradbelastung getestet.

Ergebnisse

Altersunabhängig nehmen mit steigender kardialer RAGE-Expression die Herzpumpleistung ab bzw. die linksventrikulären Durchmesser zu. Im Bezug auf das Altern konnte eine Abnahme der Herzpumpleistung festgestellt werden. Interessanterweise zeigten die weiblichen Tiere aller drei Genotypen unabhängig vom Alter eine bessere Herzfunktion als die männlichen Tiere. Ein positiver Einfluss körperlicher Aktivität konnte bei den alten Tieren hingegen nicht festgestellt werden.

Schlussfolgerung

Die RAGE-Expression hat einen negativen Einfluss auf die globale systolische Herzfunktion im jungen als auch im fortgeschrittenen Alter. Erstmals ließen sich auch geschlechtsspezifische Unterschiede mit Bezug auf die kardiale RAGE-Expression nachweisen. Jedoch ist noch ungewiss, ob diese Veränderungen ausschließlich auf eine Aktivierung von RAGE zurückzuführen sind.

Inhaltsverzeichnis

Referat.....	
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Symbole.....	III
1 Einleitung und Überblick.....	1
2 Material und Methoden	8
2.1 Material.....	8
2.1.1 Chemikalien.....	8
2.1.2 Puffer und Lösungen	9
2.1.3 Geräte und Sonstiges	12
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 Tiere und Tierhaltung.....	13
2.2.2 Physikalische Grundlagen des Ultraschalls.....	14
2.2.3 Ultraschallgerät Vivid i	15
2.2.4 Echokardiographie der Maus.....	16
2.2.5 Narkose.....	17
2.2.6 Echokardiographische Untersuchung.....	20
2.2.7 Organentnahme.....	23
2.2.8 Proteinnachweis.....	23
2.2.9 Statistische Auswertung	25
3 Ergebnisse	27
3.1 Proteinbestimmung.....	27
3.2 Ergebnisse der Echokardiographie	28
3.2.1 Junge Tiere	29
3.2.2 Geschwistertiere	34
3.2.3 Alte Tiere.....	36
3.2.4 Alterungsprozess	42
3.2.5 Physische Aktivität: Freiwillige Laufradbelastung	47
4 Diskussion.....	52
4.1 Globale systolische Herzfunktion in Abhängigkeit von der kardialen RAGE-Expression zwischen jungen und alten Mäusen	55
4.2 Globale systolische Herzfunktion in Abhängigkeit von der kardialen RAGE-Expression im Bezug auf das Geschlecht.....	57
4.2.1 Junge Tiere im geschlechtsspezifischen Vergleich	57
4.2.2 Alte Tiere im geschlechtsspezifischen Vergleich.....	57

4.3	Globale systolische Herzfunktion mit Bezug auf genotypische Unterschiede....	59
4.4	Globale systolische Herzfunktion in Abhängigkeit von der RAGE- Expression in Bezug auf physische Aktivität im Alter	61
4.5	Limitationen der Arbeit	62
4.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	63
5	Literaturverzeichnis	66
6	Thesen	76
	Lebenslauf.....	
	Eidesstattliche Erklärung.....	
	Auszug aus dem Strafgesetzbuch (StGB).....	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	
	Danksagung	

Abkürzungen und Symbole

[α]	Winkel alpha
[c]	Schallgeschwindigkeit
[f]	Sendefrequenz
[v]	Geschwindigkeit
°C	Grad Celsius
Abb	Abbildung
AGE	Advanced Glycation End Product
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance
ATO	Automatic Tissue Optimization
ATP	Adenosintriphosphat
A-Welle	Atriale Welle
B-Mode	Brightness-Mode
BPS	Bild per Sekunde
BSA	Bovines Serum Albumin
C57Bl6	C57 Black6 Maus
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CAPS-Puffer	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
cm	Zentimeter
CML	N (ϵ)-Carboxymethyllysin
CRP	C-reaktives Protein
CW-Doppler	Continuous Wave-Doppler
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure

EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ESV	Endsystolisches Volumen
E-Welle	Early Wave
EZM	Extrazelluläre Matrix
ffg	folgende
FS	Fractional Shortening
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GFP-AK	Antikörper gegen grün fluoreszierendes Protein-
H	Höhe
HOCM	Hypertrophe Obstruktive Kardiomyopathie
Hz	Hertz
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
INF- γ	Interferon-gamma
Il-1	Interleukin-1
Il-6	Interleukin-6
Isf	Isofluran
K/X	Ketamin/Xylazin
KHz	Kilohertz
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
L	Länge
LDH	Laktatdehydrogenase
LV	Linker Ventrikel
LV-M-Mode	Linker Ventrikel in M-Mode-Darstellung

LVEDd	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDs	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVPWd	Linksventrikuläre enddiastolische posteriore Wand
LVPWs	Linksventrikuläre endsystolische posteriore Wand
mA	Milliampere
MHz	Megahertz
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH-Oxidase	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase
NF- κ B	Nuklearer Faktor-KappaB
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PW-Analyse	Pulsed Wave-Analyse
PW-Doppler	Pulsed-Wave-Doppler
RAGE	Rezeptor für AGE
RAGE-AK	Antikörper gegen den Rezeptor für AGE
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RV	Rechter Ventrikel
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SPSS	Statistical Package for the Social Science

sRAGE	soluble RAGE (löslich)
T	Tiefe
TBS	Tris-gepufferte-Salzlösung
TBS-T	Tris-Gepufferte-Salzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TGÜ	transgener Überexpressionstyp
TM-Mode	Time Motion-Mode
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCL	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan-Salzsäure
u.a.	unter anderem
usw	und so weiter
V	Volt
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
μ l	Mikroliter

1 Einleitung und Überblick

In Deutschland zählen im Jahr 2010 Herz-Kreislaufkrankungen, wie die chronisch ischämische Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz, weiterhin zu den häufigsten Todesursachen bei Frauen und Männern (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2011). Über 92% der an einer Herz-Kreislaufkrankung verstorbenen Bevölkerung hatte ein Alter ≥ 65 Jahre (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2011). Dabei zeigte sich, dass Frauen häufiger durch eine chronische ischämische Herzkrankheit bzw. Herzinsuffizienz und Männer am häufigsten am akuten Myokardinfarkt verstarben (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2011). In der Rotterdam Studie konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter die Inzidenz und Prävalenz von ischämischen Herzerkrankungen für Frauen und Männer deutlich zunimmt (BLEUMINK et al., 2004; HOFMAN et al., 1991).

Die starke Altersabhängigkeit der Herz-Kreislaufkrankungen weist auf eine wichtige Rolle von basalen Mechanismen des Alterns in diesem Krankheitskomplex hin. In diesem Zusammenhang gewinnt die Akkumulation von Advanced Glycation End Products (AGEs) als zentraler Alterungsmechanismus immer mehr an Bedeutung.

AGEs entstehen durch die Maillard Reaktion, benannt nach dem französischen Biochemiker Louis Maillard, welche die nichtenzymatische Reaktion von Zuckermolekülen mit Eiweißmolekülen mit den daraus entstehenden nicht abbaubaren Glykierungsendprodukten, den Advanced Glycation End Products, beschreibt (BIERHAUS und NAWROTH, 2002). In der primären Additionsreaktion z.B. der Glukose mit einer Aminosäureseitenkette wie Lysin entsteht eine instabile Schiff'sche Base, die sich zum stabileren Amadori-Produkt umlagern kann. Bis zu diesem Punkt ist die Reaktion noch reversibel. Durch weitere komplexe Reaktionen entstehen dann irreversibel die AGEs. Die glykierten Endprodukte können zu Proteinquervernetzungen, den sogenannten „crosslinks“ führen und strukturelle bzw. funktionelle Gewebeschädigungen wie Elastizitätsverlust oder auch eine Fibrose hervorrufen (THURNES, 2010). Als Teil des Alterungsprozesses kommt es aufgrund der kontinuierlichen Entstehung der AGEs und eines verlangsamten Abbaus modifizierter Proteine zu einer Akkumulation von glykierten Endprodukten im Organismus (THURNES, 2010; MIYATA, 2000). STIRBAN (2011) beschrieb, dass diese „Akkumulation über die Zeit“ beim Altern, bei Hyperglykämie im Falle von Diabetes mellitus und bei Herz-Kreislaufkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Die AGEs entstehen über Wochen, besonders durch ein erhöhtes Substratangebot und bei verstärktem Vorliegen von oxidativem Stress (SCHIEFKOFER et al., 2003). Advanced Glycation End Products können sowohl endogen als auch exogen entstehen. Endogen bilden sich diese vermehrt bei Patienten mit Diabetes mellitus.

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II wurden in arteriosklerotischen Plaques und Läsionen, sowie in Lipidablagerungen in glatten Gefäßmuskeln und in Makrophagen Advanced Glycation End Products nachgewiesen (STITT et al., 1997; NIWA et al., 1997). Dies wird u.a. mit dem hyperglykämischen Stoffwechsel und dem damit verbundenen oxidativem Stress erklärt (NASS und SIMM, 2009). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), im Rahmen von oxidativem Stress, können in Verbindung mit vorliegenden Kohlenhydraten die AGE-Produktion beschleunigen (SIMM und RANDO, 2008). Exogen können die AGEs durch Rauchen oder mit der Nahrung aufgenommen werden (SEMBA et al., 2010; VLASSARA, 2005; CERAMI et al., 1997).

Überwiegend sind langlebige Proteine, wie zum Beispiel Kollagene betroffen (STIRBAN, 2011; SIMM et al., 2004), jedoch können auch kurzlebige Substanzen strukturell und funktionell verändert werden, wie zum Beispiel Hormone im Falle von Insulin, Wachstumsfaktoren oder Lipiden (VLASSARA, 1996; GIARDINO et al., 1994). Die AGEs akkumulieren unter anderem in der Haut, Gefäßwänden, Neuronen, der Niere und im Herzen (SCHALKWIJK et al., 2004; SCHLEICHER et al., 1997) und führen da zu Veränderungen der Struktur und der Funktion der betroffenen Gewebe (NAWROTH und ZIEGLER, 2001):

- fehlerhafter Verankerung von Typ-IV-Kollagen in der Basalmembran,
- Erhöhung der Endothelzellpermeabilität,
- vermehrter Ablagerung glykierter Endprodukte an Gefäßwand und Basalmembran und entsprechend verringerte Gefäßfunktion,
- vermindertem Abbau von Kollagenen durch Kollagenaseresistenz,
- Induktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Interleukin-1, Tumornekrosefaktor- α),
- Induktion der Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen,
- Induktion von intrazellulärem oxidativen Stress,
- Induktion des Rezeptors für AGEs (RAGE) (NAWROTH und ZIEGLER, 2001) mit folgender Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuklearer Faktor kappa B).

AGEs fördern wie bereits oben beschrieben die Produktion von Wachstumsfaktoren wie PDGF (Platelet-derived growth factor = Blutplättchenwachstumsfaktor) und IGF-1 (Insulin-like growth factor-1 = Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1), welche die Migration von Monozyten/Makrophagen, die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Exazerbation von oxidativem Stress fördern (STIRBAN, 2010; VLASSARA, 1996). AGEs können nicht direkt wieder von den Proteinen entfernt werden, daher erfolgt der Abbau von AGE-modifizierten Strukturen indirekt durch Gewebsmakrophagen und extrazelluläre Proteolyse (STIRBAN, 2011). Die

modifizierten Proteine werden von den Makrophagen abgebaut und die resultierenden modifizierten Aminosäuren über die Niere ausgeschieden (VLASSARA, 1997).

CML (N(ε)-Carboxymethyllysin), eines der häufigsten AGE-Moleküle, akkumuliert so bei Niereninsuffizienz, aber auch bei oxidativem Stress, welcher wiederum eine Entzündungsreaktion nach sich zieht (SCHMIDT et al., 2000). Da das Advanced Glycation End Product CML am meisten und besten untersucht ist, dient es auch als AGE-Marker (ASSAR et al., 2009; AMES, 2008).

Bei dem physiologischen Alterungsprozess kommt es zur Gewebeversteifung, insbesondere in Organen mit einem hohen Anteil an Extrazellulärmatrix (EZM) (MONNIER et al., 2005). Betroffen sind vorwiegend Organe wie Lunge, Haut, Herz aber auch große Arterien wie z.B. die Aorta (MONNIER et al., 2005). Proteine der EZM und der Gefäßbasalmembran sind besonders langlebig und somit anfällig für Modifikationen durch Advanced Glycation End Products (GLENN et al., 2009; SCHMIDT et al., 1994). Dies führt unter anderem zu Störungen der Matrix-Matrix-Interaktion und zur Störung der Matrix-Zell-Interaktion (HAITOGLOU et al., 1992; TANAKA et al., 1988). Die AGE-induzierte Quervernetzung der Proteine wiederum bewirkt eine verringerte Elastizität des Gewebes bzw. eine Verengung des Gefäßlumens (BIERHAUS et al., 1998). Durch AGEs modifiziertes Kollagen ist resistenter gegen Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs), dadurch wird der Protein-Abbau verringert und das modifizierte Kollagen kann sich in der EZM ansammeln (NASS und SIMM, 2009). Dies verstärkt die Steifigkeit der EZM weiter, was wiederum zu Organdysfunktionen führen kann (NASS und SIMM, 2009). Die Elastizität der Gefäßwände wird durch die Quervernetzungen der AGEs gestört (KING et al., 1996). Proteinquervernetzungen durch AGEs in der Aorta, in den Karotiden und anderen größeren Arterien führen zu einer erhöhten Gefäßwandstarre, zu einer reduzierten Blutspeicherfunktion und zu erhöhten Pulswellengeschwindigkeiten (GREENWALD, 2007). Ferner werden Gewebeveränderungen durch Induktion und Verstärkung von Entzündungsreaktionen in verschiedenen Gewebe- und Organsystemen aufgrund einer erhöhten AGE-Konzentration hervorgerufen (SEMBA et al., 2010).

Des Weiteren führen AGEs durch Inaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO) in der Gefäßwand zu Einschränkungen der Muskelrelaxation und entsprechend zu Gefäßwandfunktionseinschränkungen in Form von Endothelzell dysfunktionen (BUCALA et al., 1991), da der Vasodilatator Stickstoffmonoxid in geringeren Mengen zur Verfügung steht (QUEHENBERGER et al., 2000; SANDERS et al., 2000). Analog dazu wird durch AGE-abhängige Induktion von Endothelin-1, einem potenten Vasokonstriktor, die Gefäßwandfunktion zusätzlich gestört (QUEHENBERGER et al., 1995).

Besonders im Alter zeigt sich, dass höhere Konzentrationen von Advanced Glycation End Products mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von chronischen Erkrankungen assoziiert

ist (SEMBA et al., 2010). Außerdem wird angenommen, dass durch Akkumulation von AGEs die multisystemische Funktionalitätsabnahme, die den Alterungsprozess kennzeichnet, beschleunigt wird und dadurch zur Alterung beiträgt (SEMBA et al., 2010).

Wie wirken die Advanced Glycation End Products?

Advanced Glycation End Products wirken direkt, also rezeptorunabhängig oder rezeptorvermittelt (ISERMANN et al., 2004). Einer dieser Rezeptoren ist der *Rezeptor für Advanced Glycation End Products*, kurz *RAGE* genannt. Da das Augenmerk dieser Arbeit auf diesem Rezeptor liegt, soll entsprechend nur auf besagten Rezeptor ausführlich eingegangen werden.

Der Rezeptor für AGEs gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und ist ein 42 kDa-Protein (SIMM et al., 2004), welches von Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten, glatten Muskelzellen, Neuronen und Mesangialzellen exprimiert wird (NAWROTH und ZIEGLER, 2001). Das RAGE-Gen liegt beim Menschen und bei der Maus auf Chromosom 6, in der Nähe des MHC-3 Komplexes (MALHERBE et al., 1999). Am häufigsten wird RAGE in der Lunge, der Skelettmuskulatur und am Herzen exprimiert (SEMBA et al., 2010). Der Rezeptor für AGEs ist ein Multiliganden Rezeptor, welcher neben AGEs auch Amyloid- β -Peptide binden kann, die eine Rolle bei der Alzheimer-Krankheit spielen (YAN et al, 2000 und 1996). Amphoterin und S100/Calgranulin zählen auch zu Liganden von RAGE (NAWROTH und ZIEGLER, 2001).

Unter physiologischen Bedingungen ist die RAGE-Expression, außer im Lungengewebe, gering (NAGAI et al., 2010). Zu den Effekten der Ligandenbindung an RAGE zählt die Erhöhung von oxidativem Stress, die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1 = Gefäßzellen-Adhäsionsmolekül-1) und die Regulierung von proinflammatorischen Prozessen durch NF- κ B und anderen Signalwegen (BIERHAUS et al., 2001). Eine Bindung von AGEs an RAGE führt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase), welche zu einer erhöhten ROS-Produktion beiträgt (NASS und SIMM, 2009). Dies führt somit zu erhöhtem oxidativen Stress und zur Induktion von Inflammation mit Hochregulierung von Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) oder C-reaktives Protein (CRP) (BASTA, 2008). Oxidativer Stress ist eine der Hauptursachen für das zelluläre Altern (SIMM und RANDO, 2008). Durch die AGE-RAGE-Bindung und dem damit induzierten intrazellulärem oxidativen Stress wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B hervorgerufen (NAWROTH und ZIEGLER, 2001). Der durch RAGE-induzierte proinflammatorische NF- κ B Signalweg erhöht wiederum

die RAGE-Expression und trägt somit zu einer anhaltenden Inflammation bei (BIERHAUS et al., 2006). Dieser Transkriptionsfaktor findet sich in fast allen Zelltypen und Geweben unseres Körpers. Er bindet an regulatorische DNA-Abschnitte (Desoxyribonukleinsäure-Abschnitte) und beeinflusst somit die Transkription bestimmter Gene, welche vorwiegend bei der Immunantwort, bei der Zellproliferation oder Apoptose eine wichtige Rolle spielen. NF- κ B trägt durch die Hochregulierung der Neointimabildung und durch die proinflammatorische und proatherogene Wirkung (ISERMANN et al., 2004) zur Entstehung und Förderung der Arteriosklerose bei. In arteriosklerotischen Läsionen wurden hohe AGE-Konzentrationen nachgewiesen (NERLICH und SCHLEICHER, 1999). Aktiviert wird NF- κ B neben der AGE-RAGE-Bindung auch durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder freie Radikale. Reaktive Sauerstoffspezies rufen wiederum Zellschäden hervor, wie zum Beispiel Proteinoxidationen oder DNA-Mutationen, was unter anderem zur Arterioskleroseentstehung oder auch zur Entstehung der Alzheimer-Krankheit beiträgt. Die ROS-Produktion wird durch Hypoxie und Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6 und Interferon-gamma (INF- γ) stimuliert und führt dadurch zur Aktivierung und Regulierung von NF- κ B (BUGGISCH, 2007). Speziell am Herzen führen sekundäre Botenstoffe wie Angiotensin-II oder PDGF zur Aktivierung von Zellwachstum und Zellteilung, was zur Myokardhypertrophie mit entsprechenden Zellschäden und Dysfunktionen führt (BUGGISCH, 2007). Weiter konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression / Stimulation von RAGE in Endothelzellen die Gefäßbarriere verringert (WAUTIER et al., 1996). Die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 wird durch RAGE verstärkt (SCHMIDT et al., 1995), was wiederum den Immunzellen ermöglicht, am Gefäßendothel verstärkt anzuhafte und so in das umliegende Gewebe zu wandern. Des Weiteren wird die Genexpression von VEGF (vascular endothelial growth factor = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) durch die AGE-Bindung an RAGE stimuliert, was zur Angiogenese führt (YAMAGISHI et al., 1997).

Eine anhaltende RAGE-Expression in glatten Muskelzellen, Endothelzellen oder Monozyten/Makrophagen führt demzufolge zu chronischen Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigungen mit nachfolgender Organdysfunktion (SEMBA et al., 2010).

Das Herz unterliegt im Verlauf des Lebens dynamischen strukturellen und funktionellen Veränderungen, welche als kardiales Remodeling bezeichnet werden (CHENG et al., 2010). Dieses Remodeling führt u.a. zur Hypertrophie, Apoptose und Regeneration der Kardiomyozyten (BERGMANN et al., 2009; OLIVETTI et al., 1995,1991). Beim biologischen kardialen Altern kommt es neben strukturellen Veränderungen wie linksventrikulärer Hypertrophie (GARDIN et al., 1995; LEVY, 1988) und Myokard-Wanddickenzunahme (REDFIELD et al., 2005) zu funktionellen Veränderungen mit gestörter diastolischer und systolischer linksventrikulärer Funktion (CHENG et al., 2009). Die Hypertrophie des Herzmuskels lässt sich wahrscheinlich durch die

altersbedingte Zunahme an Kollagen und die Zunahme der nichtenzymatischen Quervernetzung im Alter erklären (CHENG et al., 2009).

Weiterhin wird angenommen, dass durch eine Aktivierung von ROS beim Altern die Reizschwelle für zelluläre Kalziumüberladung vermindert ist. Dies ist erklärbar durch Veränderungen der Genexpression der Proteine, die das Kalziumhandling regulieren. Daraus resultiert letztendlich eine verminderte diastolische und systolische LV-Funktion (LAKATTA UND LEVY, 2003). Die Effekte der AGEs und der AGE-RAGE-Interaktion in Bezug auf das Herz-Kreislauf-System wurden bereits ausführlich besprochen und entsprechend die Relevanz auf das Herz insbesondere im Alterungsprozess deutlich gemacht.

Abschließend soll an Hand einer graphischen Darstellung eine zusammenfassende Übersicht direkter und RAGE-vermittelter Effekte der Advanced Glycation End Products gegeben werden. Diese *Abbildung* wurde angelehnt an die Abbildung von HARTOG et al. aus dem Jahr 2007.

<i>Advanced Glycation Endproducts (AGEs)</i>		
<i>Quervernetzung im Myokard</i>	<i>Interaktion mit RAGE</i>	<i>Quervernetzung im Gefäßsystem</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Herzmuskelversteifung • <i>Diastolische Dysfunktion</i> (Störung der linksventrikulären Relaxation) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrose (Gewebeversteifung) • gestörter Ca^{2+}-Stoffwechsel (gestörte Relaxation und Kontraktion des Myokards) • Arteriosklerose (Plaquerbildung- und Ablagerung an Gefäßen) • Prothrombogenität • Vasokonstriktion • <i>Systolische Dysfunktion</i> (Einschränkung der Ejektions- und Verkürzungsfraction) 	<ul style="list-style-type: none"> • Gefäßwandversteifung • <i>Vaskuläre Dysfunktion</i> (eingeschränkte Blutspeicherfunktion, erhöhte Pulswellengeschwindigkeit)

Abb. 1: Übersicht über die direkten und RAGE-vermittelten Effekte der AGEs mit besonderem Augenmerk auf das Kardiovaskuläre System (angelehnt an eine Abbildung von HARTOG et al., 2007, Abb. 2 auf Seite 1148)

Aufgrund des hohen Stellenwertes von Herzkreislauferkrankungen, vor allem im Alter, war es Ziel dieser Arbeit, sich mit funktionellen Veränderungen der Herzfunktion in Bezug auf den Alterungsprozess, geschlechtsspezifischen Unterschieden und in Abhängigkeit einer kardialen RAGE-Expression zu befassen. Es gibt bereits zahlreiche Publikationen zu Effekten von

Ischämie- und Reperusionsmodellen am Myokard im Zusammenhang mit RAGE, jedoch wurden bisher keine Untersuchungen zu alters- und genotypabhängigen kardialen funktionellen Veränderungen bei Tieren, die RAGE am Herzen überexprimieren, durchgeführt.

Da die AGE-RAGE-Interaktion mit ihren proinflammatorischen, prothrombogenen und strukturell-gewebeverändernden Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen zu spielen scheint, war es Ziel dieser Arbeit, mögliche RAGE-vermittelnde Veränderungen der Herzleistung besonders beim Altern, aufzuzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die nachfolgende *Tabelle* beinhaltet eine Auflistung der verwendeten Chemikalien mit den entsprechenden Herstellerangaben.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien mit Herstellerangaben

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
3-Mercaptopropionsäure	SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim
Acrylamid-Mix 40%	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Biomol, Hamburg
Anti-GFP (B-2), Mouse	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Rabbit, HRP linked	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-RAGE (A905), Rabbit	Herstellung in Würzburg (Prof. Dr.Simm)
Benzonase	Merck, Darmstadt
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Bisacrylamid Serva	Serva, Heidelberg
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
CAPS-Pulver	AppliChem, Darmstadt
Comassi Blau	Bio-Rad, München
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 4%	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Glycin	Serva, Heidelberg

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Luminol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	SUCOFIN, Deutschland
Mouse True Blot Ultra	eBioscience, Frankfurt a. Main
N,N,N',N',Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol, Hamburg
Natriumhydroxid 1M	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat	Sigma, Deisenhofen
Page Ruler (Proteingrößenmarker)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ponceau Rot	Sigma, Deisenhofen
Phosphatase-Inhibitor-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure 1M	Merck, Darmstadt
Super Signal Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
TWEEN 20	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Puffer und Lösungen

10%-iges Trenngel

5,9ml	ddH ₂ O
5,0ml	Acrylamid Mix 40%
3,8ml	1,5M Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan) (ph 8,8)
0,15ml	SDS (Sodium Dodecylsulfate) 10%
0,15ml	Ammoniumpersulfat 10%
0,006ml	TEMED (Tetramethylethyldiamin)

5%-iges Sammelgel

3,4ml	ddH ₂ O
0,83ml	Acrylamid Mix 40%
0,63ml	1,0M Tris (pH 6,8)
0,05ml	SDS 10%
0,05ml	Ammoniumpersulfat 10%
0,005ml	TEMED

10xSDS-Laufpuffer

30g	Tris (pH 8,6)
144g	Glycin
15g	SDS

Lysepuffer

2ml	2% SDS
0,5ml	50mM Tris-HCL (pH 6,7)
0,1ml	1mM Natriumvanadat
0,1ml	Protease-Inhibitor
0,1ml	Phosphatase-Inhibitor-Mix
7,2ml	ddH ₂ O

1%-iges BSA

1g	BSA
ad 100ml	TBS-T

3%-ige Milchlösung

3g	Milchpulver
ad 100ml	TBS-T

Primärantikörper (1:1000)

10µl	Primärantikörper
ad 10ml	1%-iges BSA oder 3%-ige Milchlösung

Sekundärantikörper (1:10000)

1,0µl	Sekundärantikörper
ad 10ml	1%-iges BSA oder 3%-ige Milchlösung

TBS-T

10ml	1M Tris-HCL (pH 7,6)
8,76g	NaCl (Natriumchlorid)
1ml	Tween 20
ad 1l	ddH ₂ O

TBS

10ml	1M Tris-HCL
8,76g	NaCl
ad 1l	ddH ₂ O

CAPS-Blotpuffer (pH 10,0)

11,1g	CAPS-Pulver
87µl	Me-OH (3-Mercaptopropanolsäure)
ad 1l	ddH ₂ O

Ponceaurot

0,5g	Ponceau-S-Pulver
1ml	Essigsäure
ad 100ml	ddH ₂ O

Entfärberlösung

50ml	Methanol
100ml	Eisessig
ad 1l	ddH ₂ O

2.1.3 Geräte und Sonstiges

Die nachfolgende *Tabelle* beinhaltet die verwendeten Materialien und Geräte mit Hersteller- bzw. Firmenangaben.

Tab. 2: Auflistung von Material, Geräten und Herstellern

<i>Geräte/Material</i>	<i>Hersteller/Firma</i>
2x PVDF-Membranen (8x6cm)	Millipore Corporation, Billerica Massachusetts
6x Filterpapier (8x6cm)	Whatman, Maidstone UK
Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Echokardiographiegerät	Vivid i, GE Healthcare München
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Feinwaage BP210S	Sartorius, Göttingen
FluoStar Optima	BMG Labtech, Offenburg
Handystep Multipipette	Brand, Wertheim
Image Reader LAS 300	Fujifilm, Düsseldorf
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrotiterplatte, 96-Well	VITARIS AG, Baar, Schweiz

<i>Geräte/Material</i>	<i>Hersteller/Firma</i>
PAGE-Gelkammer	Bio-Rad, München
Probenschüttler KS250 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot-SD	Bio-Rad, München
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY USA

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere und Tierhaltung

Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Versuche wurden weibliche und männliche Mäuse vom C57/BL6-Stamm (WT) verwendet. Dazu kamen auf dem gleichen genetischen Background der C57/BL6-Maus RAGE-Knockout-Tiere (KO) (von Frau Prof. Dr. Angelika Bierhaus, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt) sowie transgene heterozygote RAGE im Herzen-überexprimierende Tiere (TGÜ), bei welchen RAGE hinter dem alpha-Myosin-Heavy-Chain-Promotor kloniert wurde, der > 8. Rückkreuzung auf einen C57/BL6 Stamm.

Die Mäuse wurden im Tierstall des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung Halle, in Kunststoffschalen mit Käfigabdeckung gehalten. Maximal fünf Tiere befanden sich jeweils in einem Käfig. Sie hatten Trinkwasser ad libitum und pelletiertes Futter, Altromin 1324. Die Belüftung der Räume erfolgte automatisch über eine Klimaanlage, zur Gewährleistung sowohl tierschutzrechtlicher Bestimmungen als auch homogener Versuchsbedingungen. Die Temperatur lag während des Versuchsablaufs im Mittel bei 23°C, mit einer Luftfeuchte von ca. 65%. Der Tag-/Nacht-Rhythmus erfolgte im Wechsel von 12-Stunden durch automatische Beleuchtungsregulation.

2.2.2 Physikalische Grundlagen des Ultraschalls

Die physikalischen Grundlagen des Ultraschalls wurden aus folgender Literatur zusammengetragen:

„*Ein- und zweidimensionale Echokardiographie mit Dopplertechnik*“, KÖHLER, 1992,
„*Checkliste: Echokardiographie*“, BÖHMEKE UND WEBER, 1995 und
„*Echokardiographie-Handbuch*“, HIEN, 1996.

Schall wird definiert als mechanische Schwingung in festen, flüssigen und gasförmigen Medien. Schallwellen zwischen 16Hz (Hertz) und 20kHz (Kilohertz) können vom Menschen wahrgenommen werden. Als Ultraschall werden Wellen bezeichnet die über 20kHz betragen. In der medizinischen Diagnostik werden Ultraschallwellen zwischen 1 und 10MHz (Megahertz) eingesetzt. Hohe Frequenzen bieten eine hohe Auflösung bei einer geringen Eindringtiefe und niedrige Frequenzen eine geringere Auflösung bei jedoch höherer Eindringtiefe.

Zur Erzeugung von Ultraschallwellen wird das piezoelektrische Prinzip verwendet, welches elektrische Energie in mechanische Energie umwandelt. Eine Spannung wird an einem Piezokristall angelegt und erzeugt durch dessen proportionale Deformation eine Druckwelle. Umgekehrt ergibt eine auf das Piezokristall auftreffende Schallwelle eine proportionale Spannungsänderung. Somit dient der Ultraschallkopf sowohl als Sender als auch als Empfänger.

Das piezoelektrische Element im Ultraschallwandler erzeugt einen zeitlich begrenzten Impuls. Die dabei entstehenden Schallwellen, die sich im beschallten Medium entsprechend der Schallgeschwindigkeit (circa 1540 m/s) ausbreiten, werden an den Grenzflächen absorbiert, gestreut oder reflektiert. Die reflektierten Schallwellen werden hinsichtlich ihrer Laufzeit (entspricht der Entfernung des Reflexionsortes vom Ultraschallwandler) und Amplitude (entspricht der Helligkeit des Bildpunktes vom Ultraschallwandler) analysiert.

Um den Impedanzunterschied zwischen der Ultraschallsonde und der Hautoberfläche zu minimieren, wird die Ultraschallsonde mittels eines stark wasserhaltigen Gels angekoppelt.

B-Mode

Der B-Mode (Brightness-Mode) ist ein zweidimensionaler Schnitt durch das Herz. Die reflektierenden Signale werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Intensität in Graustufen wiedergegeben. Durch eine entsprechende Anzahl an Bildwiederholungsraten kann der Bildaufbau in „real-time“ dargestellt werden. Die dabei entstehende minimale Zeitverzögerung kann vom menschlichen Auge nicht wahrgenommen werden.

Der Linearschallkopf beinhaltet wiederum Piezokristalle, welche in Reihe angeordnet sind und ein rechteckiges Bild erzeugen. Ein Vorteil des Linearschallkopfes ist die gute Auflösung von schallkopfnahen Strukturen, was ideal bei der Untersuchung oberflächennaher Strukturen ist. Nachteilig ist die dafür benötigte große Fläche zur Ankopplung, was die Handhabung unter beschränkten Platzverhältnissen erschweren kann.

TM-Mode

Der TM-Mode (Time-Motion-Mode) stellt eine eindimensionale Messung in Abhängigkeit von der Zeit dar. Die detektierte Bewegung wird kontinuierlich auf einer Zeitachse abgetragen. Dadurch können schnell ablaufende und komplexe Bewegungsmuster, wie z.B. Herzklappenbewegungen, dargestellt werden. Die zu untersuchenden Strukturen müssen annähernd rechtwinklig vom Schallfeld getroffen werden. Die M-Mode-Darstellung ist aufgrund ihres abstrakten Aussehens oft mit der B-Mode-Darstellung gekoppelt. Im M-Mode können somit die Herzmorphologie sowie die Wand- und Klappenbewegungen zuverlässig quantifiziert werden.

Farbdoppler

Der Farbdoppler stellt eine zweidimensionale Erweiterung und Modifikation des gepulsten Dopplers dar. Diese Technik entspricht einer flächenhaften PW-Analyse, wobei die Dopplershifts farblich kodiert werden. Der Fluss in Richtung Schallkopf wird rot kodiert. Der Fluss vom Schallkopf weg wird blau dargestellt. Die gemessenen Flussgeschwindigkeiten sind proportional zu den Helligkeitsstufen. Mit steigender Geschwindigkeit wird die Farbe heller (hellrot, hellblau). Treten Turbulenzen auf, wie bei Klappeninsuffizienzen oder Stenosen, wird eine große Anzahl von abweichenden gemessenen Geschwindigkeiten erfasst. Ein solches Flussmuster wird durch die Farbe grün angezeigt. Bei sehr hohen Geschwindigkeiten kommt es zum Aliasing-Phänomen, welches eine Farbumkehr bei Überschreiten der Nyquist-Grenze beschreibt.

2.2.3 Ultraschallgerät Vivid i

Für die Durchführung des Herzultraschalls wurde ein Echokardiographiegerät der Firma GE Healthcare, München verwendet. Das Vivid i (siehe *Abbildung 2*), welches u.a. in der Pädiatrie, Kardiologie, Neonatologie und Angiologie genutzt wird, eignet sich gut für die echokardiographische Untersuchung der Maus. Als Schallkopf wurde eine Linearsonde mit 13 MHz verwendet. Mit diesem Schallkopf wurden Bilder im B-Bild, M-Mode und Farbdoppler aufgenommen.

Der Continuous-Wave-Doppler (CW-Doppler) konnte mit dem Linearschallkopf aus physikalischen Gründen, laut Herstellerangaben, nicht genutzt werden.

Die ermittelten Daten wurden digital erfasst und als Rohdaten auf dem Gerät gespeichert. Mittels einer integrierten Auswertungssoftware (EchoPAC-Workstation) konnten die Daten im Anschluss der Untersuchung vermessen und analysiert werden.



Abb. 2: Ultraschallgerät Vivid i der Firma GE Healthcare, München

2.2.4 Echokardiographie der Maus

Die Echokardiographie stellt eine wichtige nichtinvasive und relativ zeit- und kostengünstige Methode zur Herzuntersuchung am Tiermodell dar. Mausmodelle, welche genetisch sehr gut modifiziert werden können, wurden bereits Anfang der 90iger Jahre echokardiographisch am Herzen untersucht und seitdem wurde die Methodik weiter optimiert (HOIT et al., 1995). Trotz der relativ einfachen Durchführung der Echokardiographie ergeben sich jedoch einige wichtige Einschränkungen, welche bei der Versuchsplanung unbedingt beachtet werden sollten.

SCHERRER-CROSBIE und THIBAUT (2008), beschrieben Besonderheiten der Echokardiographie am Mausmodell, welches unter anderen durch hohe Herzfrequenzen von 500–700 Schlägen/Minute gekennzeichnet ist. Weiterhin beeinflussen die minimale Herzgröße, sehr schmale Interkostalräume und Anästhesie-Wirkungen wie Bradykardie, Hypotonie und Atemdepression

die Herzultraschalluntersuchung. Das Herz einer Maus ist zudem vertikaler gelegen als das menschliche Herz. Die parasternale lange und kurze Achse sind gut darstellbar und reproduzierbar, jedoch ist die apikale Achse schwierig darzustellen und schlechter reproduzierbar. Dadurch ist eine Beurteilung der kompletten diastolischen Funktion und des rechten Ventrikels (RV) deutlich eingeschränkt. Die komplexe Form und die schmale Größe des rechten Ventrikels minimieren eine ausreichende Darstellung und somit eine genaue Analysierung von transthorakaler Anlotung. Weiterhin ist die diastolische Funktionsdarstellung deutlich von der Herzfrequenz abhängig. Durch die sehr hohe Herzfrequenz der Maus ist es oft nicht möglich, die E-Welle (E = early, passiver Einstrom durch die Ventilebene) von der A-Welle (A = atrial, aktiver Einstrom durch die Vorhofkontraktion) abzugrenzen und so die diastolische Funktion zu beurteilen. Des Weiteren wird durch die Narkosewirkung die Herzfrequenz deutlich gesenkt, wodurch eine Beurteilung der diastolischen Funktion unter physiologischen Bedingungen nicht gegeben ist, da die Herzfrequenz die diastolische Funktion deutlich beeinflusst. Empfohlen wird daher die Nutzung von Hochfrequenzsonden von über 8MHz.

Am häufigsten wurden bisher die linksventrikuläre Masse und die Herzfunktion untersucht. Dabei ist zu beachten, Mäuse nach Alter, Geschlecht und Mausstamm auszuwählen, da kardiale Parameter durch diese beeinflusst werden können. Trotz der aufgezählten Einflussfaktoren ist die Herzultraschalluntersuchung eine bewährte Methode zur Beurteilung der Herzfunktion am Mausmodell.

2.2.5 Narkose

Die sehr hohe Herzfrequenz und der erschwerte Umgang mit der aktiven Maus erfordert für eine ausführliche Echokardiographie eine Narkotisierung. Es ist prinzipiell möglich, eine sehr kurze echokardiographische Untersuchung von ca. 2 Minuten an wachen, untrainierten Mäusen durchzuführen (SCHOENSIEGEL et al., 2010). Jedoch limitiert die begrenzte Untersuchungszeit die Bestimmung relevanter Parameter.

In dieser Arbeit sollten Aussagen zur globalen systolischen linksventrikulären Pumpfunktion in Bezug auf die Ejektionsfraktion (EF) und zu den linksventrikulären Durchmessern gemacht werden, welche eine längere Untersuchungszeit notwendig machten. Der in diesem Zusammenhang benötigte Zeitbedarf machte die Narkotisierung der Tiere im Vorfeld notwendig.

Wichtige zu erwartende Einschränkungen einer Narkose an der Maus sind u.a. die Beeinflussung der Herzfrequenz und der systolischen Funktion (ROTTMAN et al., 2003). Weiterhin wirken verschiedene Narkotika kardio- und atemdepressiv.

Das im Rahmen der Untersuchungen verwendete Isofluran bietet im Vergleich zu anderen gebräuchlichen Narkotika die am besten reproduzierbare und am stabilsten bestimmbare FS (Fractional Shortening = Verkürzungsfraktion) und enddiastolischen Parameter (COLLINS et al., 2003).

Isofluran wirkt kaum arrhythmogen und hat mit 0,2% eine geringe Metabolisierung über die Leber (BRUNSON, 1997), was eine schnelle Aufwach- und Erholungszeit mit sich bringt. Des Weiteren ist es durch die geringe Metabolisierung weniger toxisch. Da es über eine Nasensonde verabreicht wird, bedeutet es weniger Stress für die Mäuse im Vergleich zu einer intraperitonealen Injektion.

In der folgenden *Abbildung* werden die Vorbereitung zur Untersuchung inklusive Narkosemaske und die Linksseitenlage, welche für die Echokardiographie notwendig war, graphisch dargestellt.

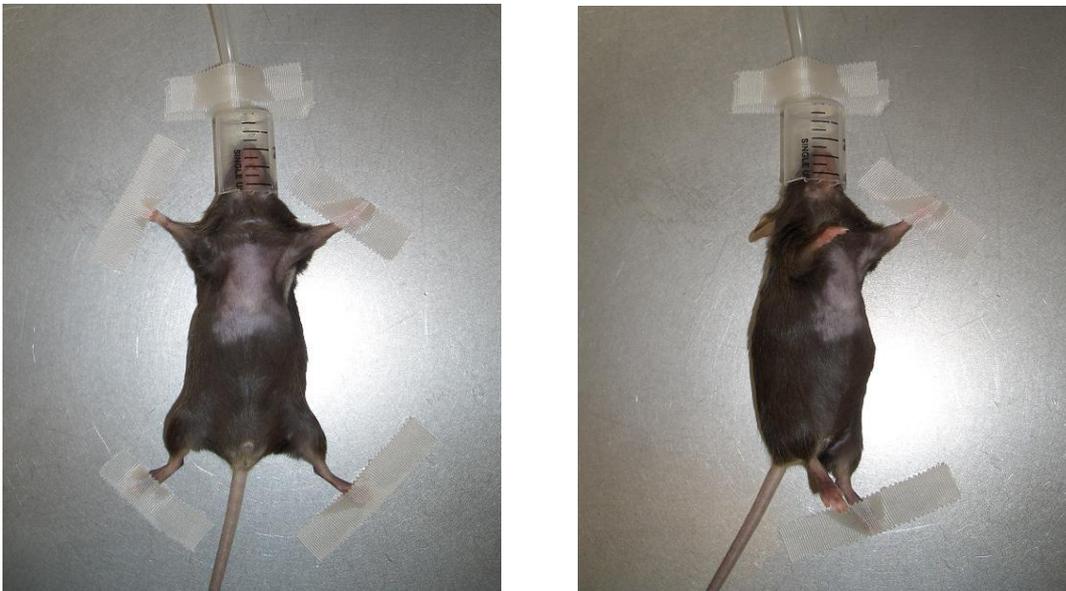


Abb. 3: Links: Vorbereitung zur Echokardiographischen Untersuchung, Zufuhr von Isofluran über eine Kopfmaske, Rechts: Linksseitenlage zur Echokardiographie

Versuchsgruppen

Die Mäuse wurden in verschiedene Untersuchungsgruppen eingeteilt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten getestet. In den folgenden *Tabellen 3 und 4* soll ein Überblick über die Anzahl der Tiere und die Versuchsgruppen gegeben werden.

Tab. 3: Anzahl der Tiere (WT: Wildtyp, KO: Knockout, TGÜ: transgene Überexpression)

<i>Geschlecht</i>	<i>Anzahl WT</i>	<i>Anzahl KO</i>	<i>Anzahl TGÜ</i>
Weiblich_Alt	12	12	8
Männlich_Alt	5	10	9
Weiblich_Jung	15	15	10
Männlich_Jung	15	15	10
Männlich_Sport	6	-	7

Tab. 4: Übersicht der Versuchsgruppen

<i>Versuchsgruppe</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Geschlecht</i>
Jungtiere (4-5 Monate)	Knockout Wildtyp transgene Überexpression	weiblich männlich
Geschwistertiere (Jung)	Wildtyp transgene Überexpression	männlich
Alttiere (22-23 Monate)	Knockout Wildtyp transgene Überexpression	weiblich männlich
Aktivität: Lauf radbelastung	Wildtyp transgene Überexpression	männlich

2.2.6 Echokardiographische Untersuchung

Die Ultraschalluntersuchungen wurde mit dem Gerät Vivid i der Firma GE Healthcare, München durchgeführt. Als Ultraschallkopf wurde eine 13MHz-Linearsonde verwendet.

Echokardiographische, technische Einstellungen:

<u>B-Bild</u>	Frequenz:	13MHz
	Bildtiefe:	1,5cm
	Bild per Second (BPS):	262,7
	Automatische Gewebeoptimierung (ATO)	
<u>M-Mode</u>	Frequenz:	13MHz
	Bildtiefe:	1,5cm
	BPS:	155,8
	ATO	
<u>Farbdoppler</u>	Frequenz:	5,7MHz
	Bildtiefe:	1,5cm
	BPS:	54,5
	ATO	

Zur Anästhesie wurde das Inhalationsnarkotikum Isofluran verwendet. Zuerst wurden die Mäuse für 1-3 Minuten in eine durchsichtige Plastikbox mit den Maßen L22xH12xT12cm gesetzt und mit 2%iger Isofluran- und ca. 98%iger Sauerstoffmischung narkotisiert. Es wurde gewartet bis eine Bewegungsunfähigkeit der Tiere eingetreten war, danach erfolgte die Entnahme aus der Box mit anschließender Gewichtsbestimmung. Nachfolgend wurden die Versuchstiere zur Vorbereitung der Untersuchung auf eine 39°C warme Heizplatte in Rückenlage gelegt und kontinuierlich bis zum Untersuchungsende über eine Kopfmassage mit 1-1,5 % Isofluran im narkotisierten Zustand gehalten. Während der Rückenlage wurde der Thorax gründlich rasiert und danach

mit einem nassen Tuch die restlichen Haare entfernt bzw. der Brustkorb befeuchtet, um den Hautwiderstand zu verringern. Anschließend wurden die Versuchstiere in eine leichte Linksseitenlage gebracht, wobei die linke Vorderpfote etwas nach oben gezogen und mit hautfreundlichem Pflaster fixiert wurde. Bei Bedarf wurden die Hinterpfoten etwas gestreckt und ebenfalls leicht mit Pflaster fixiert. Nach entsprechender Lagerung wurde der Brustkorb mit dem Finger mit einer gleichmäßigen Schicht Ultraschallgel bedeckt. Es wurde in diesem Kontext darauf geachtet, dass die Ultraschallsonde mit ca. 10 mm Ultraschallgel bedeckt war. Weiterhin wurde während der Untersuchung darauf geachtet, dass kein Druck mit der Ultraschallsonde auf den Brustkorb ausgeübt wurde, um das Auslösen einer Bradykardie und/oder Hypotonie zu vermeiden. Im Mittel wurden fünf kardiale Zyklen von jeder Einstellung für die spätere Ausmessung digital gespeichert. Aus den gespeicherten Daten wurden jeweils die drei optisch besten Zyklen vermessen und gemittelt. Vermessen wurde nach der „leading edge- to-leading edge-Methode“, herausgegeben durch die American Society of Echocardiography (SCHILLER et al., 1989).

Zu Beginn der Untersuchung wurde die parasternale lange Achse im B-Bild eingestellt und im Cineloop digital gespeichert. Zur Kontrolle der korrekten Position des Schallkopfes wurde der Farbdoppler im B-Bild zur Detektierung der Aorten- und Mitralklappe eingestellt und gespeichert. Die Beurteilung des linken Ventrikels (LV) erfolgte im M-Mode wie in *Abbildung 4* dargestellt.

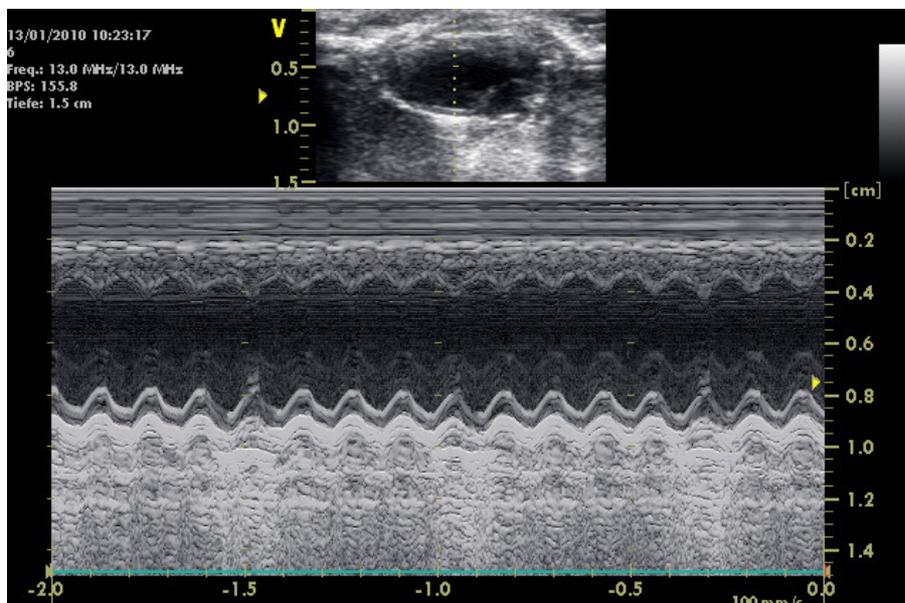


Abb. 4: M-Mode-Darstellung des linken Ventrikels eines murinen Echokardiogramms

Das interventrikuläre Septum wurde dabei so eingestellt, dass es waagrecht dargestellt wurde, so dass der Messstrahl senkrecht, etwa in Höhe der Mitralklappensegelspitzen platziert werden

konnte. In dieser M-Mode-Darstellung wurden der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDd), die enddiastolische Hinterwanddicke (LVPWd), der endsystolische Diameter (LVEDs) und die endsystolische Hinterwanddicke (LVPWs) bestimmt.

Aus den Parametern LVEDd und LVEDs konnte anschließend die Verkürzungsfraction (FS) errechnet werden.

$$FS (\%) = (LVEDd - LVEDs) / LVEDd \times 100$$

Die Parameter EDV (enddiastolisches Volumen) und ESV (endsystolisches Volumen) dienen zur Bestimmung der EF nach Teichholtz.

$$EF (\%) = (EDV - ESV) / EDV \times 100$$

Als nächstes wurde im B-Bild die parasternale kurze Achse auf Höhe der Papillarmuskeln eingestellt und als Loop gespeichert, um eine subjektive Beurteilung der linksventrikulären Wandbewegungen vorzunehmen.

Die Ultraschalluntersuchung dauerte in der Regel 15 – 20 Minuten. Nach Abschluss der Untersuchung wurden die Mäuse vom Kontaktgel befreit und allein in einen Extrakäfig unter Frischluftzufuhr bis zur vollständigen Mobilisation gesetzt. Die Tiere wachten innerhalb weniger Minuten wieder auf und waren bereits nach ca. 5 – 10 Minuten wieder voll aktiv.

Im Anschluss an die Nachbereitung der Tiere erfolgte die Vermessung der zuvor digital gespeicherten Daten, mittels der im Gerät integrierten Analysesoftware.

Für eine optimale Darstellung der Herzklappen ist eine apikale Anlotung notwendig sowie eine Schallsonde von mindestens 30MHz, ein CW-Doppler und ein Gewebedoppler. Da das zur Verfügung stehende Gerät diese technischen Voraussetzungen nicht erfüllte, konzentrierte man sich stattdessen auf das Vermessen des linken Ventrikels.

2.2.7 Organentnahme

Nach Beendigung der Echokardiographie-Untersuchung wurden zur Stichprobenanalyse des Genotyps Tiere durch die Tierpfleger tierschutzgerecht getötet. Anschließend erfolgte durch eine Thorakotomie die Entnahme des Herzens. Nach dessen Gewichtsbestimmung wurde das Herz mit 4%iger Formaldehydlösung gespült. Der Apex wurde abgeschnitten und bei -80°C bis zu seiner weiteren Verwendung eingelagert. Der Rest des Herzens wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur in Formaldehyd gelegt und danach bis zur weiteren Verarbeitung in 70%igen Ethanol konserviert.

2.2.8 Proteinnachweis

Für den Nachweis von RAGE und GFP (green fluorescent protein) in den Mäuseherzen auf Proteinebene zur Verifizierung der Gruppen (Wildtyp-, Knockout- und transgene Überexpressionsstiere), wurde die entnommene Herzspitze genutzt. Es erfolgte zunächst eine Gewebelysierung, anschließend wurde die Messung der Proteinkonzentration jeder Probe durchgeführt und daraufhin eine Gelelektrophorese bzw. ein Western Blot gemacht.

Proteinpräparation

Das in flüssigem Stickstoff gelagerte Gewebe wurde in feste Alufolie gewickelt und mit einem herkömmlichen Hammer mechanisch zerkleinert. Danach wurde die Folie in Stickstoff gehalten, um ein Auftauen zu vermeiden. Das gefrorene und zerkleinerte Gewebe wurde in einem 2 ml umfassenden Reaktionsgefäß mit jeweils 300 μl frischen Lysepuffer inkubiert und mit einem Vortex-Handgerät homogenisiert. Nach einer ca. 20-minütigen Lagerung auf Eis wurden die Proben für 10 Minuten bei 14000 Umdrehungen und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert, um anschließend den Überstand zu verwenden.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Um zu gewährleisten, dass jede zu untersuchende Probe die gleiche Proteinkonzentration enthält, muss der Proteingehalt jeder einzelnen Gewebeprobe bestimmt werden. Dies erfolgte mit

Hilfe des BCA-Protein-Assay-Kits (BCA – Bicichoninsäure). Dazu wurde eine Eichgerade aus neun genau definierten Albumin-Standards verwendet und eine Doppelbestimmung der zu untersuchenden Herzproben gemacht. Dafür wurden wiederum in eine 96-Well-Platte in die 1. Reihe jeweils 10µl der neun Standards und in die 2. und 3. Reihe jeweils 10µl der Proben pipettiert. Anschließend wurde in jede der Wells 200 µl BCA gegeben und für etwa 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden mit einem Mikroplattenlesegerät, dem FluoStar Optima, die Absorption bei 570 nm vermessen. Aus der Eichgeraden errechnete man anschließend die Proteinkonzentration und stellte daraufhin die gleiche Konzentration in allen Proben mit SDS Lysepuffer ein. Zusätzlich wurde noch 3-Mercaptoethanol zugegeben, die Proben erhitzt und mittels Eis wieder abgekühlt.

Gelelektrophorese

Die Elektrophorese dient zur Auftrennung der einzelnen Proteine in Abhängigkeit ihrer Größe, Ladung und weiterer Eigenschaften. Zur Anwendung kamen in diesem Zusammenhang SDS-Polyacrylamid Gele.

Nach der Polymerisierung des Gels wurden die Gelplatten in die Elektrophoresekammer gegeben und die Geltaschen mehrmals mit dem Laufpuffer gespült. Nach Beladung wurde zu Beginn eine Spannung von 100 V (Sammelgel) und danach eine Spannung von 130 V für ca. 60 Minuten angelegt.

Western Blot

Beim Western Blot werden die aus dem Gel zuvor aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran (z.B. Nitrozellulose, PVDF (Polyvinylidenfluorid)) übertragen und anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper die Zielproteine nachgewiesen und sichtbar gemacht.

Für den Blot wurde eine PVDF-Membran verwendet, welche zuvor in Methanol getränkt wurde. In der Blotapparatur wurde der Semidry-Blot wie folgt vorbereitet:

zwei Lagen in CAPS-Puffer (3-Cyclohexamino-Propansulfonsäure) getauchte Filterpapiere, die in Methanol-getränkte PVDF-Membran, Luftblasen wurden mit einer weichen Rollbürste entfernt, Gel, zwei Lagen in CAPS-Puffer getauchte Filterpapiere. Die Kammer wurde verschlossen und für 70 Minuten eine Spannung mit 25 V und 0,12 mA angelegt. Danach wurden die Gele mit Coomassie Blau über Nacht auf einem Probenschüttler bei Raumtemperatur gefärbt

und nach Entfärbung zur Dokumentation fotografiert. Die Membranen wurden mit Ponceaurot gefärbt und ebenfalls fotografiert. Danach wurden diese zunächst mit Wasser und anschließend mit TBS-T (Tris-Gepufferte-Salzlösung-Tween) vollständig entfärbt.

Um die unspezifische Bindung zu blockieren, wurden die Membranen bei 4 C auf einem Taumler über Nacht in 1%-iger BSA-Lösung (Bovines Serumalbumin) inkubiert. Danach wurden die Membranen mit den Primärantikörpern (1:1000, RAGE-AK, Rabbit und GFP-AK, Mouse) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Membranen (3x5 Minuten mit TBS-T) wurden diese 60 Minuten bei Zimmertemperatur mit den Sekundärantikörpern (Anti-Rabbit für den RAGE-AK, 1:10000 mit 1%-igen BSA und Anti-Mouse für den GFP-AK, 1:10000 in 3%-iger Milchlösung) inkubiert. Dann wurden die Membranen nochmals für 3x5 Minuten mit TBS-T und 1x5 Minuten mit TBS gewaschen. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurden die Membranen mit einer Luminollösung behandelt, in der LAS-3000 Imagestation (Fuji) detektiert und anschließend ausgewertet.

Im Anschluss wurde auf den Membranen das Kontrollgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) nachgewiesen. Anti-GAPDH wurde als Primär-AK mit einer Verdünnung von 1:1000 mit 1%-iger BSA auf die Membranen gegeben und jeweils für eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen 3x5 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend wurde der Sekundär-AK, Anti-Rabbit, in einer 1:10000 Verdünnung mit 1%-iger BSA auf die Membranen gegeben und wiederum für eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Später wurden die Membranen wieder 3x5 Minuten mit TBS-T und 1x5 Minuten mit TBS gewaschen. Die Membranen wurden dann mit Luminollösung behandelt und durch den Image Reader fotografisch ausgewertet.

2.2.9 Statistische Auswertung

Für jeden echokardiographisch erhobenen Parameter wurde der Mittelwert aus drei verschiedenen Messungen errechnet.

Zur statistischen Berechnung der Werte wurde IBM SPSS Statistics (Statistical Package for the Social Sciences), Version 18, verwendet.

Es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung vom Mittelwert (Standardfehler) erhoben. Zum Vergleich der einzelnen Gruppen und Subgruppen wurde für jeweils zwei unabhängige Stichproben der doppelseitige t-Test verwendet. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen, wurde die einfaktorielle ANOVA (Analysis of Variance) genutzt.

Eine statistische Signifikanz konnte angenommen werden, wenn der p-Wert $< 0,05$ war. Lag der p-Wert $> 0,05$ konnten keine signifikante Unterschiede gezeigt werden. Ein Trend zur Signifikanz zeigte sich bei einem p-Wert $> 0,05 - 0,1$.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinbestimmung

Zur Verifizierung der verwendeten Mauslinien wurden punktuell Analysen zur Expression von RAGE im Herzen gemacht. Bei der Herstellung war sowohl bei der Knockout-Maus (KO) als auch bei der transgenen Überexpressions-Maus (TGÜ) GFP als Kontrollgen mit einkloniert worden.

Es waren folgende Resultate zu erwarten: RAGE in der Knockout-Maus nicht vorhanden, in der Wildtyp-Maus (WT) sehr gering und in der transgenen Maus stark exprimiert. GFP sollte nicht im WT nachweisbar sein. Daher wurde ein Nachweis auf Proteinebene für das RAGE und das GFP-Protein am murinen Herzen mittels Elektrophorese und Western Blot durchgeführt. RAGE hat eine Molekülmasse von 42 kDa (ca. 55 kDa im Blot), GFP von 27 kDa und GAPDH von 37 kDa. Das RAGE-Protein konnte bei der überexprimierten RAGE-Maus etwa im Bereich der 55 kDa-Bande nachgewiesen werden. Da die Knockout-Maus RAGE nicht exprimiert, war auch kein entsprechendes Protein mittels Western Blot nachweisbar. Die Sensitivität des Tests war zu gering, um bei der Wildtyp-Maus RAGE nachzuweisen. Grünfluoreszierendes Protein konnte entsprechend der Erwartungen am Herzen bei allen genetisch veränderten Tieren (KO und TGÜ) dargestellt werden. Bei allen Proben (WT, KO, TGÜ) war GAPDH im Bereich der 35 kDa-Bande nachweisbar. GAPDH als „housekeeping gene“ diente als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Proben.

Für die Abbildungen und Tabellen des Ergebnisteils wurden folgende Abkürzungen und Erklärungen verwendet:

m:	männlich
w:	weiblich
KO:	Knockout
WT:	Wildtyp
TGÜ:	transgener Überexpressionstyp
Trend zur Signifikanz; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001	

In *Abbildung 5* wird die Proteinbestimmung der Stichproben an Hand des Western Blots dargestellt.



Abb. 5: Western Blot für die Proteine RAGE, GFP und GAPDH; 1 = Sportgruppe, 2 = Jungtiere

3.2 Ergebnisse der Echokardiographie

Mittels Echokardiographie wurde untersucht, ob bei unterschiedlicher kardialer RAGE-Expression (KO, WT, TGÜ) funktionelle Veränderungen am Herzen hinsichtlich Alter, Geschlecht, Genotyp und physischer Aktivität sichtbar werden.

Für alle nachfolgenden Gruppen wurden die globale systolische linksventrikuläre Pumpfunktion im Rahmen der Ejektionsfraktion (EF) nach *Teichholtz* und der Verkürzungsfraktion (FS), die enddiastolischen- und endsystolischen linksventrikulären Durchmesser bestimmt und miteinander verglichen. Die folgenden Tabellen skizzieren die ergebnisrelevanten Parameter der Untersuchungen. Die Messwerte für die linksventrikulären Durchmesser werden dabei in [mm] angegeben. Für die Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion werden hingegen prozentuale Angaben gemacht. Bei allen Werten mit $p < 0,05$ handelt es sich hinsichtlich der gegenübergestellten Parameter um einen signifikanten Zusammenhang. Einen Trend zur Signifikanz zeigen ferner Werte von $p > 0,05$ bis 0,1 an.

3.2.1 Junge Tiere

Vergleich von geschlechtsspezifischen und genotypischen Unterschieden

Echokardiographisch untersucht wurden Tiere vom Wildtyp, vom Knockouttyp und vom transgenen Überexpressionstyp im Alter von 4 – 5 Monaten.

In *Tabelle 5* sind das Gewicht und die Herzfrequenz für die Versuchsgruppen aufgeführt.

Tab. 5: Übersicht über Gewicht und Herzfrequenz der Jungtiere

<i>Gruppen</i>	<i>Gewicht [in g]</i>	<i>Herzfrequenz [in BPM]</i>
Weiblich_WT versus Männlich_WT	24,34 ± 0,67 p < 0,05	408 ± 17 p > 0,05
Weiblich_KO versus Männlich_KO	21,61 ± 0,6 p < 0,05	432 ± 16 p < 0,05
Weiblich_TGÜ versus Männlich_TGÜ	23,34 ± 0,37 p < 0,05	391 ± 21 p > 0,05

Geschlechtsspezifische Unterschiede

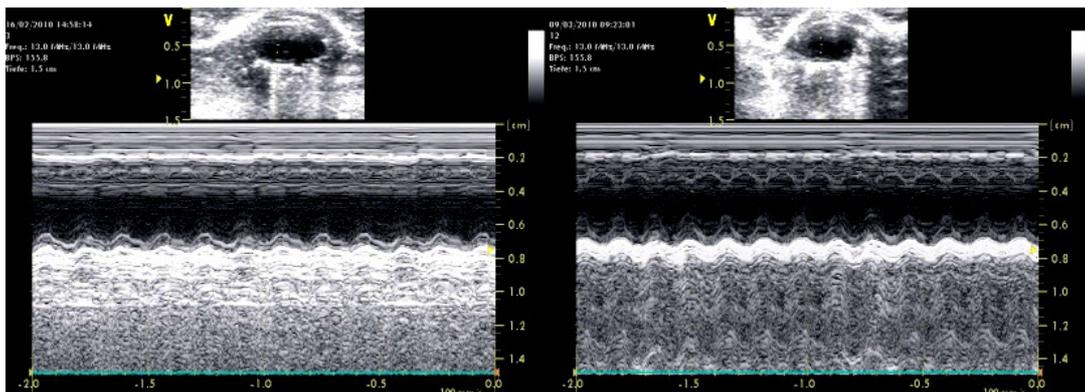
Um herauszufinden, ob sich zwischen den weiblichen und männlichen Tieren Unterschiede zeigen, wurden weibliche Jungtiere mit männlichen Jungtieren aller drei Genotypen verglichen.

In der nachfolgenden *Tabelle* wurden die gemessenen Parameter für den linken Ventrikel der einzelnen Gruppen, im geschlechtsspezifischen Vergleich, zusammengefasst.

Tab. 6: Jungtiere im Vergleich (geschlechtsspezifisch), Ergebnisse der linksventrikulären Parameter

<i>Gruppen</i>	<i>LVEDd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVEDs</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWs</i> <i>[in mm]</i>	<i>FS</i> <i>[in %]</i>	<i>EF</i> <i>[in %]</i>
wWT	4,10 ±0,06	0,59 ±0,02	2,77 ±0,05	0,96 ±0,02	32,60±0,65	67,60±0,94
versus	p < 0,05	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,001
mWT	4,31 ±0,13	0,58 ±0,03	3,27 ±0,14	0,78 ±0,03	24,50±1,29	54,90±2,18
wKO	3,66 ±0,07	0,59 ±0,02	2,53 ±0,07	0,81 ±0,04	31,10±0,82	67,60±0,95
versus	p < 0,05	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
mKO	4,01 ±0,12	0,56 ±0,01	2,88 ±0,09	0,81 ±0,01	28,20±0,95	61,20±1,48
wTGÜ	4,25 ±0,06	0,56 ±0,02	3,00 ±0,05	0,84 ±0,02	29,40±0,67	63,20±0,97
versus	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,001
mTGÜ	4,67 ±0,10	0,56 ±0,02	3,70 ±0,09	0,72 ±0,01	20,80±1,06	48,30±2,20

Die *Abbildungen 6-8* zeigen den Vergleich linksventrikulärer enddiastolischer und endsystolischer Durchmesser zwischen jungen männlichen und weiblichen Tieren.

**Abb. 6:** LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: männlich_Knockout, Rechts: weiblich_Knockout

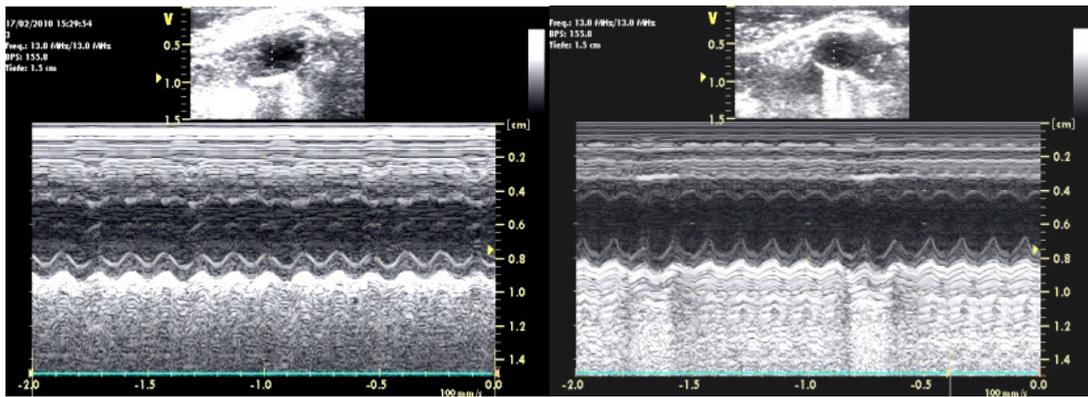


Abb. 7: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: männlich_Wildtyp, Rechts: weiblich_Wildtyp

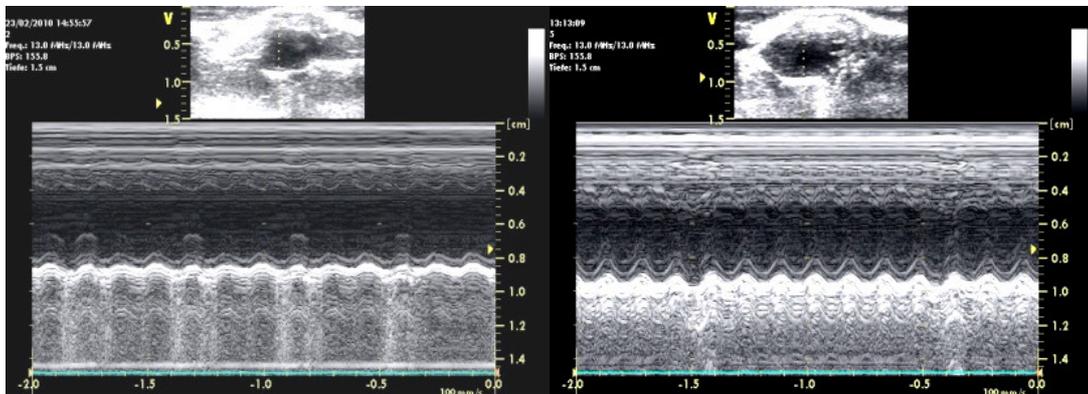


Abb. 8: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: männlich_transgener Überexpressionstyp Rechts: weiblich_transgener Überexpressionstyp

Die Daten aus *Tabelle 6* zeigten eine deutlich bessere Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion der weiblichen Wildtyp- und transgenen Überexpressionstiere im Vergleich zu den entsprechenden männlichen Tieren. Dies deutet auf eine bessere globale systolische linksventrikuläre Pumpfunktion der weiblichen Tiere hin, siehe auch Abbildung 9. Dagegen zeigten sich diesbezüglich keine relevanten Unterschiede in der Knockoutgruppe.

Für alle weiblichen Genotypen konnte ein kleinerer endsystolischer linksventrikulärer Durchmesser und für die weibliche Knockout-Gruppe darüber hinaus ein kleinerer enddiastolischer linksventrikulärer Durchmesser im Vergleich zu den männlichen Tieren festgestellt werden.

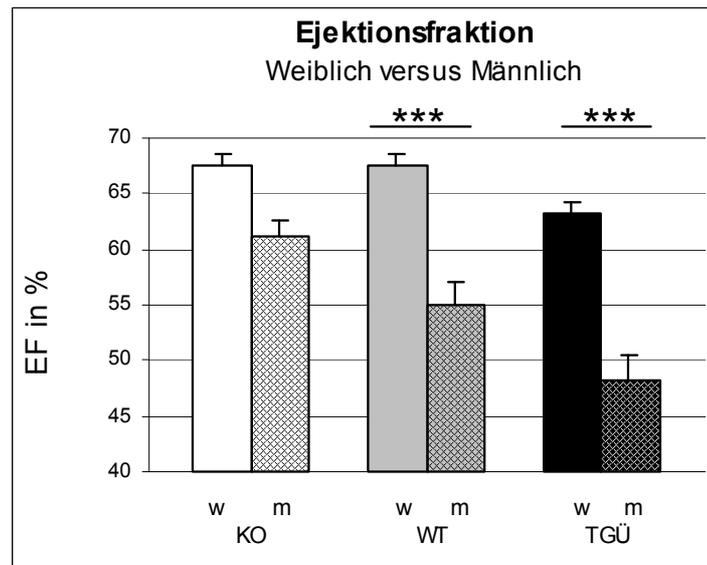


Abb. 9: Junge Tiere: Ejektionsfraktion des Linken Ventrikels im geschlechtsspezifischen Vergleich

Genotypische Unterschiede

Im Folgenden soll auf die genotypischen Unterschiede eingegangen werden. Die jungen, weiblichen und männlichen Versuchstiere wurden mit Bezug auf deren Genotyp untereinander verglichen.

Dabei wurde jeweils die Wildtypgruppe mit der Knockoutgruppe, die Wildtypgruppe mit der transgenen Überexpressionsgruppe und die Knockoutgruppe mit der transgenen Überexpressionsgruppe verglichen. Die gemessenen Daten der linksventrikulären Parameter sind in *Tabelle 7* abgebildet.

Tab. 7: Jungtiere im Vergleich (genotypspezifisch), Ergebnisse der linksventrikulären Parameter

<i>Gruppen</i>	<i>LVEDd</i> [in mm]	<i>LVPWd</i> [in mm]	<i>LVEDs</i> [in mm]	<i>LVPWs</i> [in mm]	<i>FS</i> [in %]	<i>EF</i> [in %]
wWT versus wKO	4,10 ±0,06 p < 0,05	0,59 ±0,02 p > 0,05	2,77 ±0,05 p > 0,05	0,96 ±0,02 p < 0,05	32,60 ±0,65 p > 0,05	67,60 ±0,94 p > 0,05
wWT versus wTGÜ	4,10 ±0,06 p < 0,05	0,59 ±0,02 p > 0,05	2,77 ±0,05 p < 0,01	0,96 ±0,02 p > 0,05	32,60 ±0,65 p > 0,05	67,60 ±0,94 p > 0,05
wKO versus wTGÜ	3,66 ±0,07 p < 0,001	0,59 ±0,02 p > 0,05	2,53 ±0,07 p < 0,001	0,81 ±0,04 p > 0,05	31,10 ±0,82 p > 0,05	67,60 ±0,95 p > 0,05
mWT versus mKO	4,31 ±0,13 p > 0,05	0,58 ±0,03 p > 0,05	3,27 ±0,14 p < 0,05	0,78 ±0,03 p > 0,05	24,50 ±1,29 p < 0,05	54,90 ±2,18 p < 0,05
mWT versus mTGÜ	4,31 ±0,13 p > 0,05	0,58 ±0,03 p > 0,05	3,27 ±0,14 p < 0,01	0,78 ±0,03 p < 0,05	24,50 ±1,29 p < 0,05	54,90 ±2,18 p < 0,05
mKO versus mTGÜ	4,01 ±0,12 p < 0,001	0,56 ±0,01 p > 0,05	2,88 ±0,09 p < 0,001	0,81 ±0,01 p < 0,001	28,20 ±0,95 p < 0,001	61,20 ±1,48 p < 0,001

Aus den Daten von *Tabelle 7* geht hervor, dass sich in der weiblichen Gruppe signifikant größere linksventrikuläre Durchmesser bei Wildtyp- und den transgenen Überexpressionstieren, im Vergleich zu den Knockouttieren, zeigten. Dies wirkte sich jedoch nicht auf die systolische linksventrikuläre Pumpfunktion aus und ergab demnach keine signifikanten Unterschiede. Die weiblichen transgenen Überexpressionstiere hatten wiederum signifikant größere linksventrikuläre Durchmesser als die Wildtyptiere. Hinsichtlich der systolischen linksventrikulären Pumpfunktion wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen.

Bei der Gegenüberstellung der männlichen Genotypen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die männlichen Wildtyptiere hatten im Vergleich zu den Knockouttieren einen größeren endsystolischen linksventrikulären Durchmesser und zugleich eine signifikant schlechtere systolische linksventrikuläre Pumpfunktion. Dies spiegelte sich wiederum in einer geringeren Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion wieder. Dieselben Abweichungen wurden im Vergleich der transgenen Überexpressionsgruppe zur Knockoutgruppe ermittelt, dabei jedoch mit deutlich größeren linksventrikulären Durchmessern und einer deutlich schlechteren systolischen linksventrikulären Pumpfunktion der transgenen Überexpressionstiere.

Auch im Vergleich der männlichen Wildtypgruppe zu der männlichen transgenen Überexpressionsgruppe fiel eine schlechtere systolische linksventrikuläre Pumpfunktion mit größerem linksventrikulärem endsystolischem Durchmesser seitens der Überexpressionsgruppe auf.

Die soeben beschriebenen Ergebnisse sollen in den folgenden Grafiken der *Abbildung 10* noch einmal verdeutlicht werden.

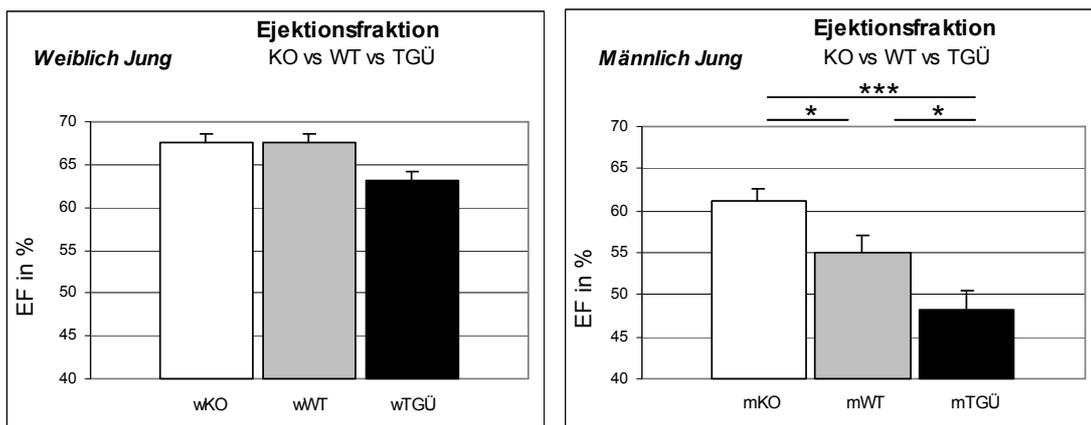


Abb. 10: Junge Tiere: Ejektionsfraktion des Linken Ventrikels im genotypischen Vergleich. Links: weibliche Tiere, Rechts: männliche Tiere

3.2.2 Geschwistertiere

Vergleich junger, männlicher transgener Überexpressionstiere mit Wildtyptieren

Um die deutlich eingeschränkte Ejektionsfraktion von 48 % der jungen, männlichen transgenen Überexpressionsgruppe zu sichern, wurde eine Vergleichsgruppe von fünf jungen, männlichen Wildtyp-Geschwistertieren echokardiographisch gegenüber gestellt. Die WT-Geschwistertiere waren dabei im Durchschnitt 5,6 Monate und somit etwa 1 Monat älter als die TGÜ-

Geschwistertiere. In der nachfolgenden *Tabelle* wurden die ermittelten Parameter des linken Ventrikels zusammengefasst.

Tab. 8: Geschwistertiere im Vergleich (genotypisch), Ergebnisse der linksventrikulären Parameter

<i>Gruppe</i>	<i>LVEDd</i> [in mm]	<i>LVPWd</i> [in mm]	<i>LVEDs</i> [in mm]	<i>LVPWs</i> [in mm]	<i>FS</i> [in %]	<i>EF</i> [in %]
mWT	4,45±0,10	0,59±0,02	3,16±0,12	0,84±0,02	29,40±1,20	63,20±1,77
versus	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
mTGÜ	4,67±0,10	0,56±0,02	3,70±0,09	0,72±0,01	20,80±1,06	48,3 ±2,20

In der folgenden *Abbildung* sollen die linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Durchmesser für die männlichen Geschwistertiere der Wildtypgruppe und der transgenen Überexpressionsgruppe dargestellt werden.

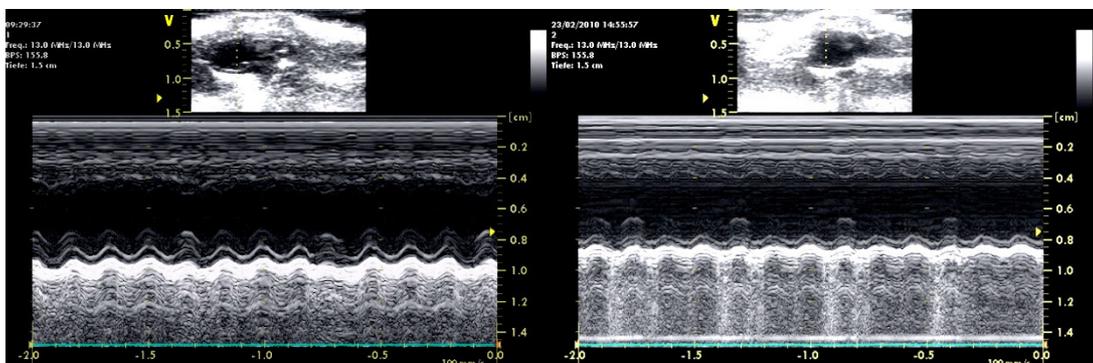


Abb. 11: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: Wildtyp Rechts: transgener Überexpressionstyp

Wie aus *Tabelle 8* ersichtlich, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den genotypisch-veränderten Geschwistertieren. Der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser war in der transgenen Überexpressionsgruppe signifikant größer. Die systolische linksventrikuläre Pumpfunktion mit den Parametern Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion waren hingegen in der Wildtypgruppe deutlich besser, was in der nachfolgenden *Abbildung 12* sichtbar zum Ausdruck kommt.

Somit konnten die signifikanten Veränderungen in der männlichen transgenen Überexpressionsgruppe im Vergleich zu der Knockout- und der Wildtypgruppe weiter gestärkt und gesichert werden.

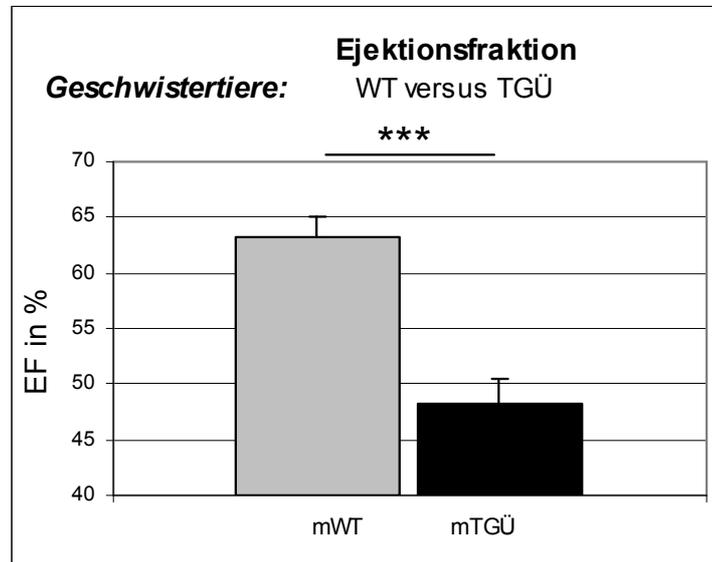


Abb. 12: Männliche Geschwistertiere: Ejektionsfraktion des Linken Ventrikels

3.2.3 Alte Tiere

Vergleich von geschlechtsspezifischen und genotypischen Unterschieden

Echokardiographisch untersucht wurden Tiere vom Wildtyp, vom Knockouttyp und vom transgenen Überexpressionstyp im Alter von 22 – 23 Monaten. In *Tabelle 9* soll in diesem Zusammenhang ein Überblick über Gewicht und Herzfrequenz der Alttiere gegeben werden.

Tab. 9: Übersicht über Gewicht und Herzfrequenz der Alttiere

<i>Gruppen</i>	<i>Gewicht [in g]</i>	<i>Herzfrequenz [in BPM]</i>
Weiblich_WT versus Männlich_WT	27,20 ± 1,01 p < 0,05	414 ± 17 p > 0,05
Weiblich_KO versus Männlich_KO	30,26 ± 1,23 p > 0,05	456 ± 10 p < 0,05
Weiblich_TGÜ versus Männlich_TGÜ	27,97 ± 0,34 p < 0,05	429 ± 14 p > 0,05
	30,41 ± 0,88*	445 ± 20

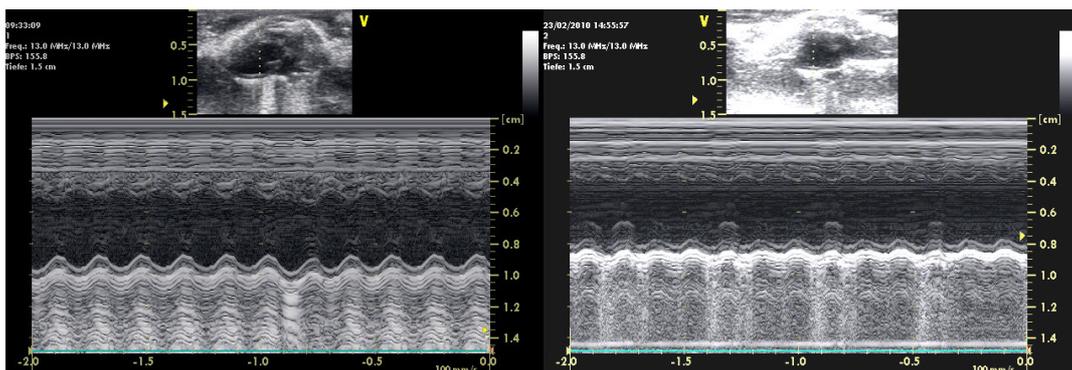
Geschlechtsspezifische Unterschiede

Um auch bei den alten Tieren herauszufinden, ob zwischen den weiblichen und männlichen Tieren Unterschiede bestehen, wurden weibliche Alttiere männlichen Alttieren aller drei Genotypen gegenübergestellt. Die gemessenen Werte des linken Ventrikels sind der *Tabelle 10* zu entnehmen.

Tab. 10: Alttiere im Vergleich (geschlechtsspezifisch), Ergebnisse der linksventrikulären Parameter

<i>Gruppen</i>	<i>LVEDd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVEDs</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWs</i> <i>[in mm]</i>	<i>FS</i> <i>[in %]</i>	<i>EF</i> <i>[in %]</i>
wWT	4,11 ±0,08	0,63±0,02	2,96 ±0,07	0,91 ±0,03	27,92±1,07	60,58 ±1,64
versus	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,001
mWT	4,81 ±0,05	0,65±0,04	3,79 ±0,06	0,86 ±0,03	21,20±0,73	49,40 ±1,29
wKO	3,92 ±0,08	0,62±0,05	2,77 ±0,09	0,90 ±0,07	29,55±1,26	63,09 ±1,86
versus	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05 (*)	p > 0,05 (*)
mKO	4,37 ±0,07	0,65±0,02	3,21 ±0,07	0,91 ±0,04	26,60±1,02	58,30 ±1,67
wTGÜ	4,44 ±0,05	0,62±0,05	3,31 ±0,09	0,87 ±0,06	25,71±1,09	56,86 ±1,91
versus	p < 0,01	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05
mTGÜ	5,19 ±0,20	0,64±0,03	4,15 ±0,25	0,81 ±0,04	20,44±2,04	47,22 ±3,76

Auf den folgenden Ultraschallbildern wurden die linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Durchmesser der alten weiblichen denen der männlichen Tiere gegenübergestellt.

**Abb. 13:** LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: männlich_Knockout Rechts: weiblich_Knockout

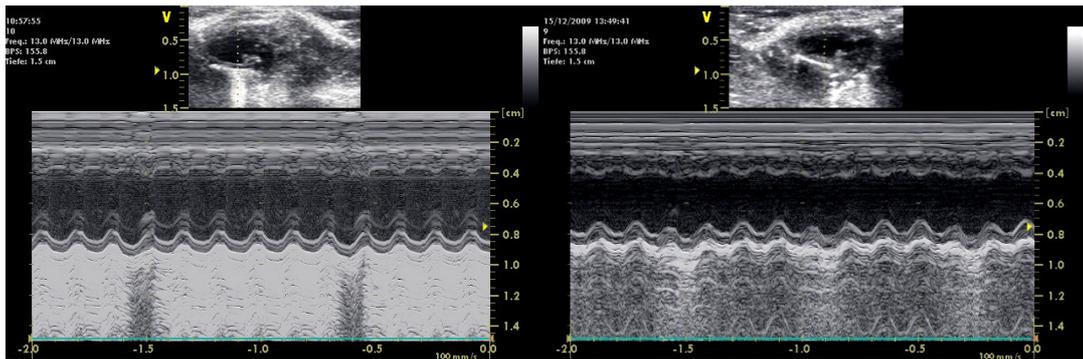


Abb. 14: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: männlich_Wildtyp Rechts: weiblich_Wildtyp

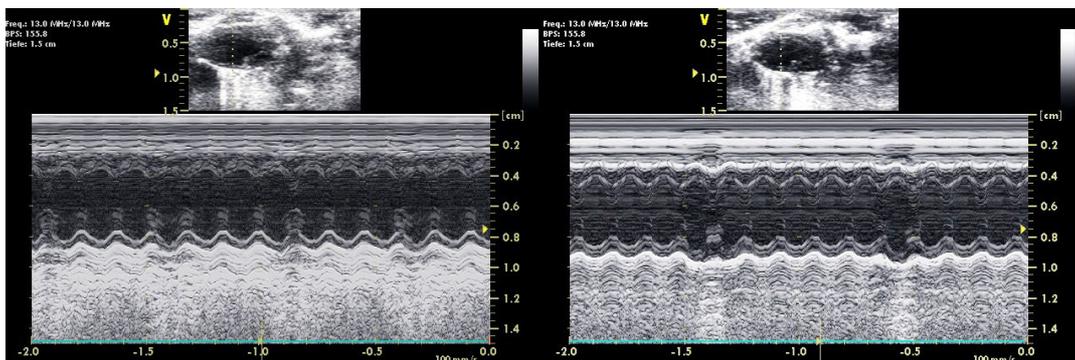


Abb. 15: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: männlich_transgener Überexpressionstyp Rechts: weiblich_transgener Überexpressionstyp

Wie in den Aufnahmen ersichtlich, zeigten sich bei allen Genotypen deutlich größere linksventrikuläre Durchmesser auf Seiten der männlichen Tiere im Vergleich zu den weiblichen Tieren. Eine signifikant bessere systolische linksventrikuläre Pumpfunktion wurde bei den weiblichen Tieren der Wildtypgruppe und der transgenen Überexpressionsgruppe festgestellt. Lediglich einen Trend zur Signifikanz bezugnehmend auf eine bessere systolische Pumpfunktion der weiblichen Tiere zeigte sich hingegen in der Knockoutgruppe.

In *Abbildung 16* werden besagte Unterschiede der systolischen Pumpfunktion, in Form der Ejektionsfraktion, deutlich.

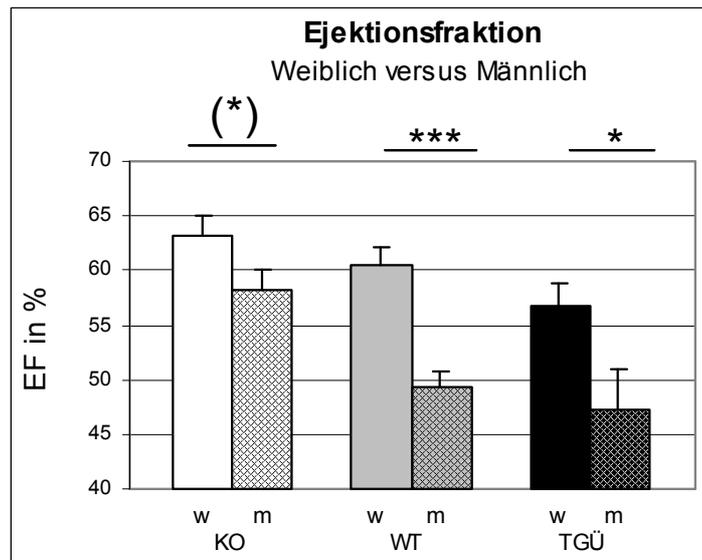


Abb. 16: Alte Tiere: Ejektionsfraktion des Linken Ventrikels im geschlechtsspezifischen Vergleich

Genotypische Unterschiede

Im Folgenden wird auf die genotypischen Unterschiede eingegangen. Es werden in diesem Zusammenhang die alten, weiblichen Tiere und die alten, männlichen Tiere hinsichtlich ihres Genotyps miteinander verglichen. Dabei werden jeweils die Wildtypgruppe der Knockoutgruppe, die Wildtypgruppe der transgenen Überexpressionsgruppe und die Knockoutgruppe der transgenen Überexpressionsgruppe gegenübergestellt. In der folgenden *Tabelle* sind die Daten der linksventrikulären Parameter dargestellt.

Tab. 11: Alttiere im Vergleich (genotypisch), Ergebnisse der linksventrikulären Parameter

<i>Gruppen</i>	<i>LVEDd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVEDs</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWs</i> <i>[in mm]</i>	<i>FS</i> <i>[in %]</i>	<i>EF</i> <i>[in %]</i>
wWT	4,11 ±0,08	0,63±0,02	2,96 ±0,07	0,91 ±0,03	27,92±1,07	60,58±1,64
versus	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
wKO	3,92 ±0,08	0,62±0,05	2,77 ±0,09	0,90 ±0,07	29,55±1,26	63,09±1,86
wWT	4,11 ±0,08	0,63±0,02	2,96 ±0,07	0,91 ±0,03	27,92±1,07	60,58±1,64
versus	p < 0,05	p > 0,05	p> 0,05 (*)	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
wTGÜ	4,44 ±0,05	0,62±0,05	3,31 ±0,09	0,87 ±0,06	25,71±1,09	56,86±1,91
wKO	3,92 ±0,08	0,62±0,05	2,77 ±0,09	0,90 ±0,07	29,55±1,26	63,09±1,86
versus	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,05
wTGÜ	4,44 ±0,05	0,62 ±0,0	3,31 ±0,09	0,87 ±0,06	25,71±1,09	56,86±1,91
mWT	4,81 ±0,05	0,65±0,04	3,79 ±0,06	0,86 ±0,03	21,20±0,73	49,40±1,29
versus	p < 0,01	p > 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,01	p < 0,01
mKO	4,37 ±0,07	0,65±0,02	3,21 ±0,07	0,91 ±0,04	26,60±1,02	58,30±1,67
mWT	4,81 ±0,05	0,65±0,04	3,79 ±0,06	0,86 ±0,03	21,20±0,73	49,40±1,29
versus	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
mTGÜ	5,19 ±0,20	0,64±0,03	4,15 ±0,25	0,81 ±0,04	20,44±2,04	47,22±3,76
mKO	4,37 ±0,07	0,65±0,02	3,21 ±0,07	0,91 ±0,04	26,60±1,02	58,30±1,67
versus	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05
mTGÜ	5,19 ±0,20	0,64±0,03	4,15 ±0,25	0,81 ±0,04	20,44±2,04	47,22±3,76

Die in *Tabelle 11* genannten Parameter zeigten in der weiblichen Gruppe, dass die transgenen Überexpressionstiere im Vergleich zu den Knockouttieren deutlich größere linksventrikuläre Durchmesser und eine schlechtere systolische linksventrikuläre Pumpfunktion hatten. Keine signifikanten Unterschiede gab es hingegen in den anderen Gruppen.

Bei den männlichen Tieren fielen ähnliche Veränderungen auf. Größere linksventrikuläre Durchmesser und eine schlechtere Pumpfunktion wurden hingegen im Vergleich zur Knockoutgruppe in der Überexpressionsgruppe und in der Wildtypgruppe deutlich.

Zwischen der Überexpressionsgruppe und der Wildtypgruppe waren keine signifikanten Veränderungen feststellbar. Die Ejektionsfraktion im genotypischen Vergleich ist in *Abbildung 17*, jeweils für die weiblichen und männlichen Tiere, graphisch getrennt dargestellt.

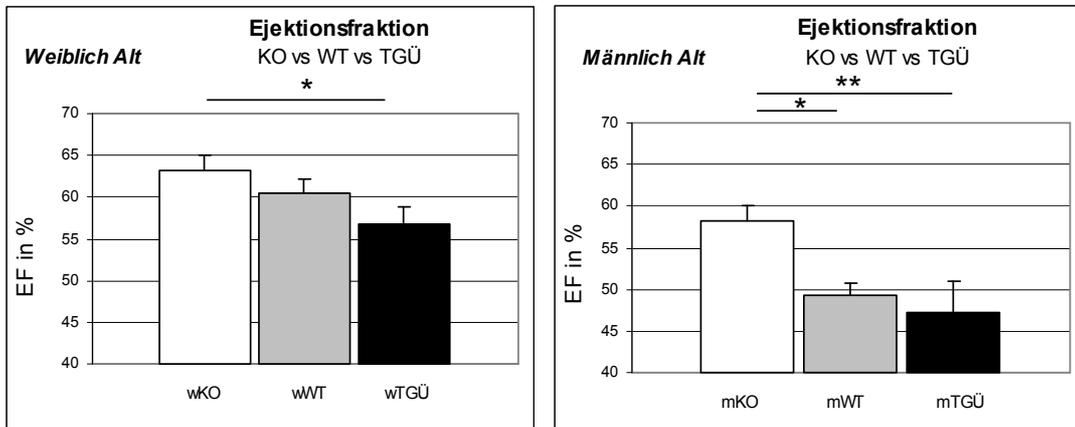


Abb. 17: Alte Tiere: Ejektionsfraktion des Linken Ventrikels im genotypischen Vergleich
Links: weibliche Tiere, Rechts: männliche Tiere

3.2.4 Alterungsprozess

Jung versus Alt

Um einen altersabhängigen Unterschied der linksventrikulären Durchmesser und der globalen systolischen linksventrikulären Pumpfunktion zu untersuchen, wurden alte Tiere mit jungen Tieren, in Abhängigkeit ihres Genotyps, miteinander verglichen.

Im Folgenden soll auf die genotypischen Unterschiede im Alterungsprozess eingegangen werden. Es wurden die jungen, weiblichen Tiere mit den alten, weiblichen Tieren und die jungen, männlichen Versuchstiere mit den alten, männlichen Tieren Bezug nehmend auf die verschiedenen Genotypen miteinander verglichen.

Untersucht und verglichen wurden jeweils fünfzehn junge, weibliche Tiere vom Wildtyp und Knockouttyp mit jeweils zwölf alten, weiblichen Tieren dieser Genotypen, zehn junge, weibliche transgene Überexpressionstiere mit acht alten, weiblichen TGÜ-Tieren.

Bei den männlichen Tieren wurden jeweils fünfzehn junge WT- und KO-Tiere, fünf alte WT-Tiere und zehn alte KO-Tiere gegenübergestellt. In der Gruppe der TGÜ-Tiere standen hingegen zehn Jungtiere neun Alttieren gegenüber. Das Gewicht und die Herzfrequenz der jungen und alten Tiere im Vergleich, werden in *Tabelle 12* genannt.

Tab. 12: Übersicht über Gewicht und Herzfrequenz der Gruppen Jung versus Alt

<i>Gruppen</i>	Gewicht [in g]	Herzfrequenz [in BpM]
w_jung_Wildtyp versus w_alt_Wildtyp	24,34 ± 0,67 p < 0,05	408,14 ± 17,20 p > 0,05 413,75 ± 17,22
w_jung_Knockout versus w_alt_Knockout	21,61 ± 0,60 p < 0,001	432,43 ± 15,69 p < 0,05 456,50 ± 9,60
w_jung_TGÜ versus w_alt_TGÜ	23,34 ± 0,37 p < 0,001	391,14 ± 20,74 p > 0,05 429,00 ± 14,15
m_jung_Wildtyp versus m_alt_Wildtyp	27,88 ± 0,88 p < 0,01	380,50 ± 10,69 p > 0,05 376,20 ± 13,26
m_jung_Knockout versus m_alt_Knockout	25,17 ± 0,66 p < 0,01	378,30 ± 8,55 p > 0,05 389,90 ± 16,24
m_jung_TGÜ versus m_alt_TGÜ	27,06 ± 0,87 p < 0,05	401,1 ± 8,79 p > 0,05 444,67 ± 20,41

In der nachfolgenden *Tabelle 13* werden die Ergebnisse der linksventrikulären Parameter im Vergleich Jung versus Alt angegeben.

Tab. 13: Jungtiere versus Alttiere im Vergleich (genotypisch), Ergebnisse der linksventrikulären Parameter

<i>Gruppen</i>	<i>LVEDd</i> [in mm]	<i>LVPWd</i> [in mm]	<i>LVEDs</i> [in mm]	<i>LVPWs</i> [in mm]	<i>FS</i> [in %]	<i>EF</i> [in %]
w_jung_WT versus w_alt_WT	4,10±0,06 p > 0,05	0,59±0,02 p > 0,05	2,77±0,05 p < 0,05	0,96±0,02 p > 0,05	32,60±0,65 p < 0,05	67,60±0,94 p < 0,05
w_jung_KO versus w_alt_KO	3,66±0,07 p < 0,05	0,59±0,02 p > 0,05	2,53±0,07 p > 0,05	0,81±0,04 p > 0,05	31,10±0,82 p > 0,05	67,60±0,95 p > 0,05
w_jung_TGÜ versus w_alt_TGÜ	4,25±0,06 p < 0,05	0,56±0,02 p > 0,05	3,00 ±0,5 p < 0,05	0,84±0,02 p > 0,05	29,40±0,67 p < 0,05	63,20±0,97 p < 0,05
m_jung_WT versus m_alt_WT	4,31±0,13 P < 0,001	0,58±0,03 p > 0,05	3,27±0,14 P < 0,001	0,78±0,03 p > 0,05	24,50±1,29 P < 0,01	54,90±2,18 P < 0,01
m_jung_KO versus m_alt_KO	4,01±0,12 p < 0,05	0,56±0,01 p < 0,01	2,88±0,09 p < 0,01	0,81±0,01 p > 0,05	28,20±0,95 p > 0,05 (*)	61,20±1,48 p > 0,05 (*)
m_jung_TGÜ versus m_alt_TGÜ	4,67±0,10 p < 0,05	0,56±0,02 p < 0,05	3,70±0,09 p > 0,05	0,72±0,01 p > 0,05	20,80±1,06 p > 0,05	48,30±2,20 p > 0,05

Die *Abbildungen 18 - 23* visualisieren den Vergleich der linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Durchmesser zwischen den weiblichen und männlichen Jung- und Alttieren aller Genotypen.

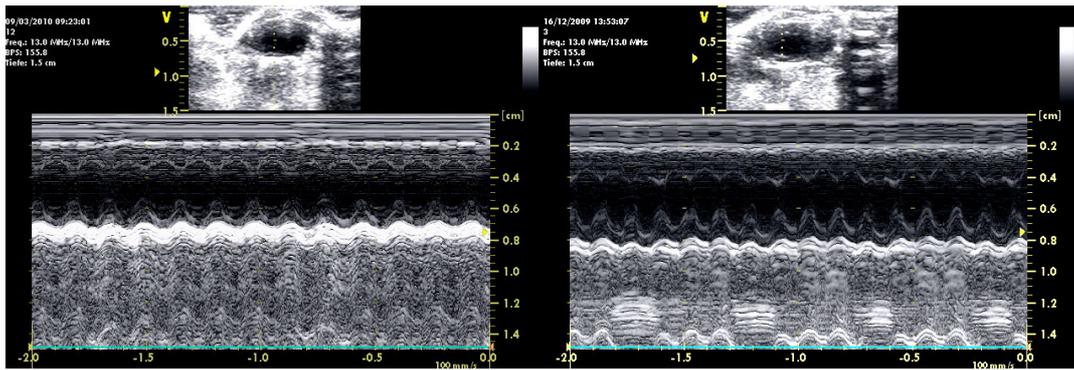


Abb. 18: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: weiblich_Knockout_Jung Rechts: weiblich_Knockout_Alt

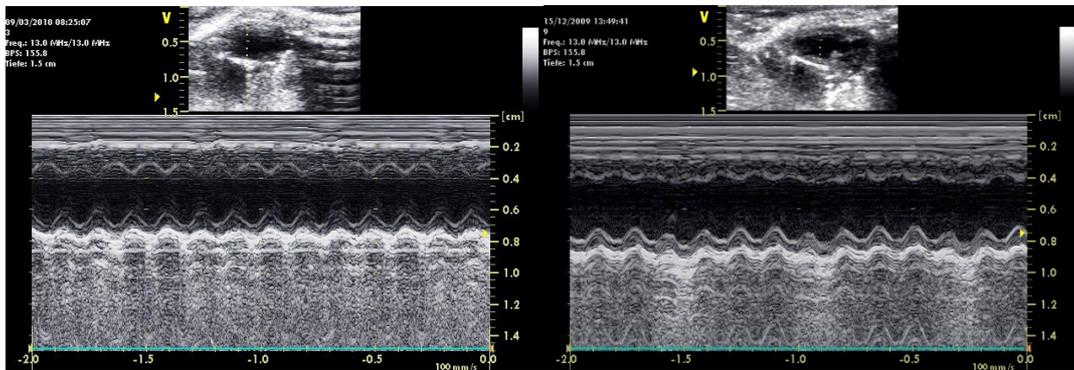


Abb. 19: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: weiblich_Wildtyp_Jung Rechts: weiblich_Wildtyp_Alt

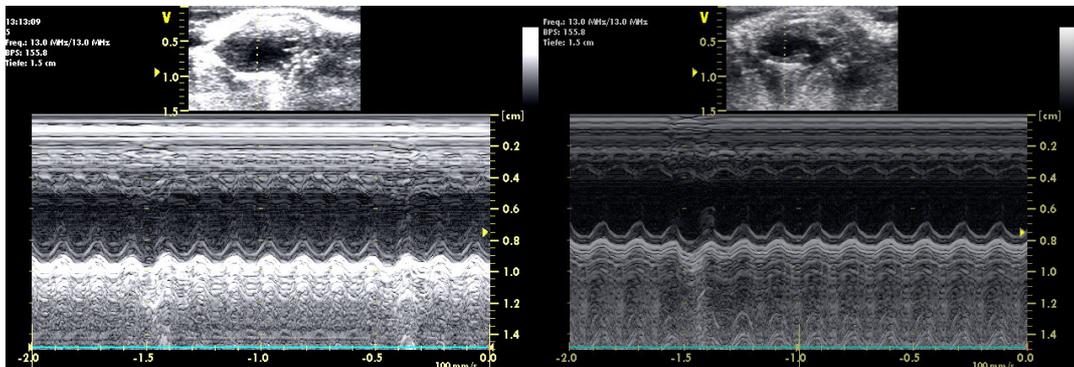


Abb. 20: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: weiblich_transgenerÜberexpressionstyp_Jung Rechts: weiblich_transgenerÜberexpressionstyp_Alt

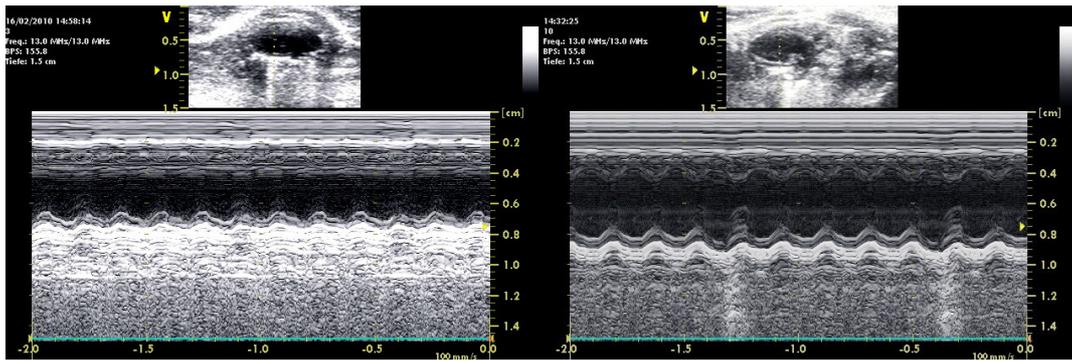


Abb. 21: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: männlich_Knockout_**Jung** Rechts: männlich_Knockout_**Alt**

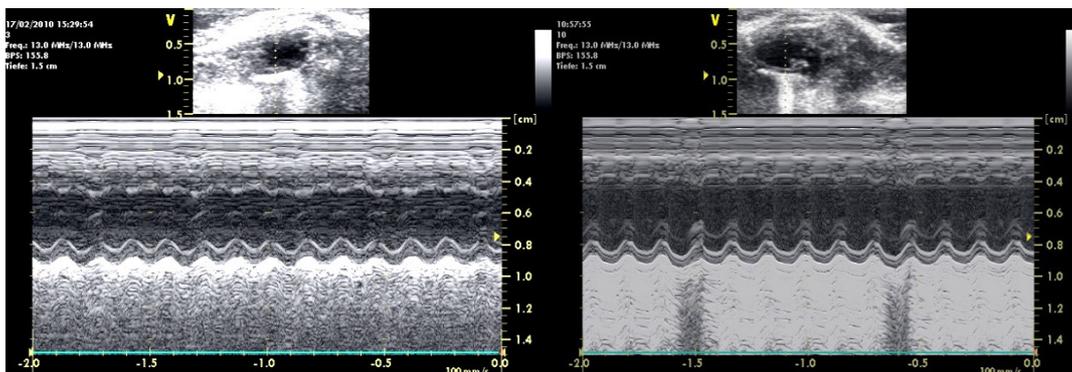


Abb. 22: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: männlich_Wildtyp_**Jung** Rechts: männlich_Wildtyp_**Alt**

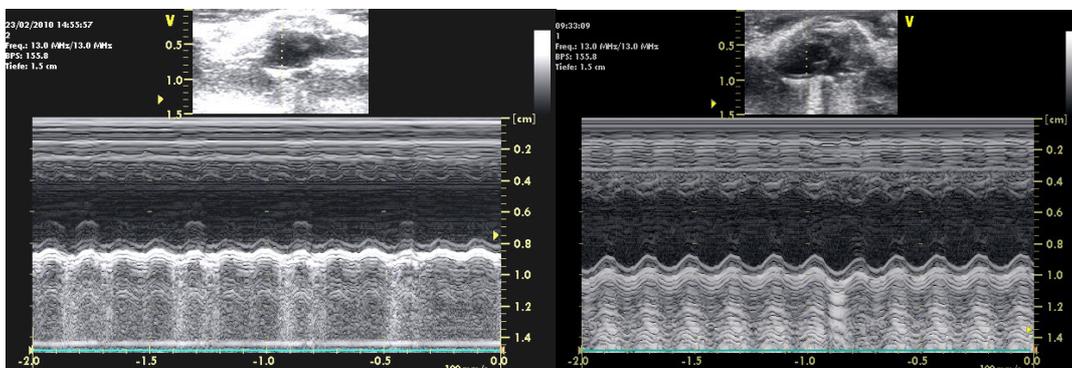


Abb. 23: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: männlich_transgener Überexpressionstyp_**Jung** Rechts: männlich_transgener Überexpressionstyp_**Alt**

Aus den Daten der *Tabelle 13* geht hervor, dass bei allen Genotypen der weiblichen Gruppe im Alter eine Zunahme der linksventrikulären Durchmesser feststellbar war. Die systolische linksventrikuläre Pumpfunktion, welche im Rahmen der Ejektions- und Verkürzungsfraktion gemessen wurde, nahm in der Wildtyp- und transgenen Überexpressionsgruppe signifikant ab. Kein diesbezüglicher Unterschied zeigte sich hingegen zwischen den jungen und alten Tieren der Knockoutgruppe.

Ähnliche altersabhängige Ergebnisse konnten bei allen drei Genotypen der männlichen Gruppe ermittelt werden. Im Alter zeigten sich dabei deutlich größere linksventrikuläre Durchmesser, am deutlichsten in der Überexpressionsgruppe. In der Wildtypgruppe hingegen nahm die systolische linksventrikuläre Pumpfunktion im Alter ab. In der Knockout- und transgenen Überexpressionsgruppe wurden jedoch keine altersabhängigen Unterschiede deutlich. In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, dass bei den jungen Tieren in der Überexpressionsgruppe die systolische Pumpfunktion mit ca. 48 % schon deutlich schlechter war. Im Alter mit 47 % darüber hinaus auch wesentlich schlechter gegenüber den anderen Genotypen.

Die soeben beschriebenen Unterschiede hinsichtlich der Ejektionsfraktion können in *Abbildung 24* noch einmal graphisch verdeutlicht werden.

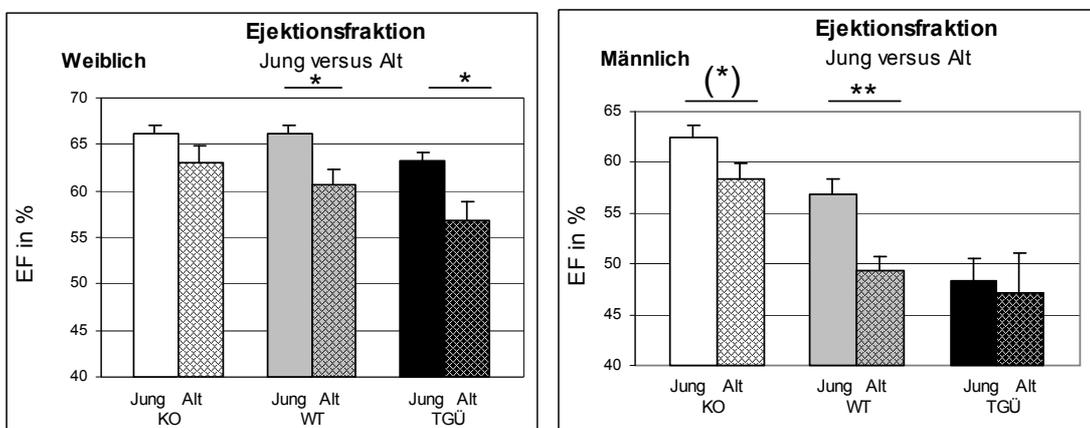


Abb. 24: Jung versus Alt: Ejektionsfraktion des Linken Ventrikels im genotypischen Vergleich Links: weibliche Tiere, Rechts: männliche Tiere

3.2.5 Physische Aktivität: Freiwillige Laufradbelastung

Vergleich alter, männlicher Wildtypiere mit alten, männlichen, transgenen Überexpressionstieren

Um zu untersuchen, ob physische Aktivität im Alter, abhängig von der RAGE-Verteilung am Herzen, einen positiven oder negativen Effekt auf die Herzfunktion hat, wurden alte, männliche Wildtypiere mit einer normalen kardialen RAGE-Verteilung mit alten, männlichen transgenen Überexpressionstieren mit einer hohen kardialen RAGE-Verteilung, verglichen.

Untersucht wurden sechs alte, männliche Wildtypiere und sieben alte, männliche transgene Überexpressionstiere. Beide Gruppen unterzogen sich in diesem Kontext einer Laufradbelastung. Jedes einzelne Tier hatte einen Käfig mit einem Laufrad, in dem es freiwillig

laufen konnte. Die Tiere liefen zumeist nachts und schliefen tagsüber. Die jeweils absolvierten Laufradstrecken- und Geschwindigkeiten sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt und umfassen einen Zeitraum von 4 Wochen bis zur Echokardiographie-Untersuchung. Beide Versuchsgruppen waren durchschnittlich 23 Monate alt. Aus *Tabelle 14* gehen das Gewicht und die Herzfrequenz der Laufradgruppe hervor.

Tab. 14: Übersicht über Gewicht und Herzfrequenz der Laufradgruppe

<i>Gruppe</i>	<i>Gewicht [in g]</i>	<i>Herzfrequenz [in BPM]</i>
WT_Laufrad	35,47 ± 1,61	412 ± 6
versus	p > 0,05	p > 0,05
TGÜ_Laufrad	33,77 ± 0,72	449 ± 21

Laufradstrecke- und Geschwindigkeit

Tabelle 15 gibt darüber hinaus die Laufradgeschwindigkeiten und Strecken an, die von den einzelnen Tieren absolviert wurden.

Tab. 15: Laufradgeschwindigkeiten und Strecken, Vergleich der Wildtypgruppe (Mx_WT_Laufrad) mit der transgenen Überexpressionsgruppe (Mx_TGÜ_Laufrad)

<i>Mausbezeichnung</i>	<i>Geschwindigkeit [in m/min]</i>	<i>Strecke [in m]</i>
M14_WT_Laufrad	10,67 ± 0,19	1404,87 ± 35,85
M6_WT_Laufrad	12,52 ± 0,56	2235,23 ± 107,44
M8_WT_Laufrad	8,38 ± 0,54	1163,04 ± 78,57
M2_WT_Laufrad	9,94 ± 0,51	1329,00 ± 68,07
M9_WT_Laufrad	1,00 ± 0,06	203,31 ± 24,73
M11_WT_Laufrad	2,42 ± 0,23	689,87 ± 64,77
Mittelwert	7,48 ± 0,34	1170,88 ± 63,23

<i>Mausbezeichnung</i>	<i>Geschwindigkeit [in m/min]</i>	<i>Strecke [in m]</i>
M5L_TGÜ_Laufrad	9,81 ± 0,32	1331,61 ± 60,83
M5R_TGÜ_Laufrad	10,44 ± 0,65	1191,16 ± 91,89
M3_TGÜ_Laufrad	11,13 ± 0,29	1813,66 ± 60,71
M1_TGÜ_Laufrad	3,38 ± 0,23	500,53 ± 30,22
M10_TGÜ_Laufrad	6,37 ± 0,68	964,92 ± 102,30
M7_TGÜ_Laufrad	11,43 ± 0,27	1749,29 ± 48,75
M12_TGÜ_Laufrad	8,02 ± 0,95	707,25 ± 103,27
Mittelwert	8,65 ± 0,27	1179,77 ± 71,13

Wie aus *Tabelle 15* ersichtlich, ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der durchschnittlichen Laufradgeschwindigkeit. Die transgene Gruppe lief im Durchschnitt etwas schneller als die Wildtypgruppe.

In der nachfolgenden *Tabelle* werden die Messwerte der linksventrikulären Parameter für die Laufradgruppe angegeben.

Tab. 16: Laufradgruppe, Ergebnisse der linksventrikulären Parameter

<i>Gruppe</i>	<i>LVEDd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVEDs</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWs</i> <i>[in mm]</i>	<i>FS</i> <i>[in %]</i>	<i>EF</i> <i>[in %]</i>
mWT	4,70 ± 0,11	0,70 ± 0,02	3,77 ± 0,11	0,94 ± 0,05	20,50 ± 1,14	46,83 ± 1,85
versus	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
mTGÜ	4,98 ± 0,11	0,65 ± 0,03	4,07 ± 0,05	0,81 ± 0,03	18,00 ± 0,08	43,00 ± 2,08

In der folgenden *Abbildung 25* wurden zur Verdeutlichung des Sachverhalts die linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Durchmesser veranschaulicht.

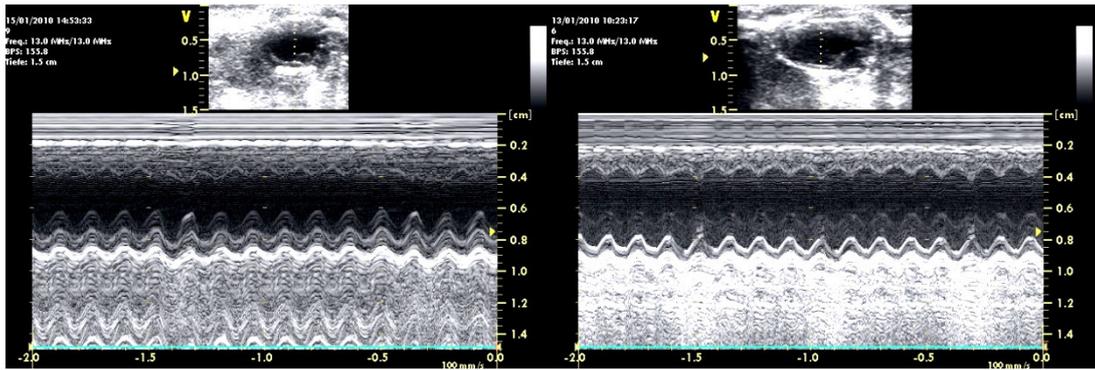


Abb. 25: LV-M-Mode, Linksventrikulärer Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser, parasternale lange Achse, Links: Wildtyp, Rechts: transgener Überexpressionstyp

Aus den Messdaten der *Tabelle 16* gehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Genotypen hinsichtlich der linksventrikulären Durchmesser und der globalen systolischen Pumpfunktion hervor.

In der nachfolgenden Grafik zeigt sich lediglich ein Trend zur Signifikanz bezüglich der Ejektionsfraktion, welche bei den transgenen Tieren etwas schlechter war als bei den Wildtyptieren.

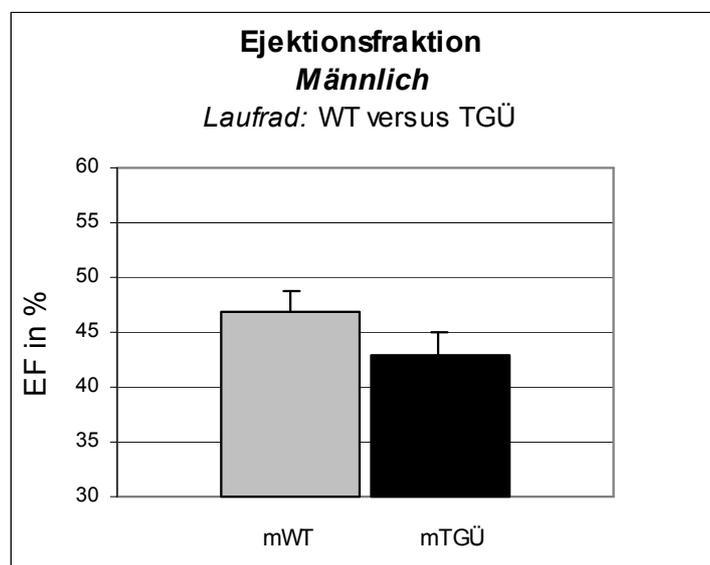


Abb. 26: Laufradbelastung: Ejektionsfraktion des linken Ventrikels

Nachfolgend wurden, um einen positiven oder negativen Effekt der Aktivität aufzuzeigen, die männlichen Wildtyp- und transgenen Überexpressionstiere der Laufradgruppe mit den gleichalt-

rigen, männlichen WT- und TGÜ-Tieren in Ruhe verglichen. Die Ergebnisse des linken Ventrikels der Laufradgruppe im Vergleich zur Ruhegruppe sind in *Tabelle 17* aufgeführt.

Tab. 17: Laufradgruppe versus Ruhegruppe, Ergebnisse der linksventrikulären Parameter

<i>Gruppen</i>	<i>LVEDd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWd</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVEDs</i> <i>[in mm]</i>	<i>LVPWs</i> <i>[in mm]</i>	<i>FS</i> <i>[in %]</i>	<i>EF</i> <i>[in %]</i>
WT_Sport	4,70 ±0,11	0,70 ±0,02	3,77 ±0,11	0,94 ±0,05	20,50 ±1,14	46,83 ±1,85
versus	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
WT_Ruhe	4,81 ±0,05	0,65 ±0,04	3,79 ±0,06	0,86 ±0,03	21,20 ±0,73	49,40 ±1,29
TGÜ_Sport	4,98 ±0,11	0,65 ±0,03	4,07 ±0,05	0,81 ±0,03	18,00 ±0,08	43,00 ±2,08
versus	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
TGÜ_Ruhe	5,19 ±0,20	0,64 ±0,03	4,15 ±0,25	0,81 ±0,04	20,44 ±2,04	47,22 ±3,76

In *Tabelle 17* zeigten sich sowohl bei den Wildtypen als auch bei den RAGE-überexprimierten Tieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der linksventrikulären Parameter zwischen der aktiven und der ruhenden Gruppe.

4 Diskussion

Herzerkrankungen, wie Koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz, bestimmen heutzutage einen Großteil der chronischen Erkrankungen in unserer Gesellschaft. Viele kardiale Risikofaktoren, wie z.B. Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II, Hypercholesterinämie, Rauchen, Stress usw. sind bekannt und können durch verschiedene Behandlungsmöglichkeiten therapeutisch beeinflusst werden.

Es wird angenommen, dass es beim „Physiologischen Altern“ u.a. zu einer endothelialen Dysfunktion und Arterienwandversteifung kommt. Daraus resultiert insgesamt ein höheres Risiko für Arteriosklerose, Hypertonie und auch Apoplex. Die im Alter zunehmende Verdickung der Intima korreliert mit der Arterienalterung und stellt einen Kofaktor für die Koronare Herzkrankheit dar, im Sinne eines steigenden Risikos für Arteriosklerose im Alter (LAKATTA UND LEVY, 2003).

Advanced Glycation End Products (AGEs) sind fortgeschrittene Glykierungsendprodukte, welche im Alter und bei andauernden hyperglykämischen Stoffwechsellagen akkumulieren. Der Rezeptor für AGEs (RAGE) scheint einen entscheidenden Faktor bei der Vermittlung von AGE-Effekten am Herzen darzustellen. Jedoch gibt es kaum Informationen über die Auswirkungen der RAGE-Expression am alternden Herzen und im geschlechtsspezifischen Vergleich.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung einer differentiellen Expression des Rezeptors für AGEs am Herzen von Wildtypmäusen (WT = wenig/normale kardiale RAGE-Expression), Knockoutmäusen (KO = keine kardiale RAGE-Expression) und transgenen Überexpressionsmäusen (TGÜ = hohe kardiale RAGE-Expression) im Hinblick auf funktionelle kardiale Veränderungen, insbesondere in Bezug auf die globale systolische linksventrikuläre Pumpfunktion, zu untersuchen.

Die Vergleichsobjekte wurden hinsichtlich ihres Alters, den geschlechtsspezifischen bzw. genotypischen Unterschieden und ihrer sportlichen Aktivität (freiwillige Laufradbelastung) eingeteilt und untersucht.

Allgemeine altersabhängige Veränderungen

In der Rotterdam Studie fand man heraus, dass u.a. im Alter die Inzidenz und Prävalenz für ischämische Herzinsuffizienz bei Frauen und Männer zunimmt (BLEUMINK et al., 2004; HOFMAN et al., 1991). Dieser Aspekt lässt vermuten, dass Alterungsmechanismen für Herz-

kreislaufkrankungen eine besonders wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden sowohl eine junge als auch eine alte Versuchsgruppe zusammengestellt, um mögliche altersbedingte funktionelle kardiale Veränderungen durch die Echokardiographie darzustellen.

Wir konnten tatsächlich altersbedingte kardiale Veränderungen aufzeigen. In Bezug auf die linksventrikulären Durchmesser wurde gezeigt, dass es im Alter zu einer Zunahme der linksventrikulären Durchmesser kommen kann. Des Weiteren war eine Abnahme der systolischen Herzpumpleistung im Rahmen der Bestimmung der Ejektionsfraktion bei den alten Tieren nachweisbar. Dies dokumentierte auch LAKATTA UND LEVY (2003) mit der Aussage, dass es im Alter zu Gen-Expressions-Veränderungen kommt, welche die intrazellulären Kalzium-Verhältnisse regulieren. Durch erhöhte ROS im Alter kommt es zur Verminderung der Reizschwelle für die zelluläre Kalzium-Überladung und somit zur Abnahme der systolischen und diastolischen linksventrikulären Funktion. Außerdem haben wir im Alter gesehen, dass wie allgemein beschrieben auch in den hier untersuchten Mäusen das Gewicht zunimmt.

Allgemeine geschlechtsabhängige Veränderungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben männlichen Tieren auch weibliche Tiere untersucht. In der Literatur werden in diesen Zusammenhang zumeist Daten von männlichen Tiermodellen beschrieben. CLELAND et al. (2003) verdeutlichte, dass bei Männern hauptsächlich die systolische Herzinsuffizienz im Vordergrund steht, bei Frauen jedoch die diastolische Herzinsuffizienz überwiegt. Solche geschlechtsspezifischen Unterschiede sind besonders in ihrer Symptomatik und dem Krankheitsmechanismus von Herzerkrankungen weder verstanden noch annähernd genügend untersucht (REGITZ-ZAGROSEK, 2009).

Wir haben in Übereinstimmung mit CLELAND et al. gesehen, dass die Ejektionsfraktion bei den weiblichen Tieren signifikant besser war als bei den männlichen Tieren. Auch die linksventrikulären Durchmesser waren signifikant kleiner bei den weiblichen Mäusen.

Es gibt noch keine Leitlinien für die Diagnostik und Therapie der diastolischen Herzinsuffizienz (REGITZ-ZAGROSEK, 2009). Es ist jedoch bekannt, dass Frauen vor der Menopause eine bessere Prognose in Bezug auf Hypertonie, Aortenklappenstenose, Myokardinfarkt und hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) im Vergleich zu Männern haben (VILLAR et al., 2009; DIMITROW et al., 2003; VILLARI et al., 1995). Leiden Frauen allerdings an den oben genannten Erkrankungen, behalten sie eine ausreichende systolische Herzfunktion bei, wohingegen Männer typischerweise einen dilatierten linken Ventrikel und eine linksventrikuläre Wandverdickung aufzeigen, was beides häufig für eine schlechtere Kontraktion des linken Ventrikels und somit für eine systolische Dysfunktion spricht (DOUGLAS et al., 1998; DE MARIA et al., 1993). Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die weiblichen Tiere eine bessere globale

systolische Pumpfunktion mit kleineren linksventrikulären Durchmessern aufweisen. Umso wichtiger ist es, nach funktionellen kardialen Unterschieden im Rahmen der globalen systolischen Pumpfunktion oder auch der diastolischen Relaxationsstörung in Bezug auf geschlechtsspezifische Besonderheiten zu untersuchen.

Allgemeine genotypabhängige Veränderungen

Dass der Rezeptor für Advanced Glycation End Products eine wichtige Rolle beim Altern und bei chronischen kardiovaskulären Erkrankungen spielt, wurde bereits in Studien nachgewiesen, wie im nachfolgenden beispielhaft beschrieben. Ein Ischämie-Reperfusion-Tiermodell am Mäuseherz zeigt, dass in Antwort auf eine kardiale Ischämie mit nachfolgender Reperfusion, die RAGE-Expression und die AGE-Produktion ansteigen (YAN et al., 2010). Homozygote Mäuse ohne kardialen RAGE zeigten im Vergleich zu Tieren vom Wildtyp nach kardialer Ischämie mit Reperfusion eine niedrigere Konzentration an Laktatdehydrogenase (LDH), einen erhöhten linksventrikulären Druck und einen höheren Adenosintriphosphat-Level (ATP-Level) am Herzen (BUCCIARELLI et al., 2006). Dies lässt vermuten, dass der Rezeptor für AGEs eine ausschlaggebende Bedeutung bei pathophysiologischen Vorgängen am Herzen hat.

Es waren in diesem Zusammenhang signifikante Veränderungen zwischen den drei Genotypen feststellbar. Allgemein konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einer hohen RAGE-Expression größere linksventrikuläre Durchmesser und eine deutlich schlechtere globale systolische Pumpfunktion hatten, als Tiere ohne bzw. mit einer geringeren kardialen RAGE-Expression.

Allgemeine aktivitätsabhängige Veränderungen

Da die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuten, dass die kardiale Überexpression von RAGE einen negativen Einfluss auf die Herzpumpleistung hat, war es interessant zu überprüfen, ob physische Aktivität im Alter die reduzierte Herzleistung zumindest teilweise wieder kompensiert. Aus diesem Grund wurden alte, männliche Tiere vom Wildtyp und vom transgenen Überexpressionstyp einer freiwilligen Laufradbelastung unterzogen und mit entsprechenden alten männlichen Tieren in Ruhe verglichen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die globale systolische Herzfunktion und die linksventrikulären Durchmesser feststellbar.

Es ist somit anzunehmen, dass alte Tiere unabhängig von ihrem Genotyp, durch ihre bestehenden Veränderungen im Sinne einer kardialen Alterskrankheit, keinen Benefiz im Hinblick auf eine Verbesserung der Herzleistung durch eine körperliche Aktivität erzielen können. Wenn die Veränderungen im Rahmen des Alterungsprozesses fortgeschritten sind, scheint sich eine präventive Maßnahme nicht mehr positiv auf die Herzleistung auszuwirken.

Im folgenden Teil wird nun auf die einzelnen Subgruppen in Abhängigkeit vom Alter, Geschlecht, Genotyp und körperliche Aktivität eingegangen.

4.1 Globale systolische Herzfunktion in Abhängigkeit von der kardialen RAGE-Expression zwischen jungen und alten Mäusen *Junge Tiere (4-5Monate) versus Alte Tiere (22-23Monate)*

In der weiblichen und männlichen Knockoutgruppe zeigte sich, dass das Gewicht im Alter signifikant zunahm, während eine Zunahme der linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Durchmesser vor allem bei den männlichen, alten Tieren zu verzeichnen war. Dagegen wurden keine altersabhängigen Unterschiede in der globalen Herzpumpleistung deutlich. Die Knockouttiere produzierten kein kardiales RAGE, so dass die Zunahme der linksventrikulären Durchmesser bei erhaltener systolischer Pumpfunktion bei den männlichen alten Tieren durch kardiales Altern erklärt werden könnte. Dieses ist häufig mit einer linksventrikulären Hypertrophie und Fibrose assoziiert, was wiederum zu einer diastolischen Dysfunktion mit erhaltender systolischer Funktion führen kann (KITZMANN et al., 2001; LAKATTA und LEVY, 2003).

In der weiblichen und männlichen Wildtypgruppe zeigten sich im Bezug auf das Gewicht und die linksventrikulären Durchmesser ähnliche Ergebnisse wie in der Knockoutgruppe. Jedoch ergaben sich bei den weiblichen und männlichen Tieren zusätzlich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Herzpumpleistung zwischen den jungen und den alten Tieren. Die Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion nahmen im Alter deutlich ab. In der transgenen RAGE-Überexpressionsgruppe fielen im Vergleich zu den Jungtieren deutlich größere linksventrikuläre Durchmesser im Alter auf und zusätzlich bei den weiblichen, alten Tieren eine deutlich schlechtere Herzpumpleistung. Da die männlichen Jungtiere mit 48% schon eine sichtlich eingeschränkte Herzfunktion zeigten und im Alter die Herzpumpleistung bei 47% lag, konnten hier keine altersabhängigen Veränderungen festgestellt werden. Das weist darauf hin, dass die kardiale Überexpression von RAGE einen wichtigeren Einfluss als das Alter auf kardiale funktionelle Veränderungen, wie zum Beispiel auf die globale linksventrikuläre Pumpfunktion, hat.

Die Abnahme der Herzpumpleistung und die vergrößerten linksventrikulären Durchmesser im Alter bei den Tieren mit einer RAGE-Expression (WT und TGÜ) könnten auf die AGE-RAGE-Interaktion und deren daraus resultierenden Effekte zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass AGEs im alternden Herzen akkumulieren (SCHLEICHER et al., 1997) und dass diese wiederum RAGE induzieren (SUN et al., 1998; BIERHAUS et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die

Myozyten männlicher Mäuse mit hoher kardialer RAGE-Expression niedrigere systolische und diastolische intrazelluläre Kalziumkonzentrationen aufwiesen (PETROVA et al., 2002), was für eine Einschränkung der systolischen und diastolischen Herzfunktion sprechen könnte, was wiederum auf vorzeitiges Altern durch hohe kardiale RAGE-Expression hindeutet. Effekte der AGE-RAGE-Interaktion sind außerdem unter anderem die Induktion von oxidativem Stress (SIMM et al., 2004) und Apoptose (NAWROTH und ZIEGLER, 2001), welche eine Gewebeveränderung des Myokards induzieren könnte. Die durch AGE-RAGE-Interaktion induzierte Apoptose, der programmierte Zelltod, ist für den Verlust von Kardiomyozyten verantwortlich (HERBST und HÜBNER, 2000), welches eine Erklärung für die abnehmende Herzpumpleistung sein könnte. Des Weiteren kann ein verstärktes Remodeling mit einer eventuell folgenden kardialen Fibrose durch Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteinasen in Fibroblasten ausgelöst werden (DAOUD et al., 2001). Die kardiale Fibrose führt zum Verlust von kontraktilem Gewebe (HERBST und HÜBNER, 2000), was wiederum mit einer eingeschränkten globalen systolischen Pumpfunktion einhergehen kann. All diese Effekte könnten sich negativ auf die Herzpumpleistung auswirken und somit die gefundenen kardialen funktionellen Veränderungen bei den Tieren mit RAGE-Expression erklären. Jedoch könnten diese gemessenen Veränderungen möglicherweise auch auf altersbedingtes strukturelles und funktionelles Remodeling am Herzen zurückzuführen sein, welches zu einer gestörten systolischen Herzfunktion führen kann (CHENG et al., 2009 und 2010; THOMAS und RICH, 2007). Beim physiologischen kardialen Altern kommt es zur einfachen interstitiellen und perivaskulären Fibrose (KAJSTURA et al., 2010). Man vermutet, dass Altern mit fibrotischen kardialen Remodeling einhergeht (CHEN und FRANGOIANNIS, 2010), denn Herzen von alternden Patienten wiesen im Rahmen von Untersuchungen eine erhöhte Kollagenablagerung auf und zeigten vermehrt dickere endomysiale und perimysiale Kollagenfasern (DE SOUZA, 2002; GAZOTI DEBESSA et al., 2001). Ferner ist die Quervernetzung von Kollagen nachweislich in alternden Herzen erhöht (THOMAS et al., 2000), was zur Gewebsversteifung am Herzen führt und somit eine mögliche Erklärung für die gemessenen Werte sein könnte.

Da die Knockouttiere im Alter eine bessere Herzfunktion aufweisen als die Wildtypiere bzw. die transgenen Überexpressionstiere, erscheint es, dass die AGE-RAGE-Interaktion mit deren oben genannten Effekten im Alter einen Einfluss auf die Herzpumpleistung hat.

4.2 Globale systolische Herzfunktion in Abhängigkeit von der kardialen RAGE-Expression im Bezug auf das Geschlecht

Weiblich versus Männlich

4.2.1 Junge Tiere im geschlechtsspezifischen Vergleich

Bei allen drei Genotypen konnte eine signifikant bessere globale systolische Pumpfunktion des Herzens bei den weiblichen Tieren im Vergleich zu den männlichen Vergleichsgruppen ermittelt werden. Alle drei weiblichen Genotypen zeigten einen geringeren linksventrikulären end-systolischen Durchmesser und in der Knockoutgruppe ferner einen geringeren linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser. Die geringeren linksventrikulären Durchmesser bei weiblichen im Vergleich zu gleichaltrigen, männlichen Mäusen stehen in Übereinstimmung mit anderen Studien (BAUMANN et al., 2008). Im Rahmen einer Kardio-MRT-Studie wurden in diesem Kontext im humanen System gesunde im Mittel 57-jährige weibliche und männliche Probanden untersucht und es zeigte sich, dass die männlichen Probanden auch nach Anpassung an Körpergröße und Körperoberfläche größere volumetrische Durchmesser als die weiblichen Probandinnen hatten (CAIN et al., 2009; SALTON et al., 2002).

4.2.2 Alte Tiere im geschlechtsspezifischen Vergleich

Auch bei den alten Tieren zeigten sich ähnliche Ergebnisse bei der Gegenüberstellung der Geschlechter. Bei den Tieren mit einer RAGE-Expression, d.h. bei den Wildtyp-Tieren und den Überexpressionstieren, hatten die männlichen Tiere ein signifikant höheres Gewicht, größere linksventrikuläre Durchmesser und eine deutlich schlechtere globale systolische Pumpfunktion im Vergleich zu den weiblichen Tieren. Bei den Knockoutmäusen zeigten sich hingegen nur größere linksventrikuläre Durchmesser der männlichen Tiere und ein Trend zur Signifikanz bei Gewicht und Ejektionsfraktion im Vergleich zu den weiblichen Tieren.

So scheint im geschlechtsspezifischen Vergleich, zusammengefasst für junge und alte Tiere, dass die männlichen Tiere größere linksventrikuläre Durchmesser haben und das außerdem bei den männlichen Genotypen mit RAGE-Expression (WT und TGÜ) eine schlechtere globale systolische Herzpumpfunktion feststellbar ist. CHENG et al. (2010), berichtete im Rahmen der Framingham Studie von einer besseren Verkürzungsfraktion, im Sinne einer besseren linksventrikulären Kontraktion, für Frauen im Vergleich zu Männern. KONHILAS (2010), publizierte ferner über eine erhaltene systolische Pumpfunktion bei älteren Frauen mit einer ischämischen

Herzinsuffizienz. GRANDI et al. (1992) beschrieb darüber hinaus eine reduzierte systolische Herzfunktion am alternden männlichen Herz, jedoch nicht beim weiblichen alternden Herz.

Diese Ergebnisse hinsichtlich einer besseren systolischen Herzpumpfunktion beim weiblichen Geschlecht könnten möglicherweise durch einen Unterschied im Kalzium-Haushalt erklärt werden. CHU et al. (2005), hatten in linken Ventrikeln weiblicher Rattenherzen eine signifikant höhere Konzentration an spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanälen, an Ryanodin-Rezeptoren (verantwortlich für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum) und an $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern (verantwortlich für die Ca^{2+} -Entfernung aus der Zelle) im Vergleich zu männlichen Rattenherzen festgestellt, mit geringen Unterschieden in der kardialen Kontraktion.

Ein anderer Ansatzpunkt wäre, dass in allen Altersstufen das weibliche Herz eine größere Anzahl an kardialen Stammzellen und jüngeren Myozyten als das männliche Herz aufweist (KAJSTURA et al., 2010). Des Weiteren wurde in Tiermodellen gezeigt, dass IGF-1 in kardialen Stammzellen bei alten Tieren exprimiert wird (GONZALEZ et al., 2008) und dass eine Überexpression von IGF-1 am Herzen vor Herzerkrankungen (TORELLA et al., 2007) und dem alternen kardialen Phänotyp schützt (KAJSTURA et al., 2010). Dieser insulinähnliche Wachstumsfaktor ist in weiblichen Myozyten erhöht (LERI et al., 2000), was vielleicht das bessere kardiale Outcome im alternden weiblichen Geschlecht im Vergleich zu dem männlichen Geschlecht mit bestimmt (KAJSTURA et al., 2010).

Eine weitere Erklärung könnte der ungleiche Hormonstoffwechsel in Bezug auf Steroidhormone wie zum Beispiel Östrogen, zwischen Männern und Frauen sein. Östrogenrezeptoren wurden in kardialen Fibroblasten und kardialen Myozyten beim Menschen und Nagetieren nachgewiesen (NORDMEYER et al., 2004; MENDELSON und KARAS, 1999; GROHE et al., 1998). Östrogenrezeptoren am Herzen scheinen mit der Hemmung von Apoptose (PATTEN et al., 2004), mit der Exprimierung von antihypertrophen Proteinen (BABIKER et al., 2004) und der Kontrolle von Zell-Zell-Interaktionen in Verbindung zu stehen (GROTEN et al., 2005). Die Funktion der kardialen Östrogenrezeptoren am normalen und erkrankten Herzen ist jedoch immer noch nicht genau geklärt (MAHMOODZADEH et al., 2006). Das zeigen auch Studien, die eine Östrogenersatztherapie bei postmenopausalen Frauen untersuchten und dabei feststellten, dass bei besagten Frauen das Risiko für chronische Herzerkrankungen erhöht ist (ROSSOUW et al., 2002), was wiederum ein Widerspruch hinsichtlich des kardialen Nutzens der Östrogene bei Frauen wäre.

Im Zuge der Untersuchungen konnte entsprechend festgestellt werden, dass die männlichen Tiere größere linksventrikuläre Durchmesser hatten. Zusätzlich war bei den männlichen Tieren mit einer RAGE-Expression eine schlechtere globale systolische Herzpumpleistung zu erkennen. Es wurde deutlich, dass das Gebiet der Geschlechtsunterschiede und deren Auswirkungen auf das kardiale System große forschungsseitige Lücken aufweist und von daher unbedingt in weiteren Studien untersucht werden sollte.

4.3 Globale systolische Herzfunktion mit Bezug auf genotypische Unterschiede

Knockout versus Wildtyp versus transgenen Überexpressionstyp

Es wurden Tiere vom Knockouttyp, welche kein RAGE exprimierten, Tiere vom Wildtyp, welche wenig RAGE bildeten und Tiere vom transgenen Überexpressionstyp, die viel RAGE am Herzen exprimierten, untersucht und miteinander verglichen.

Die transgenen Überexpressionstiere wiesen größere linksventrikuläre Durchmesser als die Knockout- und Wildtypiere auf. Für die Ejektions- und Verkürzungsfraction im Rahmen der globalen systolischen Pumpfunktion zeigte sich, dass die überexprimierten RAGE-Tiere eine deutlich schlechtere Pumpfunktion hatten als die Knockoutgruppe. Dieser Aspekt konnte auch im Vergleich zur Wildtypgruppe ermittelt werden, jedoch waren hier die Unterschiede geringer bzw. wiesen lediglich einen Trend zur Signifikanz auf.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Tiere mit einer kardialen RAGE-Überexpression (TGÜ) größere linksventrikuläre Durchmesser und eine schlechtere globale systolische Pumpfunktion im Vergleich zu Tieren ohne kardiale RAGE-Expression (KO) aufwiesen. Im Vergleich zu Tieren mit einer geringeren kardialen RAGE-Verteilung (WT) zeigten sich diese Unterschiede auch, jedoch in einer geringeren Ausprägung.

Da bei den jungen, männlichen transgenen Überexpressionstieren die linksventrikulären Durchmesser deutlich größer und die Herzpumpleistung deutlich schlechter waren als in den Vergleichsgruppen, wurden um die Ergebnisse der jungen, männlichen transgenen Überexpressionstiere zu sichern, im Vergleich Geschwistertiere vom Wildtyp dazu untersucht.

Dabei zeigte sich deutlich, dass die Wildtyp-Geschwistertiere eine deutlich bessere globale linksventrikuläre Pumpfunktion hatten. Ejektionsfraction und Verkürzungsfraction waren signifikant besser. Der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser und die endsystolische Hinterwanddicke waren bei den RAGE-überexprimierten Geschwistern ferner signifikant größer.

Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass sich die Veränderungen in der RAGE-überexprimierten Gruppe auf eine höhere RAGE-Verteilung am Herzen zurückführen lassen.

Wie lassen sich nun diese durch RAGE-bedingten möglichen Veränderungen erklären?

Vermutet wird, dass die Advanced Glycation End Products über die Bindung an deren Rezeptor RAGE über den NF- κ B-Signalweg bei Inflammation und Gewebeschädigungen mit erhöhter Gewebesteifigkeit eine wichtige Rolle spielen (SEMBA et al., 2010). Es wurde in diesem Zusammenhang belegt, dass bei altersbedingten kardialen Veränderungen RAGE eine wichtige Rolle inne hat (SIMM et al., 2004). Ferner wird angenommen, dass reaktive Sauerstoffspezies, aktiviert durch RAGE, an der altersassoziierten kardialen Fibrose mitwirken (CHEN und FRANGOIANNIS, 2010). Diese fibrotischen Veränderungen führen oft zu einer Aktivierung des Abbaus von Zellmatrix, was wiederum zu ventrikulärer Dilatation und systolischer Dysfunktion führen kann (IWANAGA et al., 2002).

Eine mögliche Hypothese könnte sein, dass die in den Untersuchungen festgestellten kardialen Veränderungen bei den überexprimierten RAGE-Tieren auf eine durch ROS-induzierte Herzfibrose zurückzuführen sind, da der Rezeptor für AGEs reaktive Sauerstoffspezies induzieren kann (COUGHLAN et al., 2009).

Eine andere Hypothese wäre, dass die funktionellen Veränderungen bei den RAGE-überexprimierten Tieren auf einen veränderten Kalziumstoffwechsel zurückzuführen sind. PETROVA et al. (2002), untersuchten in diesem Kontext den Kalzium-Stoffwechsel in fetalen kardialen Mausmyozyten mit RAGE-Überexpression und verglichen diese mit fetalen kardialen Mausmyozyten ohne RAGE-Expression. Dabei zeigte sich, dass die Kontrollmyozyten unter AGE-Exposition einen verlängerten intrazellulären Kalzium-Abfall aufwiesen. Im Vergleich jedoch hatten die Myozyten mit einer RAGE-Überexpression einen deutlich verlängerten intrazellulären Kalzium-Abfall. Der verlängerte Abfall des Kalziums bewirkt eine gestörte Relaxation, welcher zu einer kardialen Dysfunktion führen könnte. Des Weiteren wiesen die RAGE-überexprimierten Myozyten eine reduzierte intrazelluläre systolische und diastolische Kalzium-Konzentration auf, welche auf eine eingeschränkte Kontraktilität des Myokards hindeuten könnte. Beschrieben wurde das bereits im diabetischen Myokard bei Ratten (HAYASHI und NODA, 1997). Es fanden sich in der Literatur jedoch keine Vergleichsstudien bzw. Studien, die diese Ergebnisse validieren.

Dies lässt schlussfolgern, je höher die RAGE-Expression am Herzen, desto größer sind die linksventrikulären Durchmesser und umso schlechter ist die Herzpumpleistung und dies unabhängig vom Alter. Das scheint darauf hinzudeuten, dass eine hohe kardiale RAGE-Expression das Herz vorzeitig altern lässt.

4.4 Globale systolische Herzfunktion in Abhängigkeit von der RAGE-Expression in Bezug auf physische Aktivität im Alter

Wildtyp versus transgener Überexpressionstyp

Bereits in zahlreichen Studien wurde belegt, dass moderate und regelmäßige physische Aktivität einen positiven Einfluss auf Patienten mit chronischen Herzerkrankungen hat (BRIFFA et al., 2006). Des Weiteren geht regelmäßiges Ausdauertraining mit einer Verbesserung der Herzleistung und einer verbesserten vaskulären Funktion einher (THOMPSON et al., 2003). Positive Effekte der regelmäßigen Aktivität bei Patienten mit stabiler chronischer kardiovaskulärer Erkrankung sind unter anderem eine Steigerung der funktionellen Kapazität, ein verminderter Gebrauch an Medikamenten, eine bessere Lebensqualität und eine Reduktion der kardiovaskulären Mortalität (DEPARTMENT OF HEALTH, 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass sich zwischen beiden Genotypen (WT und TGÜ) keine signifikanten Unterschiede bei den linksventrikulären Durchmessern und der globalen systolischen Pumpfunktion zwischen den aktiven als auch den ruhenden Tieren darstellten. MATSUMOTO et al. (2010) haben bei LDLR^{-/-} Mäusen (low-density lipoprotein receptor negativ) gezeigt, dass sportliche Aktivität einen positiven Effekt bei der Primärprävention der Aortenklappenstenose hat. Die Entwicklung einer Aortenklappenstenose konnte durch regelmäßiges sportliches Training verhindert werden. Bestand jedoch bereits eine Aortenklappenstenose hatte sportliche Aktivität und auch Diät keinen positiven Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung (SCHLOTTER et al., 2012). Die RAGE-Überexpression bei den transgenen Tieren hatte keinen Einfluss auf die Ejektionsfraktion unter Laufradbelastung, wobei diese jedoch im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren etwas schlechter jedoch nicht signifikant war.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es keinen positiven Effekt durch körperliche Aktivität auf die Herzleistung bei den Tieren mit einer kardialen RAGE-Expression (Wildtyp als auch transgener Überexpressionstyp) im Alter gibt.

Jedoch ist anzumerken, dass für die Laufradbelastung nur sechs WT-Tiere und sieben TGÜ-Tiere zur Verfügung standen. Wenn man eine größere Anzahl an Tieren hätte untersuchen können, würden sich eventuell die in den Ergebnissen angedeuteten Unterschiede deutlicher darstellen. Diese Resultate sollten in einer weiteren Studie mit einer größeren Tieranzahl verifiziert werden.

4.5 Limitationen der Arbeit

Trotz der relativ einfachen Durchführung der Echokardiographie an der Maus, ergeben sich einige Einschränkungen, die bei der Bewertung der Ergebnisse unbedingt berücksichtigt werden sollten. Die im Folgenden aufgeführten Limitationen dieser Arbeit beziehen sich auf das Mausmodell, das verwendete Echokardiographiegerät und die verwendete Narkose mit Isofluran.

ROTH et al. (2002), verglichen intraperitoneal verabreichtes Ketamin/Xylazin (K/X) und inhaliertes Isofluran (Isf) an Mäusen, wobei bei K/X eine deutliche Bradykardie, Hypotonie und eine verlängerte aortale Auswurfzeit auffiel. Isofluran dagegen hatte die höchste Herzfrequenz, die stabilste Verkürzungsfraktion und eine Auswurfzeit von über 20 Minuten und war am besten reproduzierbar für die Herzfrequenz, Verkürzungsfraktion und enddiastolische Durchmesser. Des Weiteren ist die Inhalationsnarkose gut steuerbar und man erreicht leichter einen „steady state level“ der inhalierten Konzentration (ROTH et al., 2002).

Aus verschiedenen Gründen, wie z.B. nur einem Untersucher, einer hohen Anzahl an zu untersuchenden Tieren, limitierenden Untersuchungszeiten, begrenzte Labornutzungsmöglichkeiten usw., war eine echokardiographische Untersuchung an wachen Mäusen nicht möglich, weshalb eine echokardiographische Untersuchung unter Inhalationsnarkose mit Isofluran erfolgte. Dabei ist zu bedenken, dass die gemessenen Werte nicht unter physiologischen Bedingungen der Maus erhoben werden konnten und sich die Daten und Aussagen somit auf eine narkotisierte Maus unter veränderten Bedingungen (durch die Narkose bedingte Herzfrequenz- und Blutdrucksenkung) beziehen.

Zur Durchführung der Echokardiographie wurde das Gerät *Vivid i* der Firma GE Healthcare aus München verwendet, welches zum Beispiel Anwendung in der Kinderkardiologie findet. Der Nachteil dieses Gerätes bei der Untersuchung an der Maus ergibt sich aus dem Linearschallkopf, welcher eine Frequenz von maximal 13MHz erreicht und mit dem keine CW-Doppleruntersuchungen durchführbar waren. Dies war laut Angaben des Herstellers aus

physikalischen Gesichtspunkten nicht möglich. Eine apikale Anlotung, wie es für die Messungen der Klappen oder für die Ejektionsfraktion nach Simpson notwendig gewesen wäre, war wegen der geringen Auflösung nicht möglich. Eine Darstellung der parasternalen langen Achse war in einer guten und verwertbaren Bildqualität durchführbar, welche für das Vermessen der linksventrikulären Parameter im M-Mode genutzt wurde. Es sei auch darauf hingewiesen, dass neuere Geräte mit Ultraschallsonden von 30-40MHz, eine apikale Anlotung, auch beim Mausmodell ermöglichen und somit auch Aussagen zu Herzklappenfunktionen gemacht werden können. Eine Messung der diastolischen Funktion konnte aufgrund der hohen Herzfrequenz, trotz Narkose, nicht erfolgen, da eine Abgrenzung von E-Welle zu A-Welle nicht möglich war. Des Weiteren gab es an dem zur Messung der Daten genutztem Gerät keine Option für einen Gewebedoppler, welcher benötigt wird, um eine diastolische Funktionsstörung genauer und sicher zu quantifizieren. Die Messung der diastolischen Funktion wäre besonders in Bezug auf die Altersveränderungen sinnvoll, da bekannt ist, dass im Alter häufig die diastolische Dysfunktion durch eine gestörte Relaxation im Vordergrund steht. Deshalb ist es sehr wichtig, die gefundenen altersabhängigen kardialen Veränderungen in weiteren Untersuchungen, unter Einbeziehung der Messung der diastolischen Funktion zu beleuchten.

Zusammenfassend war für die vorliegende Arbeit und die vermessenen linksventrikulären Parameter das zur Verfügung stehende Gerät mit einer 13MHz-Sonde ausreichend, jedoch zur Bestimmung von Herzklappenfunktionen nur eingeschränkt verwendbar. Dafür eignen sich am murinen Modell Ultraschallgeräte mit Sonden, welche eine Frequenz von mindestens 30MHz erbringen können. Solch ein Gerät stand zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit leider nicht zur Verfügung.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit weiter auszubauen und zu sichern, wäre das zuvor beschriebene Gerät ein guter Ansatzpunkt, um entsprechende Mausmodelle weiterfolgend zu untersuchen.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Da sowohl das Altern als auch chronische Herzerkrankungen in unserer heutigen Gesellschaft eine wichtige Rolle spielen, war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob sich funktionelle kardiale Veränderungen, aufgrund von AGE-Akkumulation in Interaktion mit dem Rezeptor für AGEs am Herzen, in Abhängigkeit vom Alter, Geschlecht und der kardialen RAGE-Expression, durch Herzultraschall, nachweisen lassen.

Es zeigten sich in diesem Zusammenhang Veränderungen der systolischen linksventrikulären Pumpfunktion, abhängig vom Alter und von der RAGE-Expression am Herzen. Tiere mit einer RAGE-Überexpression, im jungen als auch im fortgeschrittenen Alter, wiesen im Vergleich deutlich größere linksventrikuläre Durchmesser und eine schlechtere globale systolische Herzpumpleistung auf. Weiterhin war auffällig, dass die alten Tiere vom Wildtyp und vom transgenen Überexpressionstyp eine schlechtere globale systolische Herzpumpleistung aufwiesen als die jungen Tiere. Eine mögliche Hypothese, die diese Veränderungen erklären könnte, ist der Einfluss des Kalzium-Stoffwechsels am Herzen, welcher, wie in wenigen Studien bereits gezeigt, durch RAGE beeinflusst sein könnte. Es ist bekannt, dass der Kalzium-Stoffwechsel einen wichtigen Faktor für die Herzfunktion darstellt und dafür ist es notwendig die pathophysiologische Bedeutung des Rezeptors für AGEs am Herzen genauer zu verifizieren. Da es bis zu diesem Zeitpunkt nur wenig Literatur gab, die diese Hypothese unterstützen könnte, sollten weitere Studien diese Effekte untersuchen.

Da ferner bekannt ist, dass es im Alter zu einer Hochregulierung der Proteinexpression von RAGE im menschlichen Herzen kommt, womöglich durch einen verminderten Abbau (SIMM et al., 2004), ist es unbedingt notwendig, weitere Folgestudien im Zusammenhang mit der AGE-RAGE-Bindung und deren kardialen Effekte im Alter zu veranlassen. Besonderes Augenmerk sollte auf die Bestimmung der diastolischen Herzfunktion im Alter gelegt werden, da diese nachweislich besonders im hohen Alter gestört ist. Da keine diastolische Funktion aus geräte-technischen Gründen bestimmt werden konnte, wäre dies ein guter Ansatzpunkt für weitere Studien.

Des Weiteren zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede, unabhängig vom Alter, welche auf eventuelle hormonelle Unterschiede zwischen dem weiblichen und männlichen Geschlecht zurückzuführen sind. Auch dies sollte weiter in Folgestudien untersucht werden.

Es konnte hingegen bei Tieren mit kardialer RAGE-Expression (WT und TGÜ) kein positiver Effekt von physischer Aktivität im Alter auf die Herzpumpleistung gezeigt werden. Wie bereits beschrieben, sollten auch hier weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an zu untersuchenden Tieren erfolgen.

All die Ergebnisse welche in dieser Arbeit gefunden wurden, lassen letztlich den Schluss zu, dass mit einer steigenden kardialen RAGE-Expression die systolische Herzpumpleistung abnimmt. Da chronische Herzkreislauferkrankungen mit eingeschränkter systolischer Herzpumpleistung in der Morbidität und Mortalität von chronischen Herzerkrankungen einen sehr großen Stellenwert einnehmen, ist es von besonderer Bedeutung, insbesondere funktionelle kardiale Veränderungen, hervorgerufen durch Advanced Glycation End Products und deren Rezeptor RAGE, in Folgestudien weiter zu verifizieren.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Rezeptor für Advanced Glycation End Products einen negativen Einfluss auf die kardiale Herzpumpleistung zu haben scheint. Inwieweit diese Ergebnisse direkt auf die Rezeptoraktivierung zurückzuführen sind, muss auf jeden Fall in nachfolgenden Studien abgeklärt werden. In dieser Arbeit wurden keine AGE-Konzentrationen bestimmt, was jedoch ein wichtiger Ansatzpunkt wäre. Deshalb sollte in Folgestudien zusätzlich zur Echokardiographie, die AGE-Konzentration bei den zu untersuchenden Tieren mitbestimmt werden, um einen direkten Zusammenhang zu beweisen bzw. widerlegen zu können.

In dieser Arbeit sind erste echokardiographische Daten in Bezug auf eine kardiale RAGE-Überexpression in Abhängigkeit vom Alter, Geschlecht und Genotyp erhoben wurden. Zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit gab es kaum Literatur, welche man zum Vergleich bzw. zur Validierung der gemessenen Daten hätte nutzen können. Aus diesem Grund besteht die Notwendigkeit die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit durch weitere Studien zu sichern und durch weitere Fragestellungen zu erweitern.

5 Literaturverzeichnis

Abel M., Ritthaler U., Zhang Y., Deng Y., Schmidt A.M., Greten J., Sernau T., Wahl P., Andrassy K., Ritz E., Waldherr R., Stern D., Nawroth P.P. „Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease.“ *Nephrol Dial Transplant* 10 (9), 1995: 1662-1670.

Ames, J.M. „Determination of N-(carboxymethyl)lysine in foods and related systems.“ *Ann NY Acad Sci* 1126, 2008: 20-24.

Assar S.H., Moloney C., Lima M., Magee R., Ames J.M. „Determination of N-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry.“ *Amino Acids* 36, 2009: 317-326.

Babiker F.A., De Windt L.J., van Eickels M., Thijssen V., Bronsaer R.J.P., Grohe C., van Bilsen M., Doevendans P.A. „17{beta}-Estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway.“ *Circulation* 109, 2004: 269-276.

Basta, G. „Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications.“ *Atherosclerosis* 196 (1), 2008: 9-21.

Baumann P.Q., Sobel B.E., Zaman T., Schneider D.J. „Gender-Dependent Differences in echocardiographic characteristics of murine hearts.“ *Echocardiography: A Jrnl. of CV Ultrasound & Allied Tech* 25 (7), 2008: 739-748.

Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S., Zdunek S., Barnabe-Heider F., Walsh S., Zupicich J., Alkass K., Buchholz B.A., Druid H., Jovinge S., Frisen J. „Evidence for cardiomyocyte renewal in humans.“ *Science* 324, 2009: 98-102.

Bierhaus A., Hofmann M.A., Ziegler R., Nawroth P.P. „AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept.“ *Cardiovascular Research* 37, 1998: 586-600.

Bierhaus A., Humpert P.M., Morcos M., Wendt T., Chavakis T., Arnold B., Stern D., Nawroth P.P. „Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products.“ *J Mol Med* 83, 2005: 876-886.

Bierhaus A., Humpert P.M., Nawroth P.P. „Linking stress to inflammation.“ *Anaesthesiol Clin* 24, 2006: 325-340.

Bierhaus A., Illmer T., Kasper M., Luther T., Quehenberger P., Tritschler H., Wahl P., Ziegler R., Muller M., Nawroth P.P. „Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE.“ *Circulation* 96, 1997: 2262-2271.

- Bierhaus A., Nawroth P.P. „Ruperto Carola: Schlüssel zum Verständnis chronischer Erkrankungen, Ausgabe 03/2002.“ März 2002. http://www.uni-heidelberg.de/presse/ruca/ruca3_2002/bierhaus.html (Zugriff am 4.. November 2011).
- Bierhaus A., Schiekofer S., Schwaninger M., et al. „Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor kappa-B.“ *Diabetes* 50, 2001: 2792-2808.
- Bleumink G.S., Knetsch A.M., Sturkenboom M.C.J.M., et al. „Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure - the Rotterdam Study.“ *European Heart Journal* 25 (18), 2004: 1614-1619.
- Böhmeke T., Weber K. *Echokardiographie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1995.
- Briffa T., Maiorana A., Sheerin N.J., Stubbs A.G., Oldenburg B.F., Sannel N.L., Allan R.M. „Physical activity for people with cardiovascular disease: recommendations of the National Heart Foundation of Australia.“ *Med J Aust* 184, 2006: 71-75.
- Brunson, D.B. „Pharmacology of inhalational anesthetic.“ 1997.
http://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=uH2vYAHBx_wC&oi=fnd&pg=PA29&dq=Pharmacology+of+inhalational+anesthetic&ots=KFqzN56mcT&sig=I_GpRH9D153SlmJ1VmCD2D1n5S0#v=onepage&q=Pharmacology%20of%20inhalational%20anesthetic&f=false (Zugriff am 18. November 2011).
- Bucala R., Tracey K.J., Cerami A. „Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes.“ *J Clin Invest* 87, 1991: 432-438.
- Bucciarelli L.G., et al. „Receptor for advanced glycation endproducts: key modulator of myocardial ischemic injury.“ *Circulation* 113, 2006: 1226-1234.
- Buggisch, M. *Mechanismen der Proliferation von Kardiomyozyten differenziert aus Embryonalen Stammzellen der Maus*. Gießen, 2007.
- Bundesamt, Statistisches. *Todesursachen in Deutschland 2010*. 23.. September 2011.
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Publikationen/Fachveroeffentlichungen/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400107004,property=file.pdf> (Zugriff am 4.. November 2011).
- Cain P.A., Ahl R., Hedstrom E., et al. „Age and gender specific normal values of left ventricular mass, volume and function for gradient echo magnetic resonance imaging: a cross sectional study.“ *BMC Medical Imaging* 9, 2009.
- Cerami C., Founds H., Nicholl I., Mitsuhashi T., Giordano D., Vanpatten S., Lee A., Al-Abed Y., Vlassara H., Bucala R., Cerami A. „Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (25), 1997: 13915-13920.
- Chen W, Frangogiannis NG. „The role of inflammatory and fibrogenic pathways in heart failure associated with aging.“ *Heart Fail Rev.* 15 (5), 2010: 415-422.
- Chen, M.A. „Heart failure with preserved ejection fraction in older adults.“ *Am J Med* 122, 2009: 713-723.

- Cheng S., Fernandes V.R.S., Bluemke D.A., McClelland R.L., Kronmal R.A., Lima J.A.C. „Age-Related Left Ventricular Remodeling and Associated Risk for Cardiovascular Outcomes: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis.“ *Circ Cardiovasc Imaging* 2, 2009: 191-198.
- Cheng S., Xanthakis M.S., Sullivan L.M., Lieb W., Massaro J., Aragaam J., Benjamin E.J., Vasani R.S. „Correlates of Echocardiographic Indices of Cardiac Remodeling Over the Adult Life Course: Longitudinal Observations from the Framingham Heart Study.“ *Circulation* 122, 2010: 570-578.
- Chu S.H., Sutherland K., Beck J., Kowalski J., Goldspink P., Schwertz D. „Sex differences in expression of calcium-handling proteins and beta-adrenergic receptors in rat heart ventricle.“ *Life Sci* 76, 2005: 2735-2749.
- Cleland JGF, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, Dietz R, Gavazzi A, Hobbs R, Korewicki J, Madeira HC, Moiseyev VS, Preda I, van Gilst WH, Widimsky J, Freemantle N, Eastaugh J, Mason J, Study Group on Diagnosis of the Working Gr. „The EuroHeart Failure survey programme - a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe Part 1: patient characteristics and diagnosis.“ *European Heart Journal* 24, 2003: 442-463.
- Collaborative, ExTraMATCH. „Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH).“ *British Medical Journal* 328, 2004: 189-196.
- Collins K.A., Korcarz C.E., Lang R.M. „Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice.“ *Physiol Genomics* 13, 2003: 227-239.
- Coughlan M.T., Thorburn D.R., Penfold S.A., Laskowski A., Harcourt B.E., Sourris K.C., Tan A.L., Fukami K., Thallas-Bonke V., Nawroth P.P., Brownlee M., Bierhaus A., Cooper M.E., Forbes J.M. „RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes.“ *J Am Soc Nephrol* 20 (4), 2009: 742-752.
- de Maria R., Gavazzi A., Recalcati F., Baroldi G., de Vita C., Camerini F. „Comparison of clinical findings in idiopathic dilated cardiomyopathy in women versus men.“ *American Journal of Cardiology* 72 (7), 1993: 580-585.
- de Souza, R.R. „Aging of myocardial collagen.“ *Biogerontology* 3, 2002: 325-335.
- Dimotrow P.P., Czarnecka D., Kawecka-Jaszcz K., Dubiel J.S. „The influence of age on gender-specific differences in the left ventricular cavity size and contractility in patients with hypertrophic cardiomyopathy.“ *International Journal of Cardiology* 88 (1), 2003: 11-16.
- Douglas P.S., Katz S.E., Weinberg E.O., Chen M.H., Bishop S.P., Lorell B.H. „Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload.“ *Journal of the American College of Cardiology* 32 (4), 1998: 1118-1125.
- Fischer D., Rossa S., Landmesser U., et al. „Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death.“ *Eur Heart J* 26, 2005: 65-69.
- Franklin, B. et al. „Fitness and Mortality in the Primary and secondary prevention of coronary artery disease: does the effort justify the outcome?“ *Am J Sports* 6, 2004: 23-27.

- Gardin J.M., Siscovick D., Anton-Culver H., Lynch J.C., Smith V.E., Klopfenstein H.S., Bommer W.J., Fried L., O'Leary D., Manolio T.A. „Sex, age, and disease affect echocardiographic left ventricular mass and systolic function in the free-living elderly: the Cardiovascular Health Study.“ *Circulation* 91, 1995: 1739-1748.
- Gazoti Debessa C.R., Mesiano Maifrino L.B., Rodrigues de Souza R. „Age related changes of the collagen network of the human heart.“ *Mech Ageing Dev* 122, 2001: 1049-1058.
- Giardino I., Edelstein D., Brownlee M. „Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes.“ *J Clin Invest* 94 (1), 1994: 110-117.
- Glenn J.V., Mahaff H., Wu K., et al. „Advanced glycation end product (AGE) accumulation on Bruch's membrane: link to age-related RPE dysfunction.“ *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 2009: 441-451.
- Gonzalez A., Rota M., Nurzynska D., Misao Y., Tillmanns J., Ojaimi C., Padin-Iruegas M.E., Müller P., Esposito G., Bearzi C., Vitale S., Dawn B., Sanganalmath S.K., Baker M., Hintze T.H., Bolli R., Urbanek K., Hosoda T., Anversa P., Kajstura J., Leri A. „Activation of cardiac progenitor cells reverses the failing heart senescent phenotype and prolongs lifespan.“ *Circ Res* 102, 2008: 597-606.
- Grandi A.M., Venco A., Barzizza F., Scalise F., Pantaleo P., Finardi G. „Influence of age and sex on left ventricular anatomy and function in normals.“ *Cardiology* 81, 1992: 8-13.
- Greenwald, S.E. „Ageing of the conduit arteries.“ *J Pathol* 211, 2007: 157-172.
- Grohe C., Kahlert S., Lobbert K., Vetter H. „Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis.“ *J Endocrinol* 156, 1998: R1-R7.
- Groten T., Pierce A.A., Huen A.C., Schnaper H.W. „17 beta-estradiol transiently disrupts adherens junctions in endothelial cells.“ *FASEB J* 19, 2005: 1368-1370.
- Haitoglou C.S., Tsilibary E.C., Brownlee M., et al. „Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen.“ *J Biol Chem* 267, 1992: 12404-12407.
- Hartog J.W.L., Voors A.A., Bakker S.J.L., Smit A.J., van Veldhuisen D.J. „Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: Pathophysiology and clinical implications.“ *European Journal of Heart Failure* 9, 2007: 1146-1155.
- Hayashi H., Noda N. „Cytosolic Calcium concentration decreases in diabetic rat myocytes.“ *Cardiovasc Res* 34, 1997: 99-103.
- Health, Department of. „At least five a week: Evidence on the impact of physical activity and its relationship to health.“ <http://www.dh.gov.uk>. 29. April 2004.
http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_4080994 (Zugriff am 11. November 2011).
- Herbst H., Hübner J.H. <http://www.pathologie-online.de/index2.php>. 2000.
<http://www.pathologie-online.de/index2.php> (Zugriff am 7. Dezember 2011).

- Hien, P. *Echokardiographie-Handbuch*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1996.
- Hofman A., Grobbee D.E., de Jong P.T.V.M., van den Ouweland F.A. „Determinants of disease and disability in the elderly: the Rotterdam Elderly Study.“ *European Journal of Epidemiology* 7 (4), 1991: 403-422.
- Hoit D.B., Khoury S.F., Kranias E.G., Ball N., Walsh R.A. „In Vivo Echocardiographic Detection of Enhanced Left Ventricular Function in Gene-Targeted Mice With Phospholamban Deficiency.“ *Circulation Research* 77, 1995: 632-637.
- Isermann B., Bierhaus A., Humpert P.M., Rudofsky G., Chavakis T., Ritzel R., Wendt T., Morcos M., Kasperk C., Hamann A., Nawroth P.P. „AGE-RAGE: eine Hypothese oder ein Mechanismus?“ *Herz* 29, 2004: 504-509.
- Iwanaga Y., Aoyama T., Kihara Y., Onozawa Y., Yoneda T., Sasayama S. „Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats.“ *J Am Coll Cardiol* 39, 2002: 1384-1391.
- Jolliffe J, Rees K, Taylor RRS, Thompson DR, Oldridge N, Ebrahim S, Heran BS, Chen JMH, Ebrahim S, Moxham T, Oldridge N, Rees K, Thompson DR, Taylor RS, Heran BS, Chen JMH, Ebrahim S, Moxham T, Oldridge N, Rees K, Thompson DR, Taylor RS. „Cochrane Database of Systematic Reviews 2011.“ <http://summaries.cochrane.org>. 10. August 2011.
<http://summaries.cochrane.org/CD001800/regular-exercise-or-exercise-with-education-and-psychological-support-can-reduce-the-likelihood-of-dying-from-heart-disease> (Zugriff am 11. November 2011).
- Kajstura J., Gurusamy N., Ogorek B., Goichberg P., Clavo-Rondon C., Hosoda T., D'Amario D., Bardelli S., Beltrami A.P., Cesselli D., Bussani R., del Monte F., Quaini F., Rota M., Beltrami C.A., Buchholz B.A., Leri A., Anversa P. „Myocyte turnover in the aging human heart.“ *Circulation Research* 107, 2010: 1374-1386.
- King G., Brownlee M. „The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications.“ *Endocrinol Metab Clin North Am* 25 (2), 1996: 255-270.
- Kitzmann D.W., Gardin J.M., Gottdiener J.S., Arnold A., Boineau R., Aurigemma G., Marino E.K., Lyles M., Cushman M., Enright P.L. „Importance of heart failure with preserved systolic function in patients > or = 65 years of age. CHS research group. Cardiovascular health study.“ *Am J Cardiol* 87, 2001: 413-419.
- Köhler E., Tataru M.C., Bosilj M. *Ein-und zweidimensionale Echokardiographie mit Dopplertechnik*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1992.
- Konhilas, JP. „What we know and do not know about sex and cardiac disease.“ *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 2010: 1-11.
- Lakatta EG, Levy D. „Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises Part I: Aging Arteries: A "Set Up" for Vascular Disease.“ *Circulation* 107, 2003: 139-146.

- Lakatta EG., Levy D. „Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises PartII: The Aging Heart in Health: Links to Heart Disease.” *Circulation* 107. 2003: 346-354.
- Lakatta E.G., Levy D. „Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part III: the aging heart in health: links to heart disease.“ *Circulation* 107, 2003: 346-354.
- Leri A., Kajstura J., Li B., Sonnenblick E.H., Beltrami C.A., Anversa P., Frishman W.H. „Cardiomyocyte aging is gender-dependent: the local IGF-1-IGF-1R system.“ *Heart Dis* 2, 2000: 108-115.
- Levy, D. „Left ventricular hypertrophy: epidemiological insights from the Framingham Heart Study.“ *Drugs* 35, 1988: 1-5.
- Mahmoodzadeh S., Eder S., Nordmeyer J., Ehler E., Huber O., Martus P., Weiske J., Pregla R., Hetzer R., Regitz-Zagrosek V. „Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure.“ *FASEB J* 20, 2006: 926-934.
- Matsumoto Y., Adams V., Jacob S., Mangner N., Schuler G., Linke A. „Regular Exercise Training Prevents Aortic Valve Disease in Low-Density Lipoprotein Receptor Deficient Mice.” *Circulation* 121, 2010: 759-767.
- Mendelsohn M.E., Karas R.H. „The protective effects of estrogen on the cardiovascular system.“ *N Engl J Med* 340, 1999: 1801-1811.
- Miyata T., Kurokawa K., van Ypersele de Strihou C. „Advanced Glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism.“ *J Am Soc Nephrol* 11, 2000: 1744-1752.
- Monnier V.M., Mustata G.T., Biemel K.L., et al. „Cross-linking of the extracellular matrix by the Maillard reaction in aging and diabetes: an update on " a puzzle nearing resolution".“ *Ann NY Acad Sci* 1043, 2005: 533-544.
- Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, Kaji Y, Yonei Y. „Significance of Advanced Glycation End Products in Aging-Related Disease.“ *Anti-Aging Medicine* 7 (10), 2010: 112-119.
- Nass N., Simm A. „Advanced glycation end products (AGEs) in diabetes.“ <http://www.saw-leipzig.de/forschung/projekte/zeitstrukturen-endokriner-systeme/endokrinologieiv.pdf>. 9. Februar 2009. <http://www.saw-leipzig.de/forschung/projekte/zeitstrukturen-endokriner-systeme/endokrinologieiv/nass.pdf> (Zugriff am 11. November 2011).
- Nawroth P.P., Ziegler R. *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel*. Berlin: Springer, 2001.
- Nerlich A.G., Schleicher E.D. „N-(carboxymethyl)lysine in arteriosclerotic vascular lesions as a marker for local oxidative stress.“ *Artherosclerosis* 144, 1999: 41-47.
- Niwa T., Katsuzaki T., Miyazaki S., Miyazaki T., Ishizaki Y., Hayase F., Tatemichi N., Takei Y. „Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients.“ *J Clin Invest* 99 (6), 1997: 1272-1280.

Nordmeyer J., Eder S., Mahmoodzadeh S., Martus P., Fielitz J., Bass J., Bethke N., Zurbrugg H. R., Pregla R., Hetzer R., Regitz-Zagrosek V. „Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis.“ *Circulation* 110, 2004: 3270-3275.

Olivetti G., Giordano G., Corradi D., Melissari M., Lagrasta C., Gambert S.R., Anversa P. „Gender differences and aging: effects on the human heart.“ *J Am Coll Cardiol* 26, 1995: 1068-1079.

Olivetti G., Melissari M., Capasso J.M., Anversa P. „Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy.“ *Circ Res* 68, 1991: 1560-1568.

Patten R.D., Pourati I., Aronovitz M.J., Baur J., Celestin F., Chen X., Michael A., Haq S., Nuedling S., Grohe C., Force T., Mendelsohn M.E., Karas R.H. „17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling.“ *Circ Res* 95, 2004: 692-699.

Petrova R., Yamamoto Y., Muraki K., Yonekura H., Sakurai S., Watanabe T., Li H., Takeuchi M., Makita Z., Kato I., Takasawa S., Okamoto H., Imaizumi Y., Yamamoto H. „Advanced glycation endproduct-induced calcium handling impairment in mouse cardiac myocytes.“ *J Mol Cell Cardiol* 34, 2002: 1425-1431.

Quehenberger P., Bierhaus A., Fasching P., et al. „Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor- κ B in AGE-stimulated cultured endothelial cells.“ *Diabetes* 49, 2000: 1561-1570.

Quehenberger P., Greten J., v-Riedesel J., Ziegler R., Wahl P., Speiser W., Bierhaus A., Nawroth P.P. „Endothelin-1 is under the control of the transcription factors p50/p65 (NF- κ B) and AP-1.“ *Ann Hematol* 70, 1995: 211.

Redfield M.M., Jacobsen S.J., Borlaug B.A., Rodeheffer R.J., Kass D.A. „Age- and gender-related ventricular-vascular stiffening: a community-based study.“ *Circulation* 112, 2005: 2254-2262.

Regitz-Zagrosek, V. *Genderaspekte bei KHE und Herzinsuffizienz*. Berlin, 11. Oktober 2009.

Rossouw J.E., Anderson G.L., Prentice R.L., et al. „Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial.“ *Journal of the American Medical Association* 288 (3), 2002: 321-333.

Roth D.M., Swaney J.S., Dalton N.D., Gilpin E.A., Ross Jr. J. „Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice.“ *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, 2002: 2134-2140.

Rottman J.N., Ni G., Khoo M., Wang Z. „Temporal changes in ventricular function assessed echocardiographically in conscious and anesthetized mice.“ *J Am Soc Echocardiogr* 16 (11), 2003: 1150-1157.

Salton C.J., Chuang M.L., O'Donnell C.J., et al. „Gender differences and normal left ventricular anatomy in an adult population free of hypertension: a cardiovascular magnetic resonance study

- of the Framingham Heart Study Offspring cohort.“ *Journal of the American College of Cardiology* 39 (6), 2002: 1055-1060.
- Sanders D.B., Kelley T., Larson D. „The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control.“ *Perfusion* 15, 2000: 97-104.
- Schalkwijk C.G., Baidoshvili A., Stehouwer C.D., van H. V., Niessen H.W. „Increased accumulation of the glycoxidation product Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in hearts of diabetic patients: generation and characterisation of a monoclonal anti-CML antibody.“ *Biochim Biophys Acta* 1636 (2-3), 2004: 82-90.
- Scherrer-Crosbie M., Thibault H.B. „Echocardiography in translational research: of mice and men.“ *J Am Soc Echocardiogr* 21 (10), 2008: 1083-1092.
- Schiekofer S., Andrassy M., Chen J., Rudofsky G., Schneider J., Wendt T., Stefan N., Humpert P., Fritsche A., Stumvoll M., Schleicher E., Haring H.U., Nawroth P.P., Bierhaus A. „Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK and nuclear factor kappaB in PBMCs.“ *Diabetes* 52 (3), 2003: 621-633.
- Schiller N.B., Shah P.M., Crawford M., DeMaria A., Devereux R., Feigenbaum H., et al. „Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms.“ *J Am Soc Echocardiogr* 2, 1989: 358-367.
- Schleicher E.D., Wagner E., Nerlich A.G. „Increased accumulation of the glycoxidation product N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging.“ *J Clin Invest* 99 (3), 1997: 457-468.
- Schlotter F., Matsumoto Y., Mangner N., Schuler G., Linke A., Adams V. „Regular Exercise or Changing Diet Does Not Influence Aortic Valve Disease Progression in LDLR Deficient Mice.“ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22606357>, 2012.
- Schmidt A.M., Hasu M., Popov D., et al. „Receptor for advanced glycation end products (AGE) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (19), 1994: 8807-8811.
- Schmidt A.M., Hori O., Chen J.X., Li J.F., Crandall J., Zhang J., Cao R., Yan S.D., Brett J., Stern D. „Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes.“ *J Clin Invest* 96 (3), 1995: 1395-1403.
- Schmidt A.M., Yan S.D., Yan S.F., Stern D. „Review: The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands.“ *Biochimica et Biophysica Acta* 1498 (2-3), 2000: 99-111.
- Schoensiegel F., Ivandic B., Geis N.A., Schrewe A., Katus H.A., Bekeredjian R. „High Throughput Echocardiography in Conscious Mice: Training and Primary Screening.“ *Ultraschall in Med* 31, 2010: 1-7.

- Semba R.D., Nicklett E.J., Ferrucci L. „Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype?“ *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65A (9), 2010: 963-975.
- Simm A., Bartling B., Silber R.E. „RAGE: A New Pleiotropic Antagonistic Gene?“ *Ann NY Acad Sci* 1019, 2004: 228-231.
- Simm A., Casselmann C., Schubert A., Hofmann S., Reimann A., Silber R.E. „Age associated changes of AGE-receptor expression: RAGE upregulation is associated with human heart dysfunction.“ *Exp Gerontol* 39, 2004: 407-413.
- Simm A., Rando T.A. „Tissue Ageing: Do insights into molecular mechanisms of ageing lead to new therapeutic strategies?“ *Exp Gerontol* 43, 2008: 603-604.
- Stirban, A. „Pathogenetische Rolle der Advanced Glycation Endproducts (AGEs).“ *Diabetes, Stoffwechsel und Herz*, 2010: 191-193.
- Stirban, A. „Die Bedeutung von AGEs und ROS bei Atherosklerose.“ *Herz* 35 (3), 2010: 170-180.
- Stitt A.W., He C., Friedman S., Scher L., Rossi P., Ong L., Founds H., Li Y.M., Bucala R., Vlassara H. „Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs.“ *Mol Med* 3 (9), 1997: 617-627.
- Sun M., Yokoyama M., Ishiwata T., Asano G. „Deposition of advanced glycation end products (AGEs) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat.“ *Int J Exp Pathol* 79, 1998: 207-222.
- Tanaka S., Avigad G., Brodsky B., et al. „Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen.“ *J Mol Biol* 203, 1988: 495-505.
- Thomas D.P., Zimmermann S.D., Hansen T.R., Martin D.T., McCormick R.J. „Collagen gene expression in rat left ventricle: interactive effect of age and exercise training.“ *J Appl Physiol* 89, 2000: 1462-1468.
- Thomas S., Rich M.W. „Epidemiology, pathophysiology, and prognosis of heart failure in the elderly.“ *Clin Geriatr Med* 23, 2007: 1-10.
- Thompson P.D., Buchner D., Pina I.L., et al. „Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease.“ *Circulation* 107, 2003: 3109-3116.
- Thurnes, Verena. *Versuch einer toxikologischen Bewertung ausgewählter mutagener und karzinogener Produkte der Maillard-Reaktion*. Grin Verlag, 2010.
- Torella D., Rota M., Nurzynska D., Musso E., Monsen A., Shiraishi I., Zias E., Walsh K., Rosenzweig A., Sussman M.A., Urbanek K., Nadal-Ginard B., Kajstura J., Anversa P., Leri A. „Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression.“ *Circ Res* 94, 2007: 514-524.
- Villar A.V., Llano M., Cobo M., et al. „Gender differences of echocardiographic and gene expression patterns in human pressure overload left ventricular hypertrophy.“ *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46 (4), 2009: 526-535.

- Villari B., Campbell S.E., Schneider J., Vassalli G., Chiariello M., Hess O.M. „Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload.“ *European Heart Journal* 16 (10), 1995: 1410-1419.
- Vlassara H., Bucala R. „Recent progress in advanced glycation and diabetic vascular disease: role of advanced glycation end product receptors.“ *Diabetes* 45 (3), 1996: 565-566.
- Vlassara, H. „Advanced glycation end-products and atherosclerosis.“ *Ann Med* 28 (5), 1996: 419-426.
- Vlassara, H. „Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment.“ *Ann NY Acad Sci* 1043 (1), 2005: 452-460.
- Wautier J.L., Zoukourian C., Chappey O., Wautier M.P., Guillausseau P.J., Cao R., Hori O., Stern D., Schmidt A.M. „Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats.“ *J Clin Invest* 97, 1996: 238-243.
- Yamagishi S., Yonekura H., Yamamoto Y., et al. „Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor.“ *J Biol Chem* 272, 1997: 8723-8730.
- Yan S.D., Chen X., Fu J., Chen M., Zhu H., Roher A., Slattery T., Zhao L., Nagashima M., Morser J., Migheli A., Nawroth P.P., Stern D., Schmidt A.M. „RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease.“ *Nature* 382, 1996: 685-691.
- Yan S.D., Zhu H., Zhu A., Golabek A., Wolozin B., Roher A., Yu J., Chaney M., Soto C., Schmidt A.M., Stern D., Kindy M. „Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis.“ *Nature Medicine* 6, 2000: 643-651.
- Yan S.F., Ramasamy R., Schmidt A.M. The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and cardiovascular disease. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19278572>, 12. März 2009.
- Zealand, National Heart Foundation of Australia/Cardiac Society of Australia and New. „Reducing risk in heart disease 2007.“ www.heartfoundation.org.au. 2008.
<http://www.heartfoundation.org.au/SiteCollectionDocuments/Reduce-risk-in-heart-disease-guideline.pdf>.

6 Thesen

- 1 Der Rezeptor für Advanced Glycation End Products (RAGE) scheint einen Einfluss auf die globale systolische Herzfunktion und die Größe der linksventrikulären Durchmesser zu haben.
- 2 Eine zunehmende RAGE-Expression am Herzen wirkt sich negativ auf die globale systolische Herzpumpleistung, unabhängig vom Alter, aus.
- 3 Alte Tiere mit kardialer RAGE-Expression haben im Vergleich zu den jungen Tieren mit kardialer RAGE-Expression eine schlechtere globale systolische Herzfunktion.
- 4 Weibliche Tiere haben eine bessere linksventrikuläre systolische Herzfunktion als die männlichen Tiere.
- 5 Weibliche Tiere haben kleinere linksventrikuläre Durchmesser als die männlichen Tiere.
- 6 Physische Aktivität im Rahmen einer freiwilligen Laufradbelastung hat keinen Einfluss auf die Herzleistung alter, männlicher Tiere mit kardialer RAGE-Expression.
- 7 Durch körperliche Aktivität wird kein positiver Effekt auf die Herzfunktion bei RAGE-exprimierten Tieren im Sinne einer Sekundärprävention erreicht.
- 8 Eine hohe kardiale RAGE-Expression hat einen wichtigeren Einfluss auf die globale systolische Herzfunktion als das Altern.
- 9 RAGE verursacht vorzeitiges Altern am Herzen.

Lebenslauf

Name	Kosel	
Vorname	Mandy	
Geburtsdatum	17.November 1977	
Geburtsort	Altenburg	
Staatsangehörigkeit	Deutsch	
Anschrift	August-Fritzsche-Straße 12, 04509 Delitzsch	
Familienstand	Ledig, 1 Sohn (geboren am 16.04.2011)	
Schulausbildung	1984 – 1994	Realschule, Altenburg
	2000 – 2003	Abitur, Abendgymnasium Lübeck
Berufsausbildung	1994 – 1997	Ausbildung zur MTA-Funktionsdiagnostik, Staatliche Medizinische Fachschule Nordhausen
	seit 2006	Studium der Humanmedizin, MLU Halle-Wittenberg
Abschluss	1994	Realschulabschluss
	1997	MTA-Funktionsdiagnostik
	2003	Abitur (Abendschule)
	2006	Test of English as a Foreign Language (TOEFL)
	2013	Absolvierung des Hammerexamens zur Erlangung der Approbation als Ärztin
Werdegang	1997 – 1998	MTA-Funktionsdiagnostik, Universitätsklinik Leipzig für Neurologie
	1998 – 2000	MTA-Funktionsdiagnostik, Kreiskrankenhaus Altenburg, Kinderneurologie
	2000 – 2003	MTA-Funktionsdiagnostik, Universitätsklinik Lübeck, Kardiologie

- 2003 – 2005 Au Pair in den USA (Atlanta, GA und Washington, D.C.)
- 2006 – 2006 MTA-Funktionsdiagnostik, Max-Planck-Institut für Neurowissenschaften Leipzig
- 2006 - 2007 Studentische Hilfskraft am MPI Leipzig
- 2007 – 2009 Studentische Hilfskraft an der Universitätsklinik Kröllwitz, Durchführung der Echokardiographie bei der CARLA-Studie
- 2013 - Assistenzärztin der Viszeralchirurgie, Gesundheitszentrum Bitterfeld-Wolfen

Eidesstattliche Erklärung

Name: Kosel Vorname: Mandy
Matrikel-Nr.: 206203645 Studiengang: Humanmedizin

Hiermit versichere ich, Mandy Kosel, an Eides statt, dass ich die vorliegende medizinische Dissertation mit dem Titel „Ultraschalluntersuchungen zu RAGE- und altersabhängigen Veränderungen der Herzfunktion am Mausmodell“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen wurden, sind in jedem Fall unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht oder in anderer Form als Prüfungsleistung vorgelegt worden.

Ich habe die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und prüfungsrechtlichen Folgen (§ 26 Abs. 2 Bachelor-SPO bzw. § 19 Abs. 2 Master-SPO der Hochschule der Medien Stuttgart) sowie die strafrechtlichen Folgen (siehe unten) einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung zur Kenntnis genommen.

Auszug aus dem Strafgesetzbuch (StGB)

§ 156 StGB Falsche Versicherung an Eides Statt

Wer von einer zur Abnahme einer Versicherung an Eides Statt zuständigen Behörde eine solche Versicherung falsch abgibt oder unter Berufung auf eine solche Versicherung falsch aussagt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

Halle/Saale, den

Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Mandy Kosel, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Halle/Saale, den

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2009 bis 2013 während meines Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Nachfolgend möchte ich mich bei den Personen bedanken, welche durch Ihre Unterstützung die Realisierung der Dissertationsschrift erst ermöglichten.

An erster Stelle gilt mein ganz besonderer Dank meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. A. Simm für die Überlassung des Themas als auch für die Unterstützung und die vielen hilfreichen fachlichen Hinweise und Anmerkungen während der gesamten Bearbeitungsphase.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. N. Naß für seine Unterstützung bei den tierexperimentellen Untersuchungen sowie für sein jederzeit offenes Ohr.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn OA PD Dr. H. Ebelt für die Unterstützung bei der geräte-technischen und anästhetischen Durchführung meiner Untersuchungen.

Weiter danke ich Frau D. Müller für Ihre stets geduldige Unterstützung und Hilfe bei allen formellen und organisatorischen Gegebenheiten, sowie den anderen Doktoranden des Forschungslabors, besonders Beatrice Leuner, für die Hilfe bei den molekularbiologischen Untersuchungen.

Ein besonderer Dank gilt den Tierpflegerinnen Frau Hennicke und Frau Gottschalk für die tatkräftige Unterstützung während der Versuchsdurchführung.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meiner Familie für ihre Unterstützung und Geduld während dieser doch oft schwierigen Zeit danken.