

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie der
Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

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

**Der Einfluss nicht - enzymatischer Glykierung bei
Ischämie - Reperfusionsschäden am Myokard**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Elke Beatrice Müller

geboren am 16.06.1978 in Frankenberg

Betreuer: Prof. Dr. Andreas Simm

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Andreas Simm
 2. Prof. Dr. Ursula Müller-Werdan
 3. Prof. Dr. Regine Heller (Jena)

Eröffnung des Promotionsverfahrens am 11.03.2014

Öffentliche Verteidigung am 17.06.2015

Referat

Zielsetzung: *Advanced glycation endproducts* (AGE), Produkte der Maillardreaktion, werden durch die nicht-enzymatische Reaktion aus reduzierenden Zuckern, aber auch aus α -Dicarbonylen, zu denen Glyoxal gehört, gebildet. AGEs werden eine wichtige Rolle bei der Ätiologie kardiovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben. Daher wurden die Wirkung von Glyoxal im Ischämie-Reperusionsversuch am humanen Myokard unterschiedlichen Alters und dessen potentielle intrazelluläre Wirkweise untersucht.

Material und Methoden: Aus dem während des kardiochirurgischen Eingriffs entnommenen rechtsatrialen Myokard wurden Trabekel präpariert. Diese wurden im Organbad mit Glyoxal in aufsteigender Konzentration (0,01 – 1 mM) bzw. als Kontrollen behandelt. Zwei Altersgruppen wurden gebildet: Erwachsene (≤ 60 Jahre, mittleres Alter: $53,7 \pm 1,3$) und Senioren (≥ 70 Jahre, mittleres Alter: $74,1 \pm 0,6$). Die gewonnenen Proben wurden anschließend mittels Western-Blot Analyse auf die Bildung von AGEs, die Expression von RAGE und die Aktivierung von Proteinkinasen (extrazellulär aktivierbare Kinasen ERK1/2^{MAPK}, Proteinkinase B (Akt) und Mitogen aktivierbare Proteinkinase p38 (p38^{MAPK})) sowie den Einfluss auf den Apoptose-Pathway untersucht. Außerdem erfolgte die Analyse der Wirkung von Glyoxal in isolierten adulten Rattenkardiomyozyten.

Ergebnisse: Unter Einfluss von Glyoxal wird in beiden Altersgruppen eine signifikant verbesserte Kontraktionskraft im Ischämie-Reperusionsversuch verzeichnet. Korrelierend mit diesem Ergebnis ist der Zelltod, nachgewiesen im LDH-Release Assay, unter Glyoxal signifikant reduziert. Unter Behandlung mit Glyoxal fand sich eine signifikante Aktivierung der Survival-Kinasen Akt und ERK1/2^{MAPK} sowie wie erwartet eine deutliche Carboxy-Methyl-Lysin (CML) – Bildung. Allein unter Ischämie / Reperusions - Bedingungen konnten wir keinen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK sowie CML Bildung und RAGE Expression darstellen. Hinsichtlich des Apoptose-Pathways, untersucht in Caspase 9 und Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP), können wir keinen Einfluss von Glyoxal nachweisen. Trotz erhöhter CML-Bildung ließ sich eine geringere Expression von RAGE zeigen.

Schlussfolgerung: Glyoxal schützt konzentrationsabhängig das Myokard signifikant vor Ischämie-Reperfusionsschäden. Die Aktivierung der Survival-Kinasen Akt und ERK1/2^{MAPK} lassen einen positiven Einfluss auf den RISK – Pathway vermuten. Der unerwartet positive Effekt einer Proteinglykierung im Ischämie-Reperusionsversuch könnte daher eine Grundlage für einen neuartigen Präkonditionierungsansatz sein.

Müller, Elke *Beatrice*: *Der Einfluss nicht – enzymatischer Glykierung bei Ischämie – Reperfusionsschäden am Myokard. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2014*

Inhaltsverzeichnis	I - III
Abkürzungsverzeichnis	IV - V
1 Einleitung	1 - 14
1.1 Myokard: Beziehung zwischen kardiovaskulärem Altern und kardialen Erkrankungen	1
1.2 Ischämie- und Reperfusionsschaden	3
1.3 Altern des Organismus	5
1.4 <i>Advanced Glycation Endproducts</i> (AGEs) / Maillard-Reaktion	6
1.4.1 Entstehung von AGEs	6
1.4.2 Signaltransduktion durch die Bindung von AGEs an Rezeptoren	8
1.4.3 Einfluss von AGEs auf das Altern und die Entstehung von Krankheiten	11
1.4.4 Therapieansätze bei AGE – induzierten Erkrankungen	12
1.5 Glyoxal – Entstehung, Wirkung und Entgiftung	12
1.6 Zielsetzung	14
2 Material und Methoden	15 - 33
2.1 Chemikalien und Kits	15
2.2 Verwendete Puffer und Lösungen	17
2.3 Geräte, sonstige Materialien und Software	21
2.4 Menschliches Herzohrgewebe	23
2.5 Organbadversuch	24
2.5.1 Präparation der Vorhoftrabekel	24
2.5.2 Versuchsaufbau	25
2.5.3 Versuchsdurchführung	25
2.6 Proteinchemie	27
2.6.1 Proteinpräparation aus Myokardgewebe	27
2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	27
2.7 Western – Blot Analyse	27
2.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.7.2 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran	28
2.7.3 Polyacrylamidgelfärbung mit Coomassie – Blau	30
2.7.4 <i>Stripping</i> von Nitrocellulose – Membranen	30
2.8 Dot – Blot Analyse	30

2.9	Zellkultur	31
2.9.1	Isolierung / Kultivierung von adulten Rattenkardiomyozyten	31
2.9.2	Simulierte Ischämie / Reperfusion in adulten Rattenkardiomyozyten	32
2.9.3	Proteinpräparation aus Zellen	32
2.10	Zelltodnachweis durch Bestimmung der LDH Aktivität im LDH-Release Assay (Zytotoxizitätsassay)	32
2.11	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse	34 - 54
3.1	Abhängigkeit der Kontraktionskraft von der Glyoxalkonzentration im Organbad	34
3.1.1	Wirkung von Glyoxal auf Trabekel im Organbad: Kinetik	34
3.1.2	Wirkung von Glyoxal auf Trabekel im Organbad: Konzentrationsabhängigkeit	37
3.2	AGE – Bildung in Abhängigkeit von der Glyoxalkonzentration	39
3.2.1	CML – Bildung in Abhängigkeit von der Glyoxalbehandlung	39
3.2.2	Korrelation der Kontraktionskraft nach 40 ´ Reperusionszeit mit der CML – Bildung	41
3.2.3	Pentosidin – Bildung nach Glyoxalbehandlung	41
3.2.4	Bildung weiterer AGEs nach Glyoxalbehandlung	42
3.3	Zellulärer Response in Abhängigkeit von der Glyoxalbehandlung in humanem Myokardgewebe von Patienten ≤ 60 Jahre und ≥ 70 Jahren	43
3.3.1	Glyoxal – vermittelte Kinasenaktivierung	43
3.3.2	Glyoxal – Effekte auf Apoptose	45
3.3.3	Expression von RAGE in Abhängigkeit von Glyoxal	46
3.3.4	Einfluss der Ischämie / Reperfusion per se auf die Aktivierung der Kinasen (Akt, ERK1/2 ^{MAPK} , p38 ^{MAPK}), RAGE – Expression und Bildung von CML	48
3.4	Analyse der Glyoxalwirkung in Rattenmyozyten	50
3.4.1	Abhängigkeit der Kinasenaktivierung Akt und ERK1/2 ^{MAPK} von der Glyoxalbehandlung zu verschiedenen Reperusionszeitpunkten	50
3.4.2	Abhängigkeit der Aktivierung von Caspase 9 von der Glyoxal- behandlung zu verschiedenen Reperusionszeitpunkten	52
3.5	Zelltodnachweis im Organbadversuch durch Bestimmung der LDH Freisetzung im Überstand	53
3.5.1	Einfluss von Glyoxal auf die LDH Freisetzung im Organbadversuch	53

3.5.2	Einfluss von Caspaseinhibitor auf die LDH Freisetzung im Organbadversuch	54
4	Diskussion	55 - 67
4.1	Limitierung der Organbadversuche am humanen Myokard <i>ex vivo</i>	55
4.2	Einfluss von Glyoxal auf humanes Myokard nach Ischämie – Reperfusion	56
4.2.1	Analyse der Wirkung von Glyoxal auf die Kontraktionskraft	56
4.2.2	Einfluss von Glyoxal auf die Bildung von Modifikationen im humanen Myokard	58
4.2.3	Expression des AGE-Rezeptors nach Glyoxal-Behandlung	59
4.2.4	Klinische Relevanz der Interaktion zwischen AGE und AGE-Rezeptor	61
4.3	Analyse der Wirkung von Glyoxal auf zellulärer Ebene	62
4.3.1	Im humanen Myokard	62
4.3.2	In Rattenkardiomyozyten im Zellkulturmodell	65
4.4	Klinische Relevanz von Glyoxal	66
5	Zusammenfassung und Ausblick	68 - 69
6	Literaturverzeichnis	70 - 79
7	Thesen	80

Tabellarischer Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
a	Jahr
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AGEs	<i>Advanced Glycation Endproducts</i> (Glykierungsendprodukte)
Akt	Serin/Threonin Proteinkinase B
AMI	Akuter Myokardinfarkt
APS	Ammoniumpersulfat
<i>aqua bidest</i>	bidestilliertes Wasser
BCA	Bichinonsäurelösung
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propan-sulfonsäure
CCS	<i>Canadian Cardiovascular Society</i>
CML	Nε-(Carboxylmethyl-) Lysin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK 1/2 ^{MAPK}	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
<i>et al.</i>	und andere
evtl.	eventuell
EZM	Extrazelluläre Matrix
GSH	Glutathion
h	<i>hour</i> (Stunde)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
FKS	Fötales Kälberserum
KHK	koronare Herzkrankheit
KRH Puffer	Krebs- Ringer- HEPES Puffer
LDH	Lactat - Dehydrogenase
M	Molar
mM	Millimolar
M199	Medium 199

MAD	Mittlerer arterieller Druck
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
n	Anzahl der Versuche
N ₂	Stickstoff
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i> (Transkriptionsfaktor)
nm	Nanometer
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
O ₂	Sauerstoff
p38 ^{MAPK}	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase p38</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
P-Akt	phosphorylierte Akt
PARP	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
P-ERK1/2 ^{MAPK}	phosphorylierte ERK1/2 ^{MAPK}
P- p38 ^{MAPK}	phosphorylierte p38 ^{MAPK}
PDGF	<i>platelet – derived growth factor</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N', Tetramethylethan-1,2 – diamin
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZVD	Zentralvenöser Druck
MW	Mittelwert
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

1 Einleitung

1.1 Myokard: Beziehung zwischen kardiovaskulärem Altern und kardialen Erkrankungen

Erkrankungen des Herz- / Kreislaufsystems waren nach Ergebnissen der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes mit 40,2 % die häufigsten Todesursachen in 2011 in Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2012). Unter diesen waren wiederum die drei häufigsten Todesursachen die chronisch ischämische Herzkrankheit (ca. 11,1 %), der akute Myokardinfarkt (ca. 8,9 %) und die Herzinsuffizienz (6,5 %) (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2011). Da Herz- und Kreislauferkrankungen insbesondere im höheren Alter auftreten, scheinen Prozesse, die z.B. den Herzmuskel im Laufe des Lebens funktionell beeinflussen können, von besonderer Bedeutung zu sein.

Die Herzwand ist von innen nach außen aus Endokard, Myokard und Epikard aufgebaut. Das Myokard, der Herzmuskel, bildet dabei den größten Anteil. Circa zwei Drittel des Volumens wird dabei von den Kardiomyozyten selbst gebildet. Das verbleibende Drittel besteht zum einen aus den nicht-myozytären Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Mastzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen und aus extrazellulärer Matrix sowie Blut und Lymphe (Cleutjens, 1996).

Die Risiken für die Entstehung diverser kardiovaskulärer Krankheiten wie Herzinsuffizienz, Linksherzhypertrophie, Vorhofflimmern aber auch Schlaganfall nehmen im Alter bedingt durch komplexe Umbauvorgänge zu (Lakatta und Levy, 2003b). Dabei kommt es während des Alterungsprozesses infolge lebenslangem (zellulären) Stress im kardiovaskulären System zu strukturellen (zelluläre Schadens- und Reparaturprozesse) und funktionellen Veränderungen (Adaptationsprozessen) des Herzens, die von Lakatta et al. zusammengefasst wurden.

Es wird beschrieben, dass im Alter die Progredienz der Intimaverdickung durch die Zunahme an Matrix und vaskulären glatten Muskelzellen sowie den größeren Anteil an Typ 2 Metalloproteinen (MMP-2), TGF- β und interstitiellen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) verursacht wird (Lakatta, 2003). Mit zunehmender Intimadicke sowie Elastizitätsminderung der Gefäße, bedingt der erhöhten Kollagenbildung und Quervernetzung des Kollagens in den Gefäßwänden, steigt die Nachlast am Herzen, was wiederum zu arterieller Hypertonie und kompensatorisch zur Hypertrophie im linken Ventrikel und infolge zu einem erhöhten enddiastolischen Fülldruck führt (Lakatta, 2002; Lakatta und Sollott, 2002; Lakatta und Levy, 2003b).

Mit sinkender Elastizität bzw. physiologischer Windkesselfunktion der Aorta aufgrund der Kollagenproduktion steigt allerdings die intraventrikuläre Volumenbelastung. Infolge dessen wird initial das Myokard gedehnt. Mit der Überdehnung der Kardiomyozyten sowie Fibroblasten werden Faktoren wie z.B. TGF- β und Angiotensin freigesetzt und nachfolgende Signalkaskaden aktiviert (Cheng et al., 1995; Cigola et al., 1997). Dies kann zum programmierten Zelltod, der sogenannten Apoptose führen.

Um die erhöhte Nachlast zu kompensieren hypertrophiert das Myokard. Das führt zu einer Zunahme der Größe der Myozyten im linken Ventrikel, da die Zahl der entdifferenzierten kardialen Myozyten nicht steigt, sondern aufgrund von Nekrose und Apoptose eher sinkt (Anversa et al., 1990; Lakatta, 2002). Sowohl vorgenannte Prozesse als auch der Anstieg der Herzfrequenz und die reduzierte Ejektionsfraktion führen zu einer reduzierten kardialen Reservekapazität während des Alterungsprozesses (Lakatta und Sollott, 2002).

Adulte Kardiomyozyten verlieren kurz nach der Geburt ihre Teilungsfähigkeit. Reparaturprozesse des geschädigten Myokards z.B.: als Folge eines Myokardinfarktes, werden somit durch stimulierte Fibroblasten sowohl durch deren Proliferation als auch Kollagenbildung realisiert. Narbengewebe und damit kollagenes Bindegewebe wird ausgebildet. In einer neueren Untersuchung mit ^{14}C -Markierung neu synthetisierter DNA in Kardiomyozyten konnte nachgewiesen werden, dass eine Erneuerung der Myozyten im geringen Maß auch im adulten Organismus noch erfolgen kann. Laut dieser Studie werden bis zu 1 % der Herzmuskelzellen bei einem 20-jährigen pro Jahr ersetzt, bei einem 75-jährigen sinkt diese Rate allerdings auf 0,3 % (Bergmann et al., 2009). Im Leben eines Individuums können daher lediglich bis zu 40 % der Kardiomyozyten regeneriert werden. Der Verlust an kontraktilen Herzmuskelgewebe erhöht das Risiko des Auftretens von Komplikationen wie Herzinsuffizienz, Herzwandaneurysmen und Herzwandruptur.

Mit steigendem Durchschnittsalter der Bevölkerung nimmt die Patientenzahl, die sich zur konservativen aber auch operativen Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen vorstellen, zu. Myokardischämie stellt für die, die sich einer koronar - arteriellen Bypassoperation unterziehen, ein wesentliches Risiko sowohl kurz- als auch langfristig dar (Hirose et al., 2000). In einer retrospektiven Studie wurde gezeigt, dass sich die Lebensqualität nach einem herzchirurgischen Eingriff wesentlich verbessert, wenngleich sowohl die Morbidität als auch Mortalität bei über 75-Jährigen im Vergleich zu Jüngeren postoperativ erhöht ist (Friedrich et al., 2009).

1.2 Ischämie – und Reperfusionsschaden

Die Spätfolge einer koronaren Herzkrankheit (KHK) ist bei Okklusion einer der Hauptkoronaren ein akuter Myokardinfarkt. Während der folgenden Ischämie kommt es zur Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, was eine Behinderung des zellulären Stoffwechsels bedingt. Zur Reduktion der kardialen Folgeschäden während einer akuten Ischämie wird eine Anzahl von pharmakologischen Wirkstoffen appliziert. Die Peri- und Postinfarkttherapie umfasst zur Prophylaxe der koronaren Retrombosierung Thrombozytenaggregationshemmer. Zur Langzeittherapie und insbesondere Prognose verbessernd hat sich eine Therapie mit Betablockern, Statinen und ACE-Hemmer etabliert (Herold, 2012). Insgesamt betrachtet wird eine frühzeitige Reperfusionstherapie zur Sicherstellung des koronaren Flows, speziell durch Koronarintervention (z.B.: Herzkatheter, Stents, Thrombolyse), in einem entsprechendem Herzzentrum angestrebt (Kloner und Rezkalla, 2004). Reperfusion bedeutet, dass ein ischämisches Areal erneut mit Blut perfundiert wird. Die günstigen Auswirkungen der Reperfusionstherapien sind allerdings begrenzt durch die Größe des Ischämieschadens, der vor der Reperfusion bereits auftrat (Bucciarelli et al., 2006).

Das Letalitätsrisiko bei kardialen Eingriffen, das präoperativ anhand von Scoring-Systemen abgeschätzt werden kann, steigt mit dem Alter des Patienten und dessen Komorbiditäten (Friedrich et al., 2009). In einer experimentellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass humanes Myokard älterer Individuen eine reduzierte Toleranz bzw. erhöhte Sensitivität auf ischämischen Schaden / Hypoxie, der z.B. in der Herzchirurgie bei einem aorto – koronaren Bypass auftritt, aufweist mit dem Effekt, dass die Kontraktionsfähigkeit nach Ischämie im Vergleich zu jüngerem Myokard sinkt (Mariani et al., 2000). Auch tierexperimentell wird laut Rosenfeldt et al. (2002) gezeigt, dass gealterte Ratten - Herzen eine verminderte Toleranz zu aeroben und ischämischen Stress aufweisen. Dabei wurde eine verringerte Q-10 Konzentration, ein essentieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, als eine Ursache aufgezeigt. Bereits eine präoperative Therapie mit Q-10 führte zur verbesserten myokardialen Kontraktion nach Ischämie (Rosenfeldt et al., 2002).

Präkonditionierung, erstmalig beschrieben 1986 durch Murry et al. (1986), ist ein endogener Mechanismus zum Schutz des Myokards vor den Schäden einer Ischämie. Tierexperimentell wurde gezeigt, dass kurze, subkritische myokardiale Ischämiephasen mit Reperfusion zur Adaptation des Myokards führen (Murry et al., 1986). Infolge der Umbauprozesse des Myokardgewebes kommt es zur Reduktion eines Myokardschadens bei einer folgenden akuten, kritischen Ischämie.

Im Rahmen der Reperfusion kann es neben der Protektion vor einer möglichen ischämischen Myokardnekrose auch zur Induktion weiterer Zellschädigungen kommen, die

einen zusätzlichen Zellverlust zur Folge haben, Reperfusionsschaden, *reperfusion injury*, genannt (Braunwald und Kloner, 1985). Der Reperfusionsschaden entsteht durch Änderungen der intrazellulären Elektrolytkonzentration. Im Rahmen der Ischämie steigt der Metabolismus zugunsten der anaeroben Glykolyse, das einen Anstieg der Säurebildung intrazellulär zur Folge hat. Dies führt zur Natriumüberladung infolge der Aktivierung des Na^+/H^+ -Austausches, da zur Reduktion der zellulären Azidose Wasserstoffionen im Austausch von Natriumionen nach extrazellulär transportiert werden. Bei erhöhtem Natriumgradienten über der Zellmembran werden über den Natrium/Calcium Austauscher wiederum Natrium nach extrazellulär und Calcium-Ionen nach intrazellulär transportiert. Dies führt zu einer zellulären und mitochondrialen Calciumüberladung (Murphy und Steenbergen, 2008). Die Calciumüberladung, aber auch der Anstieg der freien Radikale, aktiviert die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore, *mitochondrial permeability transition pore (mPTP)*, was wiederum mitochondriale apoptotische Signalkaskaden aktiviert (Murphy und Steenbergen, 2008). Der Postkonditionierung, intermittierende Unterbrechung der Reperfusion nach Ischämie, wird nach in *vitro* - Untersuchungen im Tiermodell ein kardioprotektiver Aspekt zugeschrieben, indem es die Infarktgröße durch die Reduktion von ROS sowie der intrazellulären Calciumkonzentration reduziert (Sun et al., 2005). Des Weiteren wird angenommen, dass sowohl bei der Prä- als auch bei der Postkonditionierung die *Survival*-Kinasen Akt und ERK1/2^{MAPK}, der sogenannte *RISK (reperfusion injury salvage kinase) Pathway*, aktiviert werden und letztendlich als gemeinsames Ziel die *mPTP* inhibieren (Hausenloy et al., 2005; Murphy und Steenbergen, 2008).

Der protektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung konnte von Bartling et al. (2003) im jungen humanen Myokardgewebe aber nicht im alternden (≥ 70 Jahre) Myokard nachgewiesen werden. Pharmakologisches Potential zur Protektion wird u.a. auch der Blockade des Na^+/H^+ Austauschsystems z.B. durch Cariporid zugesprochen (Theroux et al., 2000). In *ex vivo* Untersuchungen am alten humanen Myokard (≥ 70 Jahre) wurde im Gegensatz zu Myokard erwachsener Patienten (≤ 55 Jahre) allerdings kein protektiver Effekt von Cariporid gegen Ischämie-Reperfusionsschaden gezeigt (Simm et al., 2008). Mechanismen des Alterns scheinen daher eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen darzustellen.

1.3 Altern des Organismus

Die Lebenserwartung der Bevölkerung ist innerhalb der letzten Jahrzehnte stetig angestiegen. Allerdings wird in den westlichen Ländern hinsichtlich des modernen Lebensstils mit ständig steigender Anzahl von Patienten mit einem metabolischen Syndrom eher kein weiterer Anstieg erwartet (Olshansky et al., 2005).

Altern ist der Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität (Lakatta, 2002; Lakatta und Levy, 2003b). Inzidenz und Prävalenz chronischer vaskulärer Erkrankungen wie Hypertonie, die KHK und arteriothrombotischer Infarkt steigen mit zunehmendem Alter an (Lakatta und Levy, 2003a).

Altern ist ein multifaktorieller Prozess, bei dem die Effizienz von physiologischen Funktionen durch intra- und extrazelluläre Schäden innerhalb eines gesamten biologischen Systems sinkt (Baynes, 2000). Es existieren viele Theorien, um den Vorgang des Alterns zu erklären. Eine deterministische Theorie von Hayflick beschreibt, dass die proliferative Kapazität von teilungsfähigen Zellen genetisch festgelegt ist (Hayflick, 1965). Darauf aufbauend wird in späteren Arbeiten diskutiert, dass diese Teilungskapazität der Zellen durch die Länge der Telomere bestimmt wird, indem sich diese bei jeder Teilung verkürzen und bei Unterschreiten einer kritischen Länge die Zellen einem irreversiblen Seneszenzprogramm unterzogen werden (Allsopp et al., 1992; Hayflick, 1998).

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde mit der „The rate-of-living hypothesis“ von R. Pearl angenommen, dass die Metabolisationsrate einer Spezies die Lebenserwartung festlegt (Balaban et al., 2005). Harman formulierte 1957 dann die „Freie Radikaltheorie des Alterns“ (Harman, 2006). Diese besagt, dass Schäden durch zellulär gebildete endogene freie Radikale akkumulieren, was letztendlich zum Funktionsversagen führt. Diese „Freie Radikaltheorie“ von Harman wurde im Verlauf ständig erneuert. Bereits 1972 wird die Theorie des Alterungsprozesses durch den Einbezug der Mitochondrien, als zellulären Hauptenergielieferant, erweitert (Harman, 2001). Freie Radikale im folgenden zusammengefasst als *reactive oxygen species (ROS)* genannt, führen zum einen selbst infolge der mitochondrialen Schäden (Harman, 2001), aber auch indirekt durch die Aktivierung von Signalkaskaden zu Zellschäden (Finkel und Holbrook, 2000; Wautier et al., 2001). Eine über dem physiologischen Maß bestehende Konzentration an ROS im Organismus wird oxidativer Stress genannt. ROS werden unter regulären metabolischen Bedingungen hauptsächlich endogen während der Atmungskette im Komplex III in den Mitochondrien (Chen et al., 2003), als auch über NADPH-Oxidasen (Wautier et al., 2001) gebildet. Die endogene Bildung freier Radikale wird damit überwiegend durch die Metabolisierungsrate bestimmt (Finkel und Holbrook, 2000). Zur Vervollständigung soll

allerdings auch die exogene Bildung von ROS u.a. infolge UV-Strahlung, Hormone und Chemotherapeutika genannt werden.

1981 wurde prognostiziert, dass mit entsprechender Gewichtsreduktion bei gleichzeitiger adäquater Aufnahme von essentiellen Nährstoffen die Reaktion von ROS im Körper minimiert und damit die Lebenserwartung erhöht werden sollte (Harman, 1981). Dies geht mit der bereits erwähnten Theorie von Pearl „The rate-of-living hypothesis“ weitestgehend konform. Somit wird diskutiert, dass mit der verminderten Kalorienaufnahme, *caloric restriction*, u.a. die Erzeugung von ROS sinkt und somit die Lebenserwartung steigt (Finkel und Holbrook, 2000; Heilbronn und Ravussin, 2003; Heilbronn et al., 2006).

In der Arbeit von Lee et al. (2001) wird dargestellt, dass mit dem Alter Veränderungen in den Zellen wie Funktionsminderung der mitochondrialen Atmungskette, Reduktion der Abbaukapazität defekter Proteine, erhöhte Produktion von ROS mit infolge erhöhtem oxidativem Schaden an DNA, Proteinen und Lipiden auftreten. Die Balance zwischen der Bildung von ROS und der Aktivität enzymatischer antioxidativer Systeme wie der Katalase, Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase, aber auch nicht-enzymatischer Systeme wie Glutathion und Vitamin A, C und E bestimmt das Ausmaß von oxidativem Stress auf die Zelle (Fu et al., 1996; Finkel und Holbrook, 2000).

Mit steigender ROS Produktion und sinkender Kapazität von antioxidativen sowie Reparatur-Systemen wird der oxidative Schaden an Geweben erhöht und damit der Alterungsprozess beschleunigt (Lee und Wei, 2001). Dies führt kumulativ zu Dysfunktionen und zum Tod der Zelle sowie in Folge zu chronischen Krankheiten (Baynes, 2000) und letztendlich Tod des Organismus (Rensing L, 2004).

Neben ROS spielt die Glykierung von Proteinen mit der Entstehung von AGEs, *Advanced glycation end-products* oder ALEs, *Advanced lipoxidation end-products* eine wichtige Rolle beim altersbedingten Funktionsverlust von Geweben.

1.4 *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) / Maillard-Reaktion

1.4.1 Entstehung von AGEs

AGEs sind Endprodukte von nicht-enzymatischen Glykierungsreaktionen (Nawroth et al., 1999). Der französische Chemiker Louis Camille Maillard (1878 – 1936) berichtete 1912 über die Bildung von gelbbraunen Pigmenten beim Erhitzen von Glucose mit Glycin. Diese Reaktion, auch Bräunungsreaktion, wird nach dem Erstentdecker Maillard-Reaktion (Maillard, 1912; Ledl, 1990) genannt (siehe Abb. 2). AGEs entstehen nicht-enzymatisch durch die Reaktion von reduzierenden Zuckern und anderen Carbonylbindungen mit reaktiven Aminogruppen von Proteinen, Lipiden und Aminosäuren.

Initial lagert sich ein Carbonylrest des Zuckers an eine Aminogruppe an. Mit der Abspaltung eines Wassermoleküls entsteht das Schiff'sche Base Addukt. Diese lagern sich in kurzer Zeit in die wesentlich stabileren Amadori-Produkte um. Ein Beispiel für die klinische Relevanz ist unter anderem HbA_{1c}, ein Glucose-Amadori Produkt am terminalen Stickstoff von Valin (Koenig et al., 1977). Der Wert spiegelt die Blutzuckerwerte der letzten sechs bis acht Wochen wieder und ist aus der Diagnostik des Diabetes Mellitus nicht mehr wegzudenken.

Abgesehen davon können AGEs auch aus reaktiven Dicarbonylen entstehen. Dicarbonylintermediate, α -Oxoaldehyde wie Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Deoxy-glucoson treten als Zwischenprodukte durch Metall-katalysierte Autoxidation von Glucose (Wells-Knecht et al., 1995), dem sogenannten Wolff *pathway* (Wolff und Dean, 1987), auf und können ebenfalls zur weiteren Bildung von AGEs beitragen (Nawroth et al., 1999). Ein weiterer Bildungsweg für Intermediärprodukte in Form von reaktiven Dialdehyden wie Glyoxal und Methylglyoxal durch Abspaltungsreaktionen aus der Schiff'schen Base ist der Namiki *Pathway* (Hayashi, 1986; Glomb und Monnier, 1995; Ferreira et al., 2003). Amadoriprodukte können durch komplexe Reaktionen, dem so genannten Hodge Pathway, unter anderem mittels Oxidations- und Kondensationsreaktionen in Dicarbonyle umgebaut werden (Hodge, 1953; Thorpe und Baynes, 2003).

Durch weitere Reaktionen der Amadori-Produkte bzw. reaktiven Dicarbonyle mit Aminogruppen entstehen irreversible AGEs. Infolge umfassender Umlagerungsprozesse und Polymerisation entstehen Quervernetzungen, so genannte *cross-links*, der AGEs mit weiteren Proteinen (Ulrich und Cerami, 2001). Abhängig ist die AGE – Bildung vom modifizierten Zielprotein, Zeit und der Glucosekonzentration (Bierhaus et al., 1998).

Neben den vorbeschriebenen endogenen Bildungswegen können AGEs auch exogen während der Lebensmittelverarbeitung, insbesondere durch deren Erhitzen, entstehen (Vlassara und Uribarri, 2004). Sie sind wichtig für den typischen Geschmack und die braune Farbe. Nach Proteolyse der einzelnen Nahrungsmittel-Proteine werden diese vermutlich als niedermolekuläre Verbindungen intestinal aufgenommen, wobei die Transportmechanismen noch weitestgehend unbekannt sind. Die Studie von Grunwald et al. (2006) gibt einen Hinweis darauf, dass der geringe transepithelial – gemessene Fluss von Nahrungsmittel-AGE wahrscheinlich durch Diffusion hervorgerufen wird. Kontrovers bleiben allerdings vorerst deren pathophysiologischen Einwirkungen, insbesondere hinsichtlich der Toxizität, im biologischen System (Chuyen, 2006).

Allein der reguläre Alterungsprozess führt zum Anstieg der AGEs im Gewebe. Schädigende Effekte von AGE auf Gewebe sind folgende: veränderte Proteinfunktion im Rahmen der Modifikation, Versteifung von Gewebe durch *crosslinking*, Induktion der Bildung von Radikalen und die Induktion von phlogistischen Reaktionen nach der Bindung an spezifische AGE Rezeptoren für AGEs wie z.B. RAGE (Nass et al., 2007). Die Bildung von AGE

Quervernetzungen im Kollagen der extrazellulären Matrix (EZM) bewirkt einen Verlust an Elastizität, was zu Funktionseinschränkungen der Gewebe führt. Diese Kollagenmodifikationen führen z.B. zur myokardialen Versteifung und diastolischen Funktionsstörung (Badenhorst et al., 2003).

AGEs sind eine heterogene Gruppe, die man in fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Modifikationen unterteilt. Nε-(Carboxymethyl-) Lysin (CML; siehe Abb. 1) ist eines der meist untersuchten nicht-fluoreszierenden AGE-Produkte (Glomb und Monnier, 1995), die als die häufigste *in vivo* Protein-Modifikation (AGE) gilt (Kislinger et al., 1999). Weitere wichtige AGEs sind u.a. Nε-carboxyethyl-lysine, CEL sowie Pentosidin und Lysin-Dimere. CML wird als Fruktoselysin-Spaltprodukt bei der Glykierung von Proteinen unter oxidativen Bedingungen und aus Glyoxal gebildet, das bei der Autoxidation von Glucose anfällt (Fu et al., 1994; Nawroth et al., 1999). Daneben ist es ein Produkt der Lipidperoxidation (Fu et al., 1996).

CML wurde bereits in vielen humanen Geweben nachgewiesen. So konnte in der Arbeit von Dunn et al. (1991) gezeigt werden, dass die CML – Konzentration in der Haut mit dem Alter ansteigt. Auch in der diabetischen Retinopathie (Hammes et al., 1999) sowie bei diabetischer Nephropathie (Suzuki et al., 1999) konnte eine erhöhte Menge an CML nachgewiesen werden.

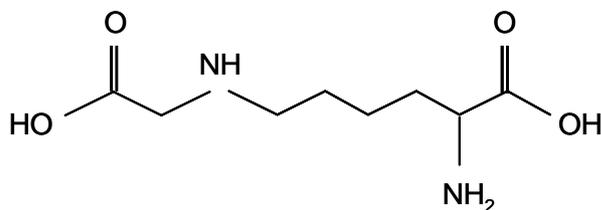


Abb. 1 Nε-(Carboxymethyl-) Lysin (CML), (Nass et al., 2007)

1.4.2 Signaltransduktion durch die Bindung von AGEs an Rezeptoren

AGEs können nicht durch Enzyme gespalten werden. In den letzten Jahren identifizierte man AGE-Rezeptoren, die AGE-modifizierte Proteine *in vivo* binden. Bindungsproteine wie AGE-R1 (OST-48), die Oligosaccharyltransferase, AGE-R2 (80K-H), AGE-R3 (Galectin-3) sowie CD36 und *scavenger receptors* IIa und b wurden beschrieben (Nass et al., 2007).

Der bekannteste Rezeptor für advanced glycation endproducts, RAGE, ist ein transmembranärer Multiligandrezeptor der Immunglobulin Superfamilie (Barlovic et al., 2011).

Neben AGEs gelten als weitere Liganden unter anderem Amyloid- β Peptide (Yan, 1997) sowie S100/Calgranulins (Hofmann et al., 1999) und Amphoterin (Hori et al., 1995).

Die Bindung von AGEs an diese zellulären Rezeptoren induziert, durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase, die Bildung von ROS und infolge Entstehung von intrazellulärem oxidativen Stress (Yan et al., 1994; Nawroth et al., 1999; Wautier et al., 2001). Mit der Liganden - RAGE - Bindung werden in einigen Zellpopulationen weitere zelluläre Signalkaskaden u.a. ERK1/2^{MAPK}, p38^{MAPK}, JAK/STAT-Kinase sowie Phosphoinositol-3-Kinase aktiviert (Bierhaus et al., 2005). Die intrazelluläre Signaltransduktion über ERK1/2^{MAPK} spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Proliferation und Zelldifferenzierung (Hunter, 1995; Marshall, 1995). Auch die p38^{MAPK}, aktiviert von einer Vielzahl von zellulären Stressoren u.a. Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Lipopolysacchariden und UV-Strahlung (Raingeaud et al., 1995; Yang, 1999; Yang et al., 1999) kann Apoptose induzieren (Xia et al., 1995).

Die erhöhte Bildung von ROS bewirkt letztendlich die Aktivierung von NF- κ B (Yan et al., 1994). Nach Phosphorylierung und proteolytischer Degradierung des Inhibitormoleküles I κ B gelangt das freie NF- κ B über Translokation in den Zellkern und bewirkt die NF- κ B - abhängige Genexpression mit infolge Bildung pro-inflammatorischer sowie pro-thrombotischer Mediatoren, u.a. Zytokine, Endothelin – 1, Chemokine und endotheliale Adhäsionsmoleküle (Barnes und Karin, 1997). Andererseits führt die anhaltende Aktivierung von NF- κ B selbst im Sinne eines positiven Feedback zur Hochregulierung von RAGE (Bierhaus et al., 2005).

RAGE wurde ebenfalls als zirkulierende Form, *soluble* RAGE (sRAGE), im Plasma entdeckt. In dieser Form konkurriert es um die Bindung zirkulierender AGEs und scheint damit eine antagonistische Rolle zu RAGE einzunehmen (Wautier et al., 1996).

Bereits 1998 konnte von Park et al. (1998) im Mausmodell gezeigt werden, dass dosisabhängig zugeführtes sRAGE die diabetische Atherosklerose supprimiert. In humanen Studien konnte demonstriert werden, dass zwischen der sRAGE Konzentration im Plasma und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen wie Atherosklerose (Koyama et al., 2005; Lindsey et al., 2009b) und akuten ischämischen Insulten (Park et al., 2009) eine inverse Assoziation besteht. Es wird daher diskutiert, dass sRAGE ein brauchbarer Biomarker zur Prognostik von kardiovaskulären Erkrankungen darstellen kann (Lindsey et al., 2009b).

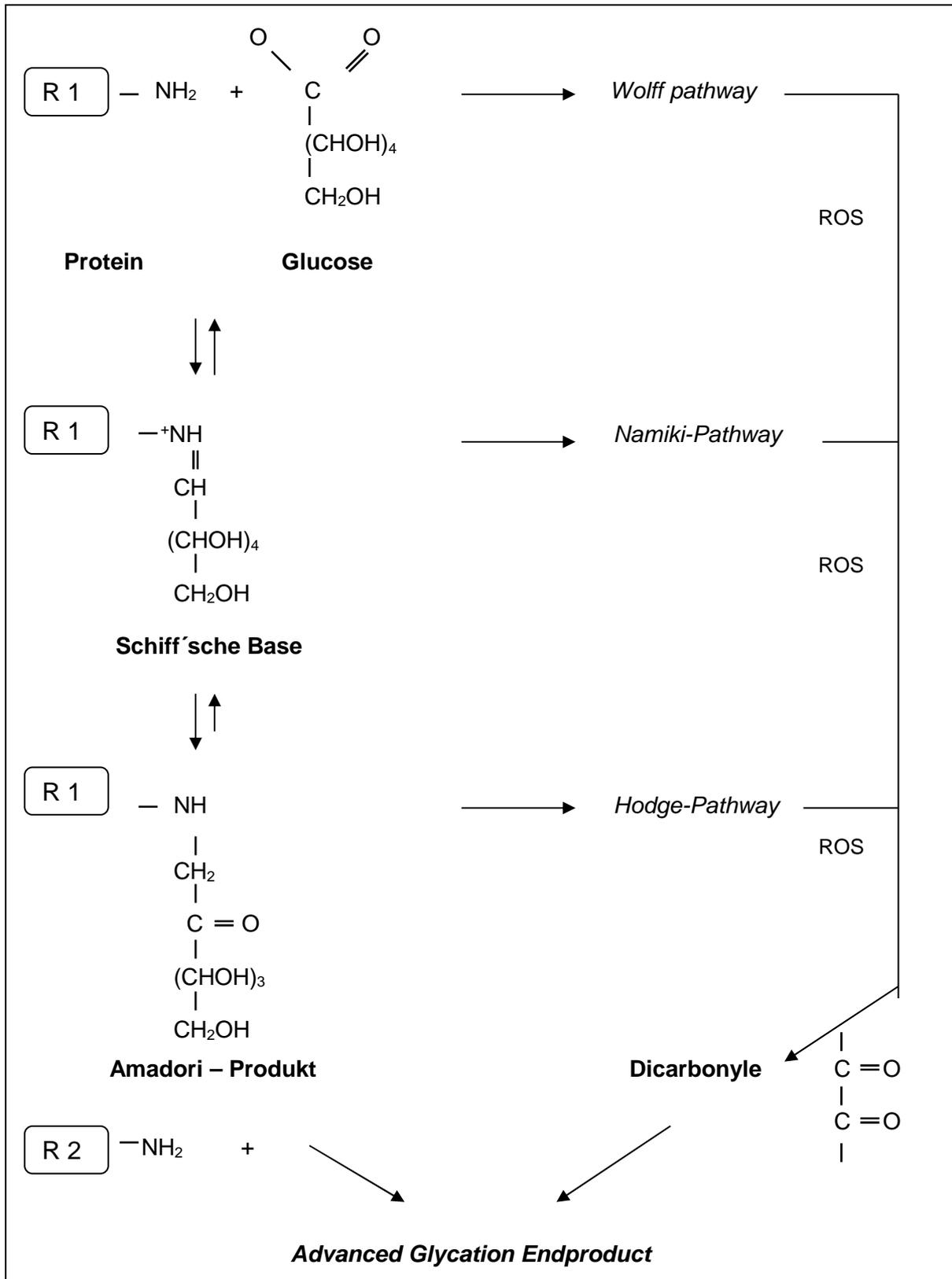


Abb. 2 Bildung von AGEs in der Maillard-Reaktion:
 Reduzierende Zucker (z.B. Glucose) reagieren mit einer freien Aminogruppe von Makromolekülen in einer nicht-enzymatischen Glykierungsreaktion. Die dabei entstandene Schiff'sche Base lagert sich zu stabileren Amadori-Produkten um. Dicarbonyle und ROS können aus den verschiedenen Zwischenprodukten entstehen. Dicarbonyle und Amadori-Produkte reagieren mit Aminogruppen von Proteinen bzw. Lipiden und bilden AGEs aus. Diese können sich zu irreversiblen AGE Quervernetzungen zusammenlagern. Modifiziert nach Nawroth et al. und Khalifah et al. (Khalifah et al., 1999; Nawroth et al., 1999).

1.4.3 Einfluss von AGEs auf das Altern und die Entstehung von Krankheiten

AGE Quervernetzungen führen über die Ausbildung von Modifikationen zu Geweb dysfunktionen und somit zu diversen Erkrankungen wie kardiovaskuläre Krankheiten u.a. Atherosklerose, Diabetes Mellitus und dessen Spätfolgen, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson (Baynes und Thorpe, 1999; Nawroth et al., 1999; Baynes und Thorpe, 2000). Chronische Erkrankungen und Entzündungsprozesse beschleunigen den biologischen Alterungsprozess und haben somit Einfluss auf die Lebenserwartung (Baynes, 2000).

Im Rahmen der Entstehung von AGEs lässt sich bereits vermuten, dass bei Diabetikern die AGE – Bildung höher ist als bei gesunden Individuen. In der Arbeit von Schleicher et al. (1997) wurde dies bestätigt. Außerdem ist Fruktose, von Diabetikern meist als Glucoseersatz eingesetzt, reaktiver als Glucose selbst. Bei Diabetikern konnten AGE–Akkumulationen (CML) immunhistochemisch in Haut, Lunge, Herz, Niere, Bandscheiben sowie Knochen, Darm und Arterien in höherem Maße als bei Nicht-Diabetikern nachgewiesen werden (Schleicher et al., 1997). Andererseits akkumulieren AGEs im Alter ohne Auftreten von Erkrankungen. So konnte durch Simm et al. (2007) eine altersabhängige CML-Akkumulation in Perikardflüssigkeit aufgezeigt werden. Aber auch im humanem Knorpelgewebe wurde altersabhängig ein Anstieg von AGE-Akkumulationen nachgewiesen (Verzijl et al., 2000).

Insbesondere Makrophagen und Monozyten können AGE-modifizierte Proteine mit ihrem spezifischen Rezeptorsystem binden und aufnehmen (Yang et al., 1991). Intrazellulär werden diese dann degradiert. Entstandene AGE-Peptide aber auch AGEs können anschließend renal eliminiert werden. Diabetiker mit Nephropathie haben neben der erhöhten AGE-Bildung eine verminderte Nierenfunktion und infolge eine reduzierte AGE – Clearance, so dass als Konsequenz bei Patienten mit Nephropathie wesentlich höhere AGE-Akkumulationen im Blut nachgewiesen werden konnten (Makita et al., 1991). Die diabetische Nephropathie kann sich im Verlauf bis zur terminalen Niereninsuffizienz entwickeln, die letztendlich eine therapeutische Hämodialyse erfordert. Auch die renale Ausscheidung von Nahrungsmittel-AGE, die intestinal resorbiert werden, wird bei diabetischer Nephropathie supprimiert, so dass vermutet wird, dass mit Reduktion der exogenen Zufuhr von AGE die Prognose insgesamt betrachtet verbessert werden kann (Koschinsky et al., 1997). Dies konnte in der Arbeit von Uribarri et al. (2003) bestätigt werden

Diabetische vaskuläre Folgen unterteilt man in eine Makroangiopathie und diabetes-spezifische Mikroangiopathie. Zur Makroangiopathie zählt die Atherosklerose der peripheren als auch der cerebralen Arterien, mikroangiopathische Folgen von Diabetes sind u.a. die Nephropathie infolge der Verdickung der kapillären Basalmembran, Retinopathie und

Neuropathie (Vlassara und Palace, 2002). In einem diabetischen apoE-Knockout- Maus-Modell wurde nachgewiesen, dass in diabetischen Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen eine signifikant höhere Menge an atherosklerösen, fibrösen Plaques in allen Segmenten der Aorta besteht (Candido et al., 2002). Eine konsequente Therapie des Diabetes Mellitus verringert infolge der reduzierten Glucosekonzentration die Bildung von AGEs und α -Oxoaldehyden (Lapolla et al., 2005).

1.4.4 Therapieansätze bei AGE – induzierten Erkrankungen

Es wird diskutiert dass AGEs an der Bildung von zahlreichen Krankheiten beteiligt sind. Therapeutische Ziele sind daher zum einen die Reduktion der AGE Bildung, aber zum anderen auch das Aufbrechen von bereits gebildeten AGE induzierten Quervernetzungen von Proteinen. Im Tiermodell wurde durch die Behandlung mit ALT – 711, einem sogenannten AGE - *cross-link-breaker*, die Diabetes – induzierte Akkumulation von Kollagen sowie die aortale Versteifung und myokardiale Dysfunktion reduziert (Wolffenbuttel et al., 1998; Candido et al., 2003; Liu et al., 2003). Vielversprechende Substanzen zur Inhibierung der AGE-Bildung sind bisher Aminoguanidin bzw. Pyridoxamin. In Tierstudien konnte auch hier gezeigt werden, dass unter der Therapie mit vorgenannten Substanzen sowohl die Gefäßwandversteifung als auch die myokardiale Dysfunktion als Komplikationen von Diabetes verbessert werden konnten (Chang et al., 2006). Die Hemmung der Interaktion zwischen AGE und RAGE durch die Überexpression von sRAGE ist ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt für die Zukunft.

1.5 Glyoxal – Entstehung, Wirkung und Entgiftung

Glyoxal ist ein reaktives α -Oxoaldehyd, dass wie oben beschrieben auf verschiedenen Wegen wie der metall-katalysierten Autoxidation von Glucose, Abbau von glykierten Proteinen wie Fruktosamin sowie der Lipidperoxidation entsteht (Wells-Knecht et al., 1995; Thornalley et al., 1999).

Bei der Reaktion von Glyoxal mit Proteinen werden kovalente Bindungen mit freien Aminogruppen von Biomolekülen durch eine nicht-enzymatische Reaktion, die Glykierung, gebildet (Kasper et al., 2000; Thornalley, 2002). Dabei entstehen mit Argininen z.B. Imidazolformationen, bei der Reaktion von Glyoxal mit Lysin kommt es zur Bildung von N-(Carboxymethyl)lysine, CML (Thornalley et al., 1999).

Wie in der Arbeit von Shangari et al. (2003) erwähnt (bezogen auf die Arbeit der *International Agency for Research on Cancer* (1991)) sind Glyoxal wie auch Methylglyoxal nicht als Karzinogene klassifiziert. Glyoxal kann allerdings mutagen wirken, indem es die Basen der

DNA modifiziert und so die Mutationen der DNA induziert, die insbesondere auf einen Austausch einzelner Basen basieren und DNA-Replikationen reduzieren (Thornalley, 2008). In der Arbeit von Shangari wird weiter angenommen, dass Dicarbonyle antioxidative Zellsysteme u.a. durch Hemmung der Glutathionreduktase sowie Aldehydreduktase und Aldehyddehydrogenase, beeinträchtigen, was mit einem erhöhten Zellschaden einhergeht. Glyoxal selbst kann zytotoxisch wirken, indem es die GSH - Konzentration senkt und die ROS Produktion anregt, aber auch das Membranpotential der Mitochondrien reduziert (Shangari et al., 2003; Shangari und O'Brien, 2004). Man geht unter anderem davon aus, dass mitochondriale Proteine Hauptzielort für die Glykierung von Dicarbonylen sind und mit dem gesetzten Schaden am mitochondrialen Proteom die Bildung von ROS und oxidativen Stress forciert wird (Rabbani und Thornalley, 2008).

Die Entgiftung von reaktiven α -Oxoaldehyden erfolgt durch das zytosolische glutathionabhängige Glyoxalase System (siehe Abb. 3). Dieses beinhaltet 2 Enzyme, Glyoxalase I und II sowie als Katalysator Glutathion, GSH (Thornalley, 2003; Kuhla et al., 2005; Rabbani und Thornalley, 2008). Die Glyoxalase I - Aktivität ist abhängig von der GSH - Konzentration (Abordo et al., 1999). Nach spontaner Bindung von GSH und einem α -Oxoaldehyd wird das Reaktionsprodukt Hemithioacetal von der Glyoxalase I katalytisch in ein S-2-Hydroxacylglutathione-Derivat isomerisiert, um dann durch die Glyoxalase II in α -Hydroxysäuren umgebaut und Glutathion zurückgebildet zu werden (Thornalley, 1998, 2003). Aus Glyoxal entsteht die Hydroxyessigsäure, die über den Urin ausgeschieden wird (Thornalley, 1990, 2008). Unter physiologischen Bedingungen des Zellmetabolismus wird Glyoxal durch das Glyoxalasesystem unschädlich gemacht (Abordo et al., 1999).

Mit Einwirkung von oxidativem Stress und folgender Verminderung der zellulären GSH - Konzentration und damit Glyoxalase I - Aktivität wird die Entgiftung der Glyoxale vermindert was im Umkehrschluss zur Erhöhung der Konzentrationen von Glyoxal und Methylglyoxal und Potenzierung der AGE-Bildung führt (Thornalley, 1998, 2003). Bei Patienten mit Alzheimer Krankheit konnte eine Hochregulierung der Glyoxalase I bei vermehrter AGE-Bildung nachgewiesen werden, wahrscheinlich um gerade die erhöhten Konzentrationen an Glyoxal und Methylglyoxal zu vermeiden (Kuhla et al., 2005). Das Glyoxalasesystem ist somit ein effizientes Entgiftungssystem. Andererseits ist gerade bei malignen Neoplasien die zytotoxische Wirkung der Oxoaldehyde erwünscht, um Tumorzellen zu reduzieren. Mit der Supprimierung von Glyoxalase I kann dieser Effekt durch Akkumulation von Glyoxal und Methylglyoxal bewirkt werden. Ein beschriebener Glyoxalase I Inhibitor mit anti - cancerogener Wirkung ist S-p-bromobenzylglutathion (Thornalley et al., 1996).

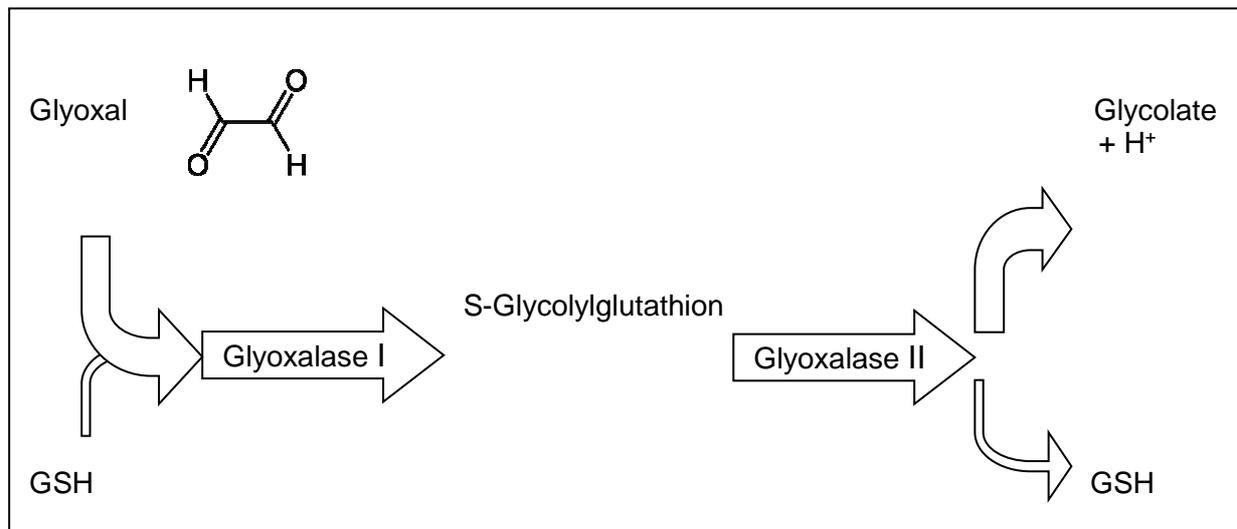


Abb. 3 Glyoxalasesystem – Entgiftung von α -Oxoaldehyden

Spontane Bindung von GSH und α -Oxoaldehyd. Das gebildete Hemithioacetal wird katalytisch durch die Glyoxalase I in ein S-2-Hydroxacylglutathione-Derivat isomerisiert. Glyoxalase II katalysiert die Hydrolyse in α -Hydroxysäuren und Glutathion. Modifiziert nach (Rabbani und Thornalley, 2008)

1.6 Zielsetzung

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation von Myokard mit sehr hohen Konzentrationen von Glyoxal im Ischämie-Reperusionsversuch im Organbad eine zytotoxische Reaktion ausgelöst wurde.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Prüfung der Konzentrationsabhängigkeit der Glyoxalwirkung auf die Kontraktionskraft von humanem Myokardgewebe von Patienten unterschiedlichen Alters. Eine potentielle physiologische / patho-physiologische Wirkung von Glyoxal sollte bezüglich der AGE-Bildung und der Wirkung auf intrazelluläre Kinasen analysiert werden.

Zum Schluss dieser Arbeit bestand die Frage, ob die an humanem Myokard gewonnenen Erkenntnisse auch auf *in vitro* Kardiomyozyten Zellkulturmodelle der Ratte übertragen werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Kits

Acrylamid/Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Amido Black	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA, Heidelberg
Ascorbinsäure	Roth, Karlsruhe
β – Mercaptoethanol	Fluka, Steinheim
BCA TM Protein Assay-Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Carbogen	Linde, Unterschleißheim
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
3-(Cyclohexylamino)-1-propan-sulfonsäure (CAPS)	AppliChem, Darmstadt
Carnitin	Sigma, Steinheim
Cholinchlorid \geq 98%	Sigma, Steinheim
Coomassie Brilliant Blau G 250	Bio-Rad, München
Creatin	Sigma, Steinheim
Cytosine, β -D-arabinofuronoside hydrochlorid	Sigma, Steinheim
<i>CytoTox-oneTM Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit</i>	Promega, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol 70%	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	PB Perbio, Bonn
Glucose	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Glyoxal – Lösung (40% in H ₂ O)	Aldrich, Steinheim
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid (KCL)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Luminol	Sigma, Deisenhofen

<i>Magic MarkTM XP Western Standard</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Medium 199	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
3-Mercaptopropionsäure	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Fluka, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat (NaVO ₃)	Sigma, Steinheim
Nonidet P 40	Appllichem, Darmstadt
Okadainsäure	Merk-Calbiochem., Darmstadt
p-Cumarsäure	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Page RulerTM Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Protease Inhibitor Mix	Sigma, Deisenhofen
Stickstoff	Linde, Unterschleißheim
Taurine	Sigma, Steinheim
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Appllichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Fluka, Seelze

2.2 Verwendete Puffer und Lösungen

Lösungen im Organbadversuch

Tyrodellösung nach Essen und Münster

1. Stammlösung
 - 2,25 M $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 - 1,05 M $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
 - 2,99 M NaCl
 - 0,134 M KCl
 - ad 1 l *aqua bidest*
2. Stammlösung
 - 0,595 M NaHCO_3
 - ad 1 l *aqua bidest*
3. Stammlösung
 - 0,042 M NaH_2PO_4
 - ad 500 ml *aqua bidest*

Tyrode-Gebrauchslösung mit Glucose

40 ml 1. Stammlösung
 38 ml 2. Stammlösung
 10 ml 3. Stammlösung
 5,4 mM Glucose
 0,28 mM Ascorbinsäure
 0,06 mM EDTA
 ad 1 l *aqua bidest* (pH 7,4)
 Begasung mit Carbogen

Tyrode-Gebrauchslösung ohne Glucose

40 ml 1. Stammlösung
 38 ml 2. Stammlösung
 10 ml 3. Stammlösung
 7,2 mM Cholinchlorid
 0,28 mM Ascorbinsäure
 0,06 mM EDTA
 ad 1l *aqua bidest*
 Begasung mit N_2

Tab. 1 Herstellung der Glyoxallösungen in Abhängigkeit von der Endkonzentration

Das Volumen der Tyrode zur Herstellung der Glyoxallösung wurde entsprechend des Versuchabschnittes entnommen, das heißt während der Ischämie wurde die glucosefreie Tyrode verwendet, in der Äquilibration, der Präinkubation und der Reperfusion die Tyrode mit Glucose.

Gesamtvolumen 1 ml		Glyoxal als Stammlösung	Organbadkonzentration (100 µl Glyoxalstamm-lösung ad 10 ml Tyrode)
Volumen [µl] Tyrode	Volumen [µl] Glyoxal 6,892 M		
985,50	14,50	100 mM	1,0 mM
996,65	4,35	30 mM	0,3 mM
998,55	1,45	10 mM	0,1 mM
999,57	0,43	3 mM	0,03 mM
999,85	0,15	1 mM	0,01 mM

Puffer zur Proteinpräparation für die Western – Blot AnalyseLysepuffer

50 mM Tris/HCl, pH 6,7

2% SDS

1 mM Na₃VO₄2 x SDS Probenpuffer

20 % Glycerin

10 % Mercaptoethanol

2 mM Na-EDTA

4 % SDS

250 mM Tris HCL, pH 6,8

0,01 % Bromphenolblau

Puffer zur SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese in der Western – Blot AnalyseSammelgelpuffer (pH 6,8)

1,0 M Tris-HCL

in *aqua bidest*Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,5 M Tris-HCL

in *aqua bidest*10 x Laufpuffer (pH 8,6)

250 mM Tris-HCl, pH 8,6

2 M Glycine

50 mM SDS

Puffer und Lösungen zum elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Membran in der Western – Blot AnalyseCAPS-Blotpuffer (pH 10)

50mM CAPS

1 mM 3-Mercaptopropionsäure

10% Methanol

in *aqua bidest*

Blockierungslösung

50mM Tris-HCl, pH 7,5
150mM NaCl
0,2 % NP 40
2 % BSA

Waschlösung (pH 7,5)

50 mM TRIS –HCL
500 mM NaCl
0,2 % NP 40
0,5% BSA

Tris - Stripping Puffer

62,5 mM Tris, pH 6,8
2 % SDS
100 mM β -Mercaptoethanol

Lösungen zur Proteindetektion in der Western – Blot AnalyseLuminollösung

250 mM Luminol (in DMSO gelöst)
90 mM p-Cumarsäure in DMSO gelöst
ad. 50 ml mit 0,1 M Tris-HCL (pH 8,5)

H₂O₂-Lösung für Chemolumineszenz

5,4 mM H₂O₂ in 0,1 M Tris-HCL, pH 8,5

Luminolgebrauchslösung

Luminollösung und H₂O₂-lösung 1:1 mischen

Lösungen zur Gel – und Membranfärbung in der Western – Blot AnalyseAmido Black - Färbelösung

1 g Amido Black
ad 100 ml *aqua bidest*

Coomassie Brilliant Blau G-250-Färbelösung

0,1 % Coomassie G-250
45 % Methanol
10 % Eisessig
in *aqua* bidest

Entfärber-Lösung nach Coomassie Brilliant Blau Färbung

50 % Methanol
10 % Eisessig
in *aqua* bidest

Lösungen und Puffer in der ZellkulturEarle – Salzlösung (pH 7,5)

116 mM NaCl
5,4 mM KCl
0,8 mM NaH₂PO₄
5,5 mM Glucose
20 mM Tris / HCl
130 µM Phenolrot

Inkubationspuffer (pH 7,4)

110 mM NaCl
2,6 mM KCl
1,2 mM NaH₂PO₄
1,2 mM MgSO₄
25 mM NaHCO₃
11 mM Glucose

M199 Komplettmedium (für Myozytenkultur)

5 mM Taurin
5 mM Creatine
2 mM Carnitine
10 µM Cytosine-β-D-Arabinofuranosid
in M199

Krebs- Ringer- HEPES Puffer (KRH Puffer)

115 mM NaCl
 5 mM KCl
 1mM CaCl₂
 1 mM KH₂PO₄
 1,2 mM MgSO₄
 25 mM HEPES (pH 6,2 oder pH 7,4)

1x PBS (pH 7,4)

137 mM NaCl
 2,7 mM KCL
 10 mM Na₂HPO₄ wasserfrei
 1,5 mM KH₂PO₄
 in *aqua bidest*

2.3 Geräte, sonstige Materialien und Software

Blot-Apparatur <i>Trans – Blot SD Transfer Cell</i>	Bio-Rad, München
Blot – Papier	Whatman, Dassel
Brutschrank HERA Cell	Heraeus, Hanau
Certomat [®] H (Schüttelinkubator)	Brau Biotech International, Melsungen
Dispenser 5 / 10 / 25 / 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Doppelwandorganbäder	Eigenproduktion
Dot-Blot Apparatur: <i>Minifold Spot-Bloteinheit</i>	Schleicher & Schuell (Düren)
ELISA-Reader FLUOstar OPTIMA	
Mikroplatten <i>Reader</i>	BMG Labtechnologies, Offenburg
Hypoxie Schrank: Invivo 400	IUL Instruments, Königswinter
LAS-3000 <i>Imaging System</i>	Raytest, Straubenhardt
Magnetrührer IKAMAG [®] REO	IKA Labortechnik, Staufen
<i>Mini-Protean[®] 2-D Electrophoresis Cell</i> (Gelelektrophorese-Kammer)	Bio-Rad, München
Multipipetten plus	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel
Pipettenspitzen epT.I.P.S.,	Eppendorf, Hamburg
PH-Meter	WTW, Weilheim

<i>Power Pac</i> 200 (Spannungsquelle)	Bio-Rad, München
Präzisionswaage BP 210 S	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage TE 1502 S	Sartorius, Göttingen
Probenschüttler KS 250 <i>basic</i>	IKA Labortechnik, Staufen
Probenschüttler, Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Reinstwasseranlage Milli-Qplus PF	Millipore, Eschborn
Sterilbank HERAsafe®	Heraeus, Hanau
Stimulator 215/II	Hugo Sachs Elektrotechnik Harvard Apparatus GmbH, March Hugstetten
Schreiber Servorec 460	Gossen Metrawatt, Nürnberg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermostat	LAUDA, Lauda-Königshofen
<i>Tube</i> (Reaktionsgefäße)	Laborfachhandel Schubert, Leipzig
Ultraschall-Gerät	Sonorex Digital 10 P, Bandelin electronic GmbH, Berlin
Verstärker Servomed	HELLIGE, Freiburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY USA
Wasserbad <i>ecoline</i>	LAUDA, Lauda-Königshofen
Wegaufnehmer/Transducer	Eigenproduktion
Zellkulturplatten 6-well	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge Biofuge fresco	Hereaus Instruments, Hanau
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
<i>Casy</i> ® <i>Cell Counter</i> System	Schärfe System GmbH, Reutlingen

Software

AIDA 3.5 Software	Raytest, Straubenhardt
MS Excel	Microsoft, USA

2.4 Menschliches Herzohrgewebe

Für die Untersuchungen wurde humanes Myokard des rechten Vorhofes verwendet. Das verwendete Herzohr ist das morphologische Pendant des rechten Vorhofes, welches während des kardiochirurgischen Eingriffes bei Anschluss der Herz-Lungenmaschine entfernt wird. Dies ist eine Notwendigkeit zur Kanülierung der Vena cavae und damit zum Anschluss der extrakorporalen Zirkulation.

Das Vorbestehen der koronaren Herzkrankheit war Voraussetzung für die Aufnahme in das zu untersuchende Patientengut. Insgesamt wurden 63 Herzohren von den Patienten, davon 48 männlich und 15 weiblich in die Untersuchungen einbezogen. Alle Gewebeproben stammen aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Patienten wurden vor der Operation ausführlich und ordnungsgemäß über den Zweck der Verwendung der Proben durch ein Aufklärungsgespräch und einen Informationsbogen informiert. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten über die Verwendung der Proben zu Forschungszwecken liegt vor. Bei Ablehnung durch den Patienten wurde das entfernte Material verworfen. Dieses Prozedere wurde durch ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bewilligt.

Die Gewebeproben wurden bezüglich des Alters in zwei Gruppen unterteilt (siehe Tab. 2): Erwachsene (≤ 60 Jahre, mittleres Alter: $53,7 \pm 1,3$; $n= 20$) sowie Senioren (≥ 70 Jahre, mittleres Alter: $74,1 \pm 0,6$; $n= 43$). Die Erwachsenen und Senioren wurden aufgrund einer bestehenden Koronaren Herzkrankheit (KHK) operativ zur Revaskularisierung mit einem Aorto-Coronaren-Bypass versorgt. Der Schweregrad der KHK wurde nach den Richtlinien der New York Heart Association (NYHA) eingeteilt. Der Mittelwert ergab sowohl für die Gruppe der Erwachsenen, als auch für die Gruppe der Senioren ein Stadium von II (eingeschränkte Leistungsfähigkeit ab einer mittelschweren körperlichen Belastung).

Tab. 2 Übersicht über präoperative, klinische Angaben der Gruppe der Erwachsenen (≤ 60) und der Gruppe der Senioren (≥ 70)

Es sind jeweils die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Der p-Wert wird für die Datenpaare (Kontrollen vs. Glyoxal) angegeben.

	Patienten	Anzahl	männlich (%)	weiblich (%)	Durchschnittsalter	NYHA	CCS - Klassifikation	Ejektionsfraktion (%)	ZVD (mmHg)	MAD (mmHg)	Herzfrequenz
≤ 60	Kontrollen	10	85	15	54,3 +/- 1,2	1,9 +/- 0,2	2,4 +/- 0,2	68 +/- 3	7 +/- 1	81 +/- 5	65 +/- 5
	keine Angaben				-	-	-	3	2	2	2
	Glyoxal	10			53 +/- 2,4	2,3 +/- 0,2	2,3 +/- 0,2	53 +/- 7	6 +/- 1	85 +/- 3	78 +/- 6
	keine Angaben				-	-	-	1	1	1	1
	p - Wert					> 0,05					
≥ 70	Kontrollen	10	72	28	73,7 +/- 1	2 +/- 0,3	2,1 +/- 0,2	61 +/- 5	6 +/- 1	78 +/- 9	65 +/- 5
	keine Angaben				-	-	1	2	3	3	5
	Glyoxal	33			74,2 +/- 0,7	2,5 +/- 0,1	2,4 +/- 0,1	57 +/- 3	7 +/- 1	82 +/- 5	75 +/- 4
	keine Angaben				-	6	8	7	12	11	16
	p-Wert					> 0,05					
p-Wert (≤ 60 vs. ≥ 70)					$\leq 0,001$	> 0,05					

2.5 Organbadversuch

2.5.1 Präparation der Vorhoftrabekel

Einschlusskriterium für die Durchführung eines Versuches mit Patientenmaterial war die bestehende KHK sowie wie bereits beschrieben das entsprechende Alter.

Die intraoperativ gewonnenen Herzohren des rechten Atriums wurden unmittelbar nach Entnahme in oxygenierte Tyrodelösung gegeben und im Labor weiter mit Carbogen begast. Der Versuchsbeginn erfolgte max. 1 h nach Entnahme des Myokardgewebes.

Die Vorhoftrabekel wurden in oxygenierter Tyrodelösung bei Raumtemperatur vorsichtig, unter Vermeidung von Zug und anderen Scherkräften und unter Erhaltung des den Trabekel bedeckenden Endokards, präpariert. Zur Präparation wurden die Präparate mit Nadeln fixiert.

2.5.2 Versuchsaufbau

Die komplette Apparatur zur Untersuchung isolierter Organpräparate besteht prinzipiell aus zwei Teilen, einem biologischen System (Organbad) und einem Meßsystem (Elektronik) (siehe Abb. 4).

Durch das Organbad werden für das Präparat standardisierte und günstige Lebensbedingungen geschaffen. Das Meßsystem besteht aus einem Verstärker, einem Stimulator, einem Transducer sowie dem Schreiber und dem eigentlichen Organbad.

Zu Beginn des Versuches muss der Muskel vorgedehnt werden, um eine Verkürzung durch Kontraktion zu ermöglichen. Dazu wurde ein Gewicht von 500 mg / Trabekel angehängt. Mit dieser Vorlast erfolgt die Einstellung des Verstärkers sowie der Ausgangsempfindlichkeit des Schreibers.

Das verwendete System besteht aus 4 doppelwandigen Organbädern. Durch ein Ultra-Thermostat wird eine kontinuierliche Temperatur von 37 °C gewährleistet. Im inneren Zylinder befinden sich 10 ml Tyrodelösung sowie der zu untersuchende Muskeltrabekel. Mittels einer am Boden angebrachten Gasfritte kann die Begasung erfolgen.

Die einzelnen gewonnenen Trabekel wurden jeweils zur Aufhängung in der Messapparatur mit kleinen Metallhaken versehen. Zur Messwertaufnahme wurden Fäden, chirurgische Nähseide, verwendet. Die Muskeltrabekel wurden an zwei Aufhängepunkten eingehängt, wobei einer, der untere, fest fixiert ist und der obere über eine Öse mit einem Kraftaufnehmer (Transducer) verbunden ist. Der Kraftaufnehmer ermittelt die auftretenden Kraftänderungen und wandelt diese in elektrische Signale um.

Nach Platzierung im Organbad mit frischer Tyrodelösung erfolgte die Reizung der Trabekel mit elektrischen Impulsen. Der Reiz lag dabei je nach Trabekel zwischen 4 und 11 V. Dabei kommt es zur Kontraktion der Muskelbälkchen, die mit Hilfe einer Messapparatur aufgenommen wurden. Aufgrund starker individueller Unterschiede müssen die gemessenen Signale unterschiedlich verstärkt werden. Die Dokumentation der Messwerte im Versuchsverlauf erfolgte über den Schnellschreiber.

2.5.3 Versuchsdurchführung

Wie bereits erwähnt wurde das Präparat unmittelbar nach operativer Entnahme in begaste Tyrodelösung gelegt. Nach Präparation der Vorhoftrabekel wurden diese in das Organgefäß eingehängt. Am Anfang erfolgte die Äquilibration der Trabekel. Dabei wurde in zeitlichen Abständen von 7 bis 10 min für einen Zeitraum von 60-90 Minuten das Präparat regelmäßig mit frischer begaster Tyrodelösung versorgt. In diesem Zeitraum hat sich der Muskeltrabekel auf eine konstante Kontraktionskraft eingepegelt. Durch das Spülen wird dem Organ ständig

frische Nährlösung zugeführt, Eiweißreste und Pharmaka können ausgewaschen werden. Die Begasung der Nährlösung erfolgte mit Carbogen, einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂. Bereits während der Äquilibration erfolgte die Zugabe der Glyoxallösungen (jeweils 100 µl). Die Konzentrationen und ihre Zusammensetzung sind in Tab. 1 dargestellt. Die Kontrolltrabekel wurden entsprechend nur mit Tyrodelösung versorgt. Die Tyrode ohne Glucose wurde bereits eine halbe Stunde vor Ischämiebeginn bei 37 °C mit N₂ inkubiert. Während der Präinkubation von 15 min wurden die Trabekel weder gespült noch nachgestellt. Nach diesem Zeitraum erfolgte nach Zugabe von glucosefreier- Tyrode und Glyoxallösung eine Ischämie von 30 min unter Begasung mit Stickstoff. Im Anschluss erfolgte die Reperfusion mit Glucose-haltiger Tyrode sowie Glyoxal und Carbogen. Während der Reperfusion wurde nach 20 min, 40 min und 60 min mit Tyrode gespült und erneut Glyoxallösung hinzugegeben. Nach Versucheende wurden die Präparate umgehend in flüssigen N₂ eingefroren und danach dauerhaft bei -80 °C gelagert.

Aufgrund der Tatsache, dass insgesamt 4 Messapparaturen zur Verfügung standen wurden größtenteils jeweils Versuchsgruppen zu zwei unterschiedlichen Konzentrationen bzw. im Vergleich zur Kontrollgruppe durchgeführt.

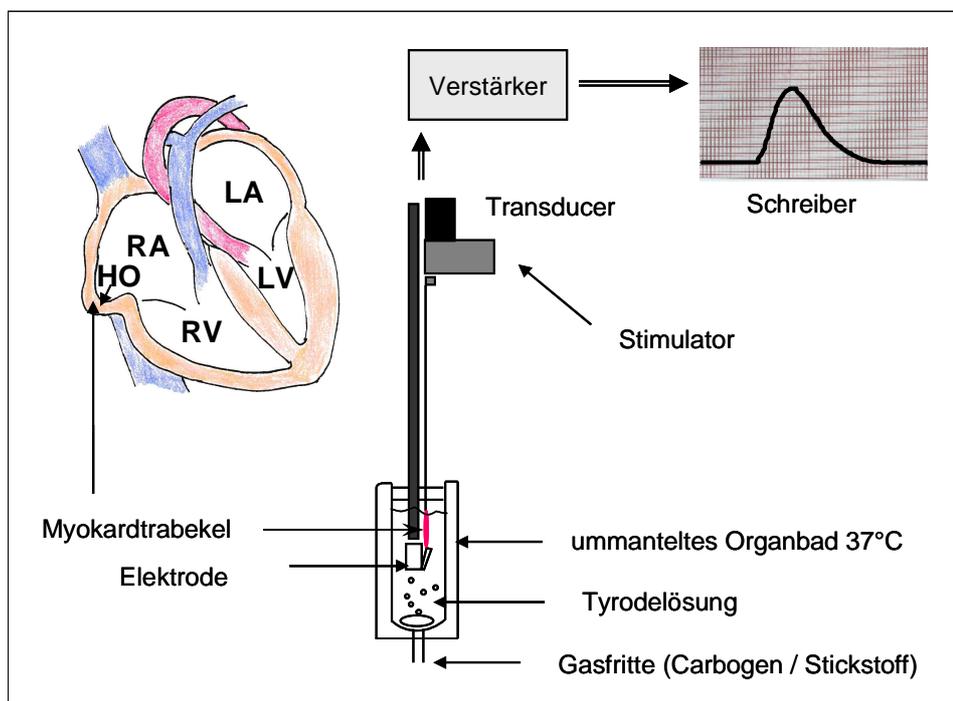


Abb. 4 Schematischer Aufbau Organbadversuch

Die Myokardtrabekel werden aus dem rechten Herzohr (rechtsatriales Myokard) präpariert und in das mit Tyrodelösung gefüllte Organbad (gewärmt auf 37 °C) platziert. Begasung mit Carbogen während der Äquilibration, Präinkubation und Reperfusion und mit Stickstoff während der Ischämie. Über den Transducer wird nach Stimulation die Reizantwort erfasst und in elektrische Signale umgewandelt. Nach Signalverstärkung erfolgt die Dokumentation durch den Schreiber. HO - Herzohr (rechts), RA – rechtes Atrium (Vorhof), RV – rechter Ventrikel, LA – linkes Atrium, LV – linker Ventrikel.

2.6 Proteinchemie

2.6.1 Proteinpräparation aus Myokardgewebe

Die Herztrabekel wurden nach dem Organbadversuch in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei -80 °C gelagert. Zur anschließenden Proteinpräparation wurde das Gewebe in $100\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer mit $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Protease Inhibitor und zusätzlich $0,1\text{ }\mu\text{M}$ Okadainsäure aufgenommen und mit einem Potter zermahlen. Der Potter wurde nach jeder Probe in $0,1\text{ }\%$ SDS- Lösung und anschließend mit destillierten Wasser gereinigt. Die Proben wurden danach für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend für 30 min in das Ultraschallbad gestellt und erneut mit dem Potter bearbeitet. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min mit 10000 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Methode (siehe 2.6.2) wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ entnommen. Die Proteinlysate wurden mit 2 x SDS Probenpuffer eingestellt und danach für 10 min bei 60 °C im Thermocycler denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte entsprechend dem Firmenprotokoll unter Verwendung des BCATM Protein Assay-Kits. Zur Erstellung der Eichkurve wurden verschieden konzentrierte Standardproteinlösungen hergestellt. Dabei wurde eine BSA-Stammlösung auf folgende Konzentrationsstandards verdünnt: $0, 40, 80, 160, 320, 640, 1000$ (in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die Proben wurden unter Verwendung von Lysepuffer $1:10$ verdünnt. Die verdünnten Proben und Standards wurden zu je $10\text{ }\mu\text{l}$ als Doppelbestimmung auf eine 96 well Mikrotiterplatte aufgetragen. Von der Reagenzlösung, bestehend aus Bichinonsäurelösung (BCA) und CuSO_4 im Verhältnis $50:1$, wurden jeweils $200\text{ }\mu\text{l}$ in jedes Slot hinzupipettiert, der Ansatz auf dem Schüttler für 30 sec gemixt und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar danach konnte mittels FLUOstar OPTIMA Mikroplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm die Absorption vermessen und anhand der BSA-Eichgerade die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.7 Western – Blot Analyse

2.7.1 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE)

Mit SDS – PAGE erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine. Dafür wurden Polyacrylamid-Gele hergestellt (siehe Tab. 3), die sich aus je einem Sammelgel und einem Trenngel ($10\text{ }\%$) zusammensetzen. Die Proteine konzentrieren sich unabhängig von deren

Größe, am Übergang vom Sammel- zum Trenngel. Die Auftrennung der Proteine fand im Trenngel statt.

Tab. 3 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

	Sammelgel	Trenngel
Aqua bidest	3,385 ml	4,95 ml
Acrylamid / Bisacrylamid (40 %)	0,375 ml	3,75 ml
Trenngelpuffer	-	3,8 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml	-
TEMED	6 µl	12 µl
APS (40 %)	12 µl	18 µl
Glycerin (90 %)	-	2,5 ml
Total	5 ml	15 ml

Nach Gießen des Gels wurde es zur Polymerisation für mindestens 30 min stehen gelassen. 30-50 µg Protein wurden danach auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde bei jedem Gel ein Proteingrößenstandard (Prestained Marker) aufgetragen. In der Gelelektrophoresekammer wurden die Proteine unter Verwendung von 1 x Laufpuffer ihrer Größe nach bei einer konstanten Spannung von 120 V aufgetrennt.

2.7.2 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Dafür wurden das Blotpapier, das Polyacrylamidgel sowie die Nitrocellulosemembran mit CAPS-Blotpuffer befeuchtet. In der Blot-Apparatur erfolgte, nachdem der Blot entsprechend luftblasenfrei zusammengebaut wurde (2 Blotpapier, Auflage Gel und danach Membran, 2 Blotpapier), der Semi-Dry Transfer unter 1 mA/cm² Membran für ca. 60 min. Die Qualität des Transfers wurde anschließend durch Färbung der Membran für 2 min mit Amido Black und anschließendem schrittweise Waschen in Wasser bis zum Sichtbarwerden der einzelnen angefärbten Proteinbanden beurteilt.

Im nächsten Schritt wurden die Membranen in Blockierungslösung bei Raumtemperatur für 1 Stunde auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran zu sättigen. Nach Abnehmen der Blockierungslösung wurde die Membran über Nacht bei 4 °C bzw. 1 h bei Raumtemperatur mit primärem Antikörper inkubiert. Die primären Antikörper (siehe Tab. 4) wurden mit Blockierlösung und 0,03% NaN₃ hergestellt. Nach Entfernen des primären Antikörpers wurden unspezifische Antikörperbindungen in 6 Waschschritten für je 5 min mit Waschlösung entfernt.

Anschließend wurde die Membran mit einem mit Peroxidase gekoppelten spezifischen Sekundärantikörper, (gelöst in Blockierungslösung 1:10.000) für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran erneut in 6 Waschschritten für je 5 min gewaschen.

Für den Chemilumineszenznachweis wurde die Membran für 2 min mit Luminolgebrauchslösung inkubiert. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol, das dabei in einen angeregten Zustand gerät. Beim Zerfall des intermediären Reaktionsproduktes entsteht Lichtemission, die mittels des LAS-3000 *imaging Systems* detektiert und abschließend mittels des AIDA 3.5 Programmes densitometrisch ausgewertet wurde.

Um Schwankungen der Proteinbeladung zu relativieren wurden die untersuchten Proteine auf die Ladungskontrolle Aktin abgeglichen.

Tab. 4 Übersicht über die für die Western Blot Analyse verwendeten primären und sekundären Antikörper

Antikörper	Bezug	Verdünnung	sekundärer Antikörper
Anti - 3-DG-Imidazolon	Biologo, Kronshagen	1 : 1000	monoklonal (Maus)
Anti - Akt	Cell Signaling, Danvers, USA	1 : 1000	polyclonal (Kaninchen)
Anti - Aktin	Sigma, Deisenhofen	1 : 2000	monoklonal (Maus)
Anti - Arginin-Pyrimidin	Universität Nagoya	1 : 1000	monoklonal (Maus)
Anti - Caspase 3	Cell Signaling, Danvers, USA	1 : 1000	polyklonal (Kaninchen)
Anti - Caspase 9	Cell Signaling, Danvers, USA	1 : 1000	polyklonal (Kaninchen)
Anti - CML	Universität Tübingen	1 : 1000	polyklonal (Kaninchen)
Anti - ERK1/2 ^{MAPK} (p42/44 ^{MAPK})	Cell Signaling, Danvers, USA	1 : 1000	polyklonal (Kaninchen)
Anti - Nitrotyrosine	Upstate, Biomol, Hamburg	1 : 1000	monoklonal (Maus)
Anti - P- p38 ^{MAPK}	Cell Signaling, Danvers, USA	1 : 1000	monoklonal (Kaninchen)
Anti - p38 ^{MAPK}	Cell Signaling, Danvers, USA	1 : 1000	polyclonal (Kaninchen)
Anti - pAkt	Cell Signaling, Danvers, USA	1 : 1000	monoklonal (Kaninchen)
Anti - PARP	BD Biosciences, Heidelberg	1 : 2000	monoklonal (Maus)
Anti - Pentosidin	Biologo, Kronshagen	1 : 1000	monoklonal (Maus)
Anti - P-ERK1/2 ^{MAPK}	Cell Signaling, Danvers, USA	1 : 1000	polyklonal (Kaninchen)
Anti - RAGE (A11)	Prof. Weigle, TU Dresden	1 : 1000	monoklonal (Maus)
Esel Anti - Kaninchen, HRP-konjugiert IgG	Dianova, Hamburg	1 : 10000	
Ziege Anti Maus, HRP-konjugiert IgG	Dianova, Hamburg	1 : 10000	

2.7.3 Polyacrylamidgefärbung mit Coomassie – Blau

Zur Effizienzbeurteilung des Westernblots wurden die Polyacrylamidgele mit Coomassie-Blau Färbelösung eingefärbt, danach mit Entfärbelösung entsprechend entfärbt. Coomassie Brilliant Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und Proteine in den Gelen unspezifisch anfärbt, die nach der Entfärbung als Banden sichtbar werden.

2.7.4 Stripping von Nitrocellulose - Membranen

In der Western – Blot Analyse eingesetzte Membranen können wiederholt mit Antikörpern inkubiert werden, nachdem die zuvor gebundenen Antikörper von der Membran durch sogenanntes *Stripping* entfernt wurden. Hierzu wurde die Membran nach der Entwicklung im LAS-3000 *imaging System* zuerst mit Waschlösung gewaschen und hinterher im Schüttelinkubator mit Tris - Stripping – Puffer für 30 min bei 55 °C inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Membran mit Waschlösung für zweimalig 10 min erfolgte die Zugabe von Blockierungslösung, um unspezifische Bindungen zu sättigen. Im Anschluss wurde die Membran analog des unter 2.7.2 beschriebenen Verfahrens mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert und danach im LAS-3000 detektiert.

2.8 Dot – Blot Analyse

Nach der Proteinbestimmung mittels der BCA-Methode sowie entsprechendem Einstellen der Proteinlysate auf gleiche Konzentration mit 2 x SDS Probenpuffer wurden die Proben für ca. 5 min bei 95 °C denaturiert. Sowohl das Blotpapier als auch die Membran wurden in 1 x PBS angefeuchtet. Die Proteinproben wurden mittels der Dot-Blot Apparatur direkt auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen. Mit Anlage eines Vakuums wurden die Proben über die Membran filtriert.

Die Membran wird danach entsprechend dem oben beschriebenen Proteinnachweis nach elektrophoretischem Transfer von Proteinen auf die Membran in der Western Blot Analyse (Abschnitt 2.7.2) behandelt. Die verwendeten primären Antikörper sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5 Übersicht über die für die Dot-Blot Analyse verwendeten primären und sekundären Antikörper

Antikörper	Bezug	Verdünnung	sekundärer Antikörper
Anti - Aktin	Sigma, Deisenhofen	1 : 2000	monoclonal (Maus)
Anti - CML	Universität Tübingen	1 : 1000	polyclonal (Kaninchen)
Anti - Pentosidin	Biologo, Kronshagen	1 : 1000	monoclonal (Maus)

2.9 Zellkultur

2.9.1 Isolierung / Kultivierung von adulten Rattenkardiomyozyten

Isolierung: Zur Versuchsdurchführung wurden jeweils 2 adulte Wistar-Ratten verwendet. Zur Sedierung der Tiere wurde eine intraperitoneale Mischinjektion von Ketavet und Rompun unter Verwendung von 4000 U / kg Heparin durchgeführt. Nach Eröffnung des Thorax erfolgte die Entnahme des Herzens. Es wurde in eine eiskalte NaCl-Lösung gegeben und anschließend die Kardiomyozyten nach Schluter und Schreiber (2005) präpariert.

Die präparierten Herzen wurden durch die Fixierung der Aorta in der Langendorff - Apparatur befestigt und mit 80 ml begasten Inkubationspuffer retrograd perfundiert. Danach wurden 90 ml Reperfusionspuffer (0,2 mg/ml Kollagenase P, 14 μ M CaCl_2 in Inkubationspuffer gelöst) hinzugegeben und die Apparatur entsprechend auf Reperfusion umgestellt. Der Kollagenase – Verdau wurde für 30 min durchgeführt. Im Anschluss wurden die Herzen von der Langendorff – Apparatur abgenommen und das verbleibende Ventrikelgewebe zerkleinert. Dieses wurde in einen Teflonbecher mit 30 ml BSA - Reperfusionslösung (0,2 mM BSA in Inkubationspuffer gelöst) gegeben und bei 37 °C mit CO_2 begast. Danach erfolgte die Resuspendierung für ca. 2 min durch vorsichtiges Pipettieren der Gewebelösung, um diese hinterher über einen Nylonfilter in ein 50 ml Röhrchen zu filtrieren. Durch die Kollagenase im Reperfusionspuffer fand der Nachverdau statt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 3 min bei 25 x g, der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Das Pellet mit den Kardiomyozyten wurde mit Earle – Salzlösung (116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM NaH_2PO_4 , 5,5 mM Glucose, 20 mM Tris / HCl, 130 μ M Phenolrot, pH 7,5) sowie CaCl_2 resuspendiert. Die CaCl_2 -Konzentration der Earle - Salzlösung wurde schrittweise von 200 μ M auf 500 μ M erhöht. Nach jedem Zwischenschritt wurde mit 25 x g abzentrifugiert und das Pellet weiter behandelt. Die Earle – Zellsuspensionslösung mit 0,5 mM CaCl_2 wurde vorsichtig über eine mit 1 mM CaCl_2 sowie 40 mg/ml BSA enthaltende Earle – Lösung geschichtet und die Kardiomyozyten bei 15 x g für 1 min abzentrifugiert. Das verbleibende Zellpellet wurde in M199 Komplettmedium gelöst und anschließend die Zellzahl bestimmt.

Kultivierung: Am Tag vor der Präparation wurden die 6 – well – Platten mit M199 Komplettmedium, 4% FKS, Penicillin / Streptomycin beschichtet. Die präparierte Zellsuspension wurde auf die 6 – well – Platten mit einer Zelldichte von 15.000 Zellen / cm^2 (150.000 Zellen/Well) gebracht und zur Adhäsion mit dem serumfreien M199 Komplettmedium bei 37 °C für 4 Std. inkubiert. Nicht adhärente Zellen wurden durch einen Mediumwechsel entfernt. Die verbliebenen vitalen Kardiomyozyten wurden am Folgetag mit / ohne Glyoxal, wie in 2.9.2 beschrieben, behandelt.

2.9.2 Simulierte Ischämie / Reperfusion in adulten Rattenkardiomyozyten

Die Simulation der Ischämie / Reperfusion an Rattenkardiomyozyten erfolgte nach einem Protokoll von Kim et al. (2006). Die Myozyten werden nach der Präparation aus dem Rattenherz für 90 min mit Glyoxal präinkubiert. Für die Versuche in der Zellkultur wurde 30 μM Glyoxal verwendet. Die Zellen wurden mit KRH Puffer (pH 6,2) einmal gewaschen, danach erneut Zugabe von KRH Puffer (pH 6,2) sowie 30 μM Glyoxal und Inkubation für 3 h im Hypoxieschrank unter nahezu anaeroben Bedingungen (1% O_2 , 37 °C). Anschließend erfolgte nach einmaligem Waschen mit KRH Puffer (pH 7,4) die Reoxygenierung für insgesamt 2 h unter Zugabe von vorgenanntem Puffer sowie \pm Glyoxal unter aeroben Bedingungen im Brutschrank (37 °C, 16% O_2). Die Platten wurden nach Zugabe von Lysepuffer abschließend bei – 80 °C eingefroren bzw. sofort zur Proteinpräparation aufgearbeitet.

2.9.3 Proteinpräparation aus Zellen

Nach Absaugen des Überstandes im Anschluss an das simulierte Ischämie / Reperfusionsexperiment an den Rattenkardiomyozyten wurden 50 μl Lysepuffer sowie 0,1 μM Okadainsäure und 10 $\mu\text{g/ml}$ Protease Inhibitor zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließendes mechanisches Ablösen der Zellen mit dem Schaber und Überführung der Zellysate in ein Eppendorff-Reaktionsgefäß. Die Proben wurden mit 2 x SDS Probenpuffer eingestellt und bei 60 °C für 10 min denaturiert. Mit einer Proteinmenge von 20-40 μg erfolgte die Auftrennung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.7.1), danach wurde der elektrophoretische Transfer sowie abschließend die Proteindetektion (siehe Abschnitt 2.7.2) durchgeführt.

2.10 Zelltodnachweis durch Bestimmung der LDH Aktivität im LDH – Release Assay (Zytotoxizitätsassay)

Der LDH-Release-Assay dient der Detektion der Aktivität des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH), das bei Zerstörung der Zytoplasmamembran freigesetzt wird. Es dient damit dem Nachweis des Zelluntergangs durch Nekrose. Apoptotische Zellen hingegen setzen kein zelluläres Material frei. Mit dem *CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit* wird ausschließlich die LDH-Aktivität gemessen und ist damit ein spezifischer Nachweis. Die ermittelten Werte korrelieren daher sehr gut mit der Zelltodrate durch Nekrose.

Am Anfang steht die LDH-katalysierte Oxidation von Lactat zu Pyruvat, bei der NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert wird. Im zweiten Schritt werden Wasserstoffatome auf Resazurin (Tetrazoliumsalz INT) durch den Katalysator Diaphorase übertragen. Dadurch wird Resazurin zu einem Formazansalz (Resorufin) reduziert, was durch einen Farbumschlag

ersichtlich und im Photometer bei einer Extinktion von 560 nm und Emission von 590 nm mit dem ELISA-Reader quantifiziert wird.

Die Proben für den LDH – *Release Assay* wurden im Organbadversuch entnommen. Während der Behandlung mit 1 mM Glyoxal / Kontrollen wurden die Proben (Überstand) für folgende Zeitpunkte vermessen: nach 15 min Präinkubation, nach 30 min Ischämie sowie nach 20 min Reperfusion.

Des Weiteren wurden Proben während der Behandlung mit 5 μ M Caspase 3 -Inhibitor / Kontrollen zu den Zeitpunkten: 60 min Äquilibration, 30 min Ischämie, 20 min sowie 40 min Reperfusion entnommen und ebenfalls vermessen.

Auf einer 96-Well-Platte für Fluoreszenzmessung wurden 50 μ l Überstand aufgetragen und 1:1 50 μ l der LDH - Substratlösung hinzugegeben und anschließend bei 590 nm gemessen.

Die Vermessung im ELISA Messgerät erfolgte sofort nach Zugabe der Substratlösung sowie nach 60 min. Entsprechend wurden die Werte der Proben nach sofortiger Messung von dem Wert nach 60 min abgezogen. Die Ergebnisse der Kontrollen nach 15 min (Glyoxal) bzw. 60 min Äquilibration (Caspaseinhibitor) wurden auf 100 % normiert.

2.11 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Experimente wurden als Mittelwert (MW) und Standardfehler (SEM) angegeben und in den jeweiligen Diagrammen mit Fehlerbalken dargestellt. Die statistische Auswertung und die graphischen Darstellungen erfolgten unter Verwendung von MS Excel. Mit dem Student's t-Test (2-seitig, ungepaart) erfolgte die Signifikanzanalyse. Statistisch signifikant wurden Werte ab $p \leq 0,05$ angesehen und entsprechend gekennzeichnet, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Abhängigkeit der Kontraktionskraft von der Glyoxalkonzentration im Organbad

3.1.1 Wirkung von Glyoxal auf Trabekel im Organbad: Kinetik

Im Zusammenhang mit kurzen ischämischen Ereignissen (Angina Pectoris) kann es zu Lipidperoxidation und erhöhtem Glukose-Turnover im Myokard kommen. Da solche physiologischen Zustände zur Bildung von AGE-bildenden Dicarbonylen führt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Auswirkung Glyoxal als Beispiel eines solchen Dicarbonyls auf die Kontraktionskraft des Myokardgewebes hat. Dazu wurden die aus dem menschlichen Herzohr gewonnen Trabekel in der Organbadanlage behandelt. Auf eine initiale Äquilibrationsphase folgte die Präinkubation für insgesamt 15 min, danach eine Ischämiezeit von 30 min. Zum Abschluss wurde mit der Reperfusion von insgesamt 90 min fortgefahren. Es wurden zwei verschiedene Altersgruppen untersucht, bestehend aus Gewebeproben von Probanden ≤ 60 und ≥ 70 Jahren. Für beide Altersgruppen wurden je 10 Versuche mit Kontrollen, als auch mit 1 mM Glyoxal durchgeführt. Das mittlere Alter für die Patienten ≤ 60 betrug $53,7 \pm 1,3$, für die Patienten ≥ 70 , $74,1 \pm 0,6$ Jahre.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 5 und 6 dargestellt. Anhand Abb. 5 ist zu erkennen, dass infolge der Behandlung des Gewebes von Probanden ≤ 60 Jahren mit 1 mM Glyoxal die Kontraktionskraft zu allen Zeitpunkten während der Reperusionsphase (nach 20 min $p=0,0002$; 40 min $p=0,004$; 60 min $p=0,001$ und 90 min $p=0,0006$) signifikant höher ist und sich damit im Vergleich zu den Kontrollen ein geringerer Reperusionssschaden abzeichnet.

Es zeigen sich bei der Behandlung von Myokardgewebe von Probanden ≥ 70 Jahre mit 1 mM Glyoxal im Vergleich zu den Kontrollen vergleichbare Ergebnisse für die Reperusionszeiten von 20 min ($p=0,005$), 60 min ($p=0,003$) und 90 min ($p=0,0005$). Für die Reperusionszeit nach 40 min sind die Werte nach Glyoxalbehandlung ebenfalls erhöht, die Signifikanz mit $p=0,056$ wurde aber knapp verfehlt (Abb.6).

In der Abb. 7 sind die Ergebnisse nach 20 min, 60 min sowie 90 min Reperfusion für beide Altersgruppen zur Übersicht und zum direkten Vergleich dargestellt.

Der direkte Vergleich der Kontraktionskraft unbehandelter Trabekel beider Altersgruppen zeigte nahezu identische Ergebnisse und somit keine signifikanten Unterschiede.

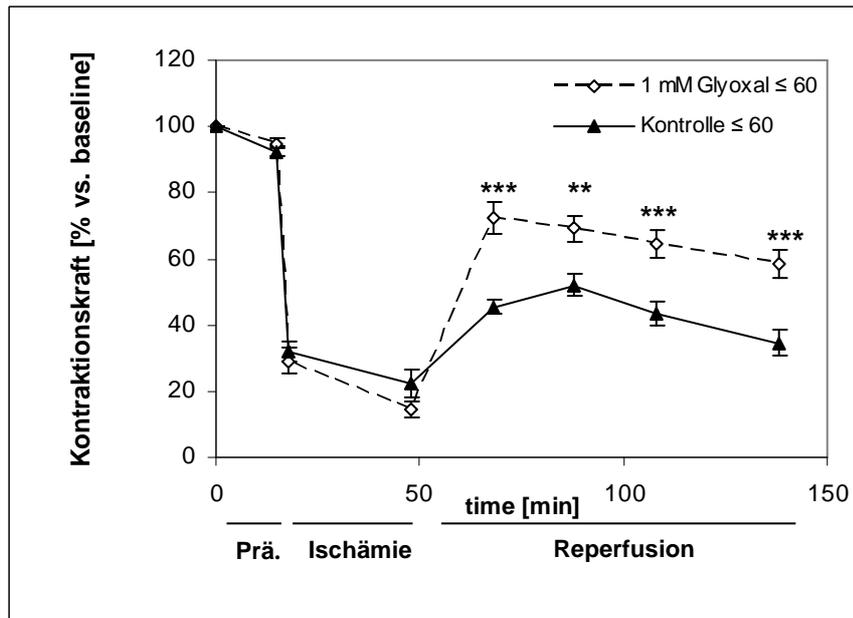


Abb. 5

Graphische Darstellung der kinetikabhängigen Untersuchung der Trabekel von Erwachsenen (≤ 60 Jahre) im Organbad durch Behandlung mit Glyoxal vs. Kontrollen

Prä.= Präinkubation. Humane Myokardtrabekel von Erwachsenen wurden im Organbad mit ± 1 mM Glyoxal während der Präinkubation von 15 min, Ischämie von 30 min sowie einer Reperusionszeit von insgesamt 90 min behandelt. Die Kontraktionskraft wurde zeitabhängig (Präinkubation, Ischämie, sowie 20 min / 40 min / 60 min und 90 min Reperfusion) aufgetragen. Es sind die Mittelwerte \pm SEM (n=10) mit ** $p \le 0,01$ und *** $p \le 0,001$ vs. Kontrollen angegeben.

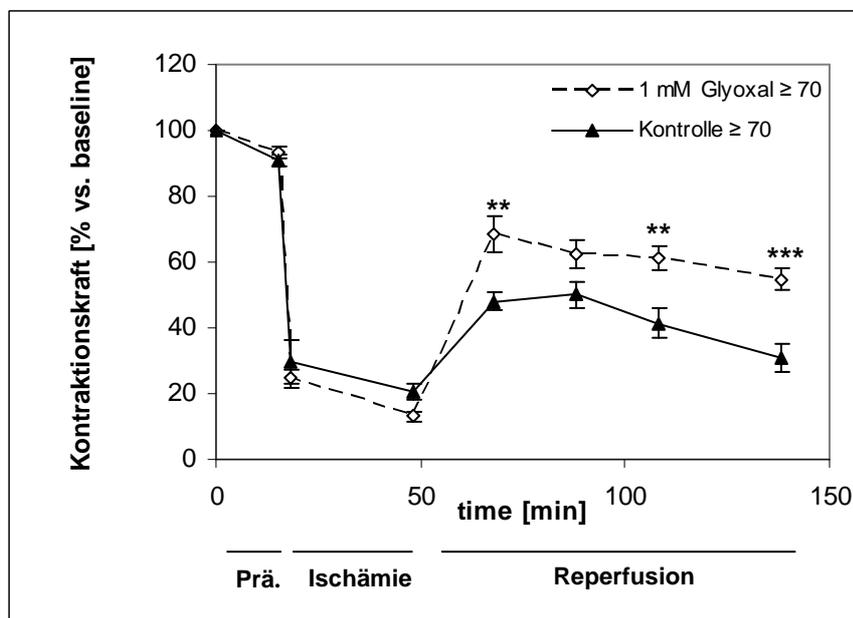


Abb. 6

Graphische Darstellung der kinetikabhängigen Untersuchung der Trabekel von Senioren (≥ 70 Jahre) im Organbad durch Behandlung mit Glyoxal vs. Kontrollen

Prä.= Präinkubation. Humane Myokardtrabekel von Senioren wurden im Organbad mit \pm von 1 mM Glyoxal während der Präinkubation von 15 min, Ischämie von 30 min sowie einer Reperusionszeit von insgesamt 90 min behandelt. Die Kontraktionskraft wurde zeitabhängig (Präinkubation, Ischämie, sowie 20 min / 40 min / 60 min und 90 min Reperfusion) aufgetragen. Es sind die Mittelwerte \pm SEM (n=10) mit ** $p \le 0,01$ und *** $p \le 0,001$ vs. Kontrollen angegeben.

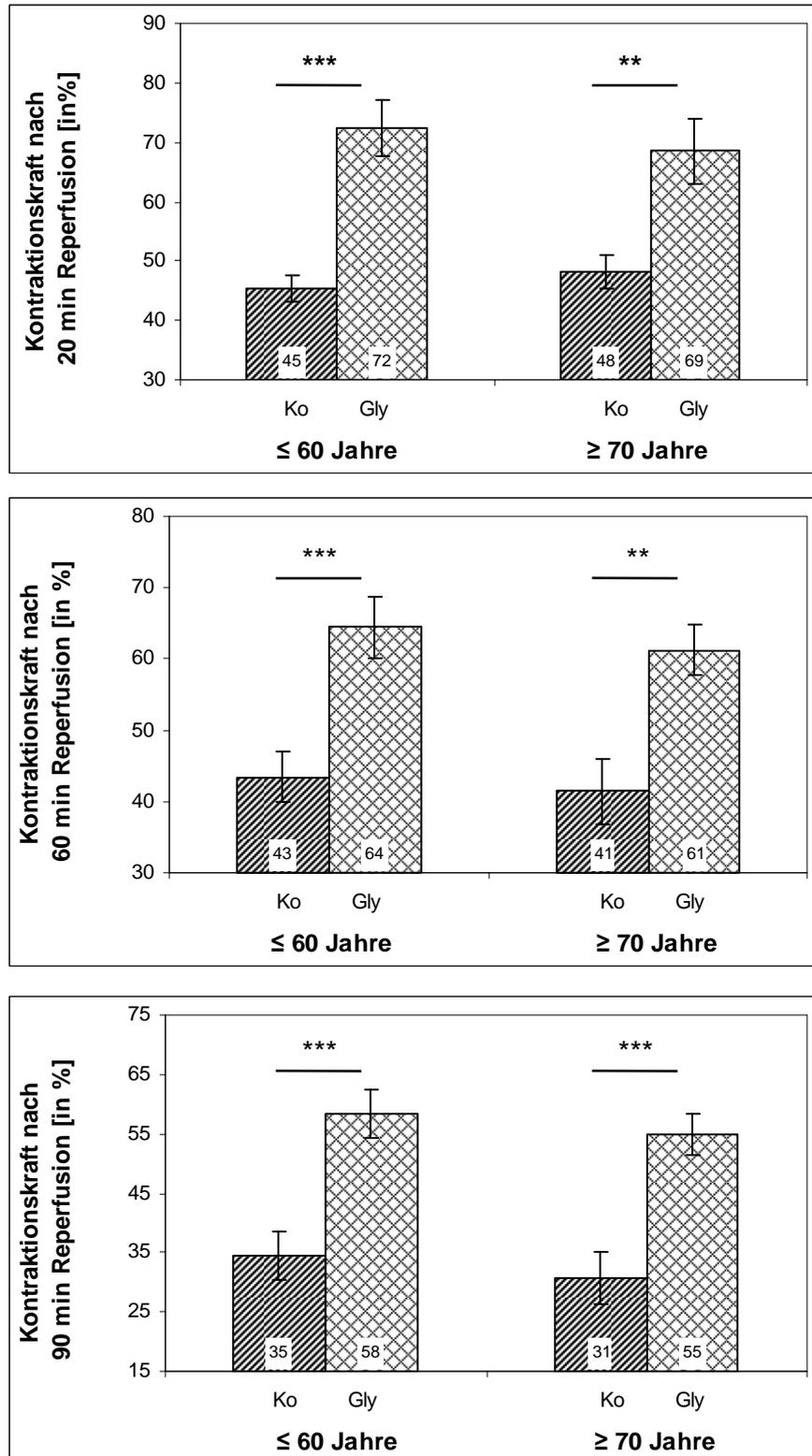


Abb. 7
Übersicht im Organbadversuch Kontrolle vs. 1 m Glyoxal

Myokardgewebe von Patienten ≤ 60 und ≥ 70 Jahre wurden im Organbad behandelt. (ko – unbehandelte Kontrolle; Gly – 1 mM Glyoxal). Die Ergebnisse für die Reperusionszeiten 20 min, 60 min und 90 min sind dargestellt. Es sind die Mittelwerte \pm SEM (n=10) mit **p \leq 0,01 und ***p \leq 0,001 vs. Kontrollen angegeben.

3.1.2 Wirkung von Glyoxal auf Trabekel im Organbad: Konzentrationsabhängigkeit

Im zweiten Schritt wurde die Kontraktionskraftentwicklung in Abhängigkeit von der steigenden Konzentration an Glyoxal untersucht. Da zu wenige Trabekel von jungen Patienten zur Verfügung standen, wurden diese Versuche nur mit Material von Patienten ≥ 70 Jahre durchgeführt.

Die folgenden Konzentrationen wurden verwendet (n je 10): Kontrolle, 0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM und 1mM Glyoxal.

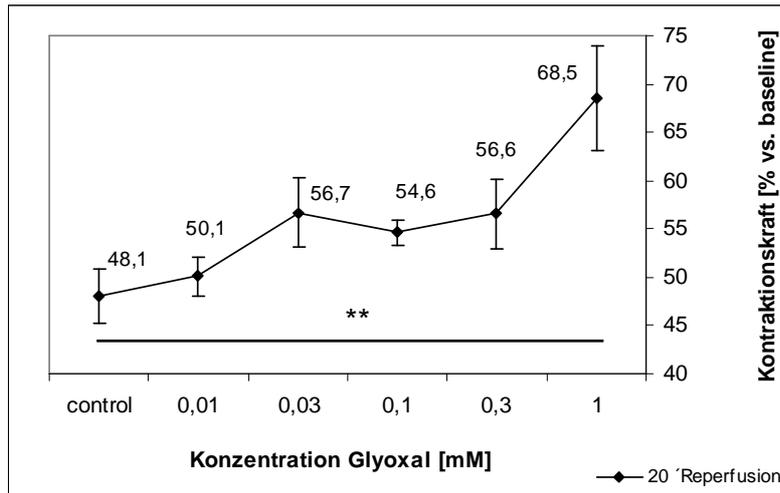
In den Abbildungen 8 (A-C) sind die Kontraktionskräfte bei ansteigenden Konzentrationen für die Reperusionszeiten 20 min, 40 min und 60 min dargestellt.

In den drei Abbildungen wird deutlich, dass zu allen beobachteten Zeitpunkten während der Reperfusion die Kontraktionskraft mit steigender Glyoxalkonzentration ansteigt.

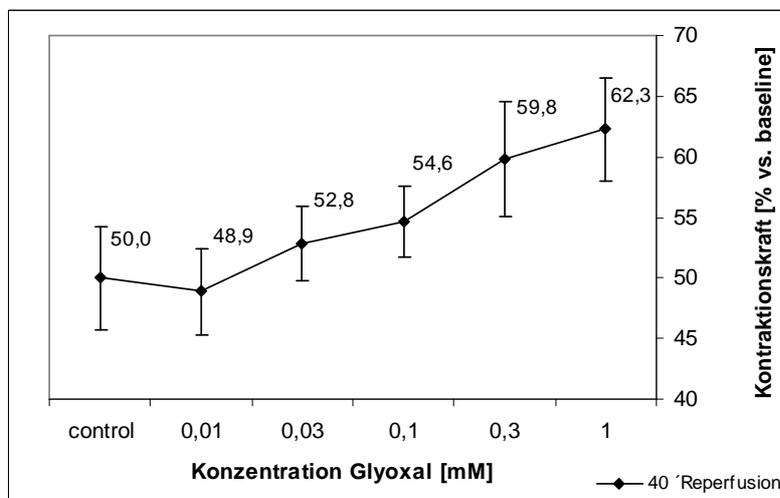
Signifikante Ergebnisse nach Glyoxalbehandlung im Vergleich zu den Kontrollen wurden wie bereits in Abb. 6 dargestellt bei der Konzentration von 1 mM sowohl nach 20 min und 60 min Reperfusion erreicht. Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigte sich außerdem nach 60 min Reperfusion bei einer Konzentration von 0,3 mM ($p=0,02$).

Anhand der in Abb. 8 (A-C) dargestellten Graphiken ist ersichtlich, dass mit steigender Glyoxalkonzentration die Kontraktionskraft des Myokardgewebes während der Reperfusion steigt. Die errechneten mittleren Werte der behandelten Trabekel lagen bis auf einen (siehe Abb. 8 B: 0,01 mM) über den Werten der Kontrollen. Mit steigender Glyoxalkonzentration näherten sich die Ergebnisse dem Signifikanzniveau, allerdings wurde im Rahmen der hohen Variabilität nur bei wenigen Werten dieses erreicht.

A



B



C

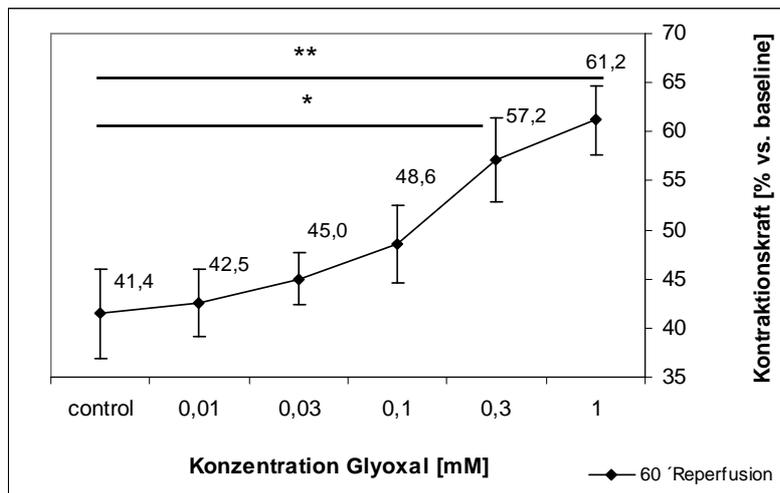


Abb. 8 (A-C)

Graphische Darstellung der kinetikabhängigen Untersuchung der Trabekel von Senioren (≥ 70 Jahre) im Organbad durch Behandlung mit Glyoxal vs. Kontrollen während der Reperfusion.

Humane Myokardtrabekel von Senioren wurden im Organbad \pm Glyoxal in aufsteigender Konzentration (0,01 / 0,03 / 0,1 / 0,3 und 1 mM) während der Präinkubation von 15 min, Ischämie von 30 min sowie einer Reperfusionszeit von insgesamt 60 min behandelt. Die Kontraktionskraft wurde für die jeweiligen Konzentrationen zu den Reperfusionszeitpunkten A) 20 min, B) 40 min und C) 60 min aufgetragen. Es sind die Mittelwerte \pm SEM (n=10) mit *p \leq 0,05 und **p \leq 0,01 vs. Kontrollen angegeben.

3.2 AGE – Bildung in Abhängigkeit von der Glyoxalkonzentration

3.2.1 CML – Bildung in Abhängigkeit von der Glyoxalbehandlung

Als Kontrolle für die Glyoxal-Wirkung sollte die Glyoxal-induzierte Bildung von CML analysiert werden. Dazu wurden nach dem Organbadversuch von den eingefrorenen Herztrabekeln die Proteine aufgearbeitet (Material und Methoden 2.6) und die Expression von Targetproteinen mit Hilfe des Westernblot – Verfahrens bestimmt.

Der Nachweis der Bildung von Carboxy-Methyl-Lysin (CML) infolge der Reaktion von Glyoxal mit Lysinen über die Schritte der Maillard- Reaktion erfolgte mit einem anti-CML Antikörper. Zum Beladungsabgleich wurde Aktin verwendet.

Die Ergebnisse für 1 mM Glyoxal sind in Abb. 9 dargestellt. Es zeigt sich, dass im Westernblot eine Vielzahl von Proteinen zu erkennen sind, die nach Glyoxalbehandlung CML- modifiziert wurden. Zur Auswertung wurde die stärkste Bande bei ca. 45 kDa herangezogen, da nur hier in den Kontrollen ebenfalls eine zwar geringe aber gut quantifizierbare Modifikation vorlag. Dabei zeigt sich, dass im direkten Vergleich zwischen den behandelten Proben und den Kontrollproben die Modifikation um über den Faktor 20 gestiegen ist. Da hier nur je 2 Proben analysiert wurden, wurde auf eine Signifikanzberechnung verzichtet.

Des Weiteren wurde die AGE-Bildung in Abhängigkeit von der steigenden Konzentration von Glyoxal untersucht.

Die folgenden Konzentrationen wurden verwendet (je n=3): Kontrolle, 0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM und 1mM Glyoxal. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe der Dot Blot Methode durchgeführt.

In Abb. 10 sieht man die Abhängigkeit der CML – Bildung von der steigenden Glyoxalkonzentration. Dabei zeigt sich, dass mit steigender Glyoxalkonzentration die CML Akkumulation im Myokardgewebe zunimmt. Ein signifikantes Ergebnis wird nach Behandlung mit 0,3 mM Glyoxal vs. der unbehandelten Kontrollen erreicht ($p= 0,03$). Unter Einfluss von 0,1 mM Glyoxal wird die Signifikanz mit $p= 0,057$ gering verfehlt.

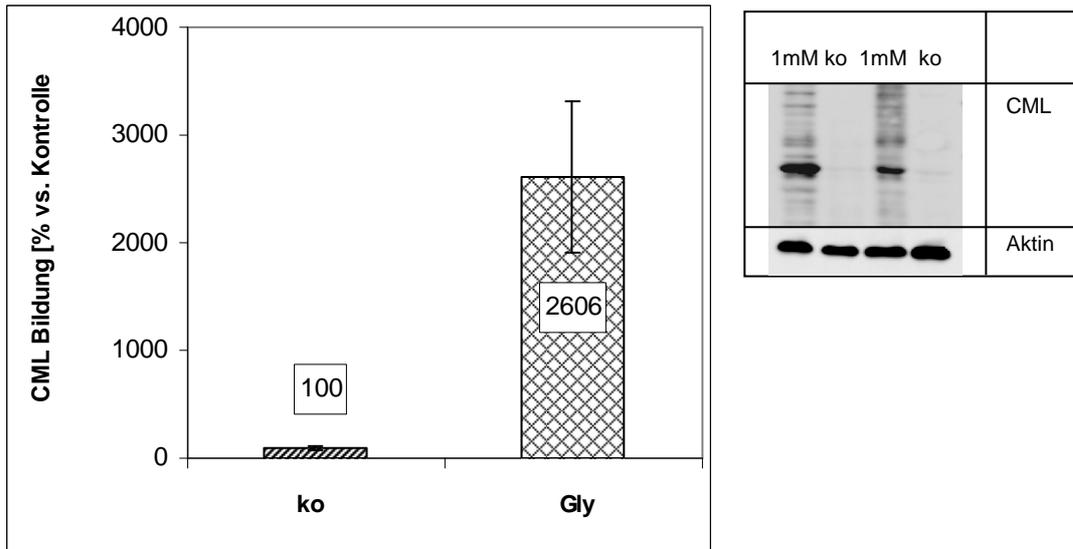


Abb. 9
Einfluss der Glyoxalbehandlung auf die CML Akkumulation

Humane Myokardtrabekel wurden im Organbad \pm 1 mM Glyoxal wie in 3.1.1 beschrieben behandelt (ko – unbehandelte Kontrolle; Gly – 1 mM Glyoxal). Die Proteinexpression von CML wurde durch die Western-Blot Analyse für die behandelten Trabekel und unbehandelten Kontrollen verifiziert. Die Bildung von CML wurde auf die Aktin – Expression normiert. Die Kontrollen wurden auf 100 % festgesetzt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=2) angegeben. Die Western-Blot Ergebnisse sind in der rechten oberen Ecke dargestellt. ko=Kontrolle

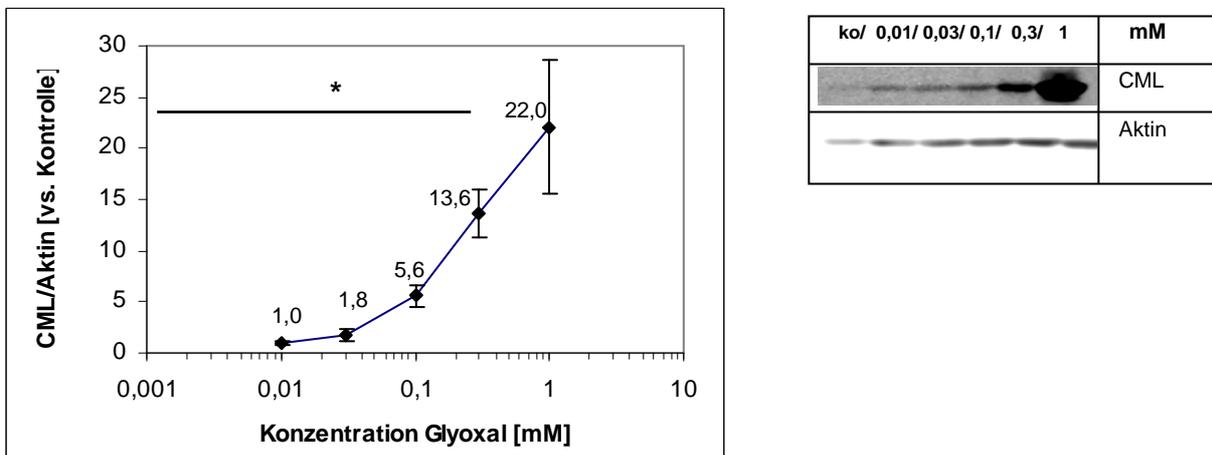


Abb. 10
Einfluss der Glyoxalkonzentration auf die CML Akkumulation

Humane Myokardtrabekel von Senioren (\geq 70 Jahre) wurden im Organbad \pm Glyoxal in aufsteigender Konzentration (ko – unbehandelte Kontrolle, 0,01 / 0,03 / 0,1 / 0,3 und 1 mM) wie in 3.1.1 beschrieben behandelt. Die Proteinexpression von CML wurde durch die Dot-Blot Analyse für die behandelten Trabekel und unbehandelten Kontrollen verifiziert und auf Aktin abgeglichen. Die Kontrollen wurden auf 100 % normiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=3) mit $*p \leq 0,05$ vs. Kontrollen angegeben.

3.2.2 Korrelation der Kontraktionskraft nach 40` Reperfusionzeit mit der CML - Bildung

Um zu analysieren, ob die erhöhte Kraftentwicklung mit dem Modifikationsgrad der Proteine korreliert, wurde in Abb. 11 die Kontraktionskraft der Trabekel nach 40 min Reperfusion der CML – Bildung (Dot- Blot Daten) bei steigender Glyoxalkonzentration gegenübergestellt. Zwischen der CML – Akkumulation und der Kontraktionskraft nach 40 min Reperfusion besteht eine positive Korrelation und signifikante Abhängigkeit ($p= 0,011$, $n=5$).

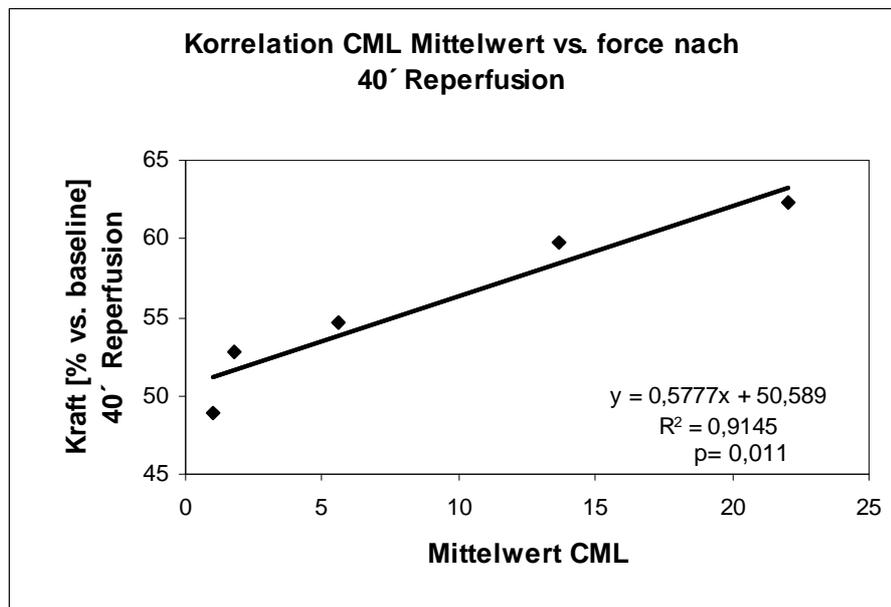


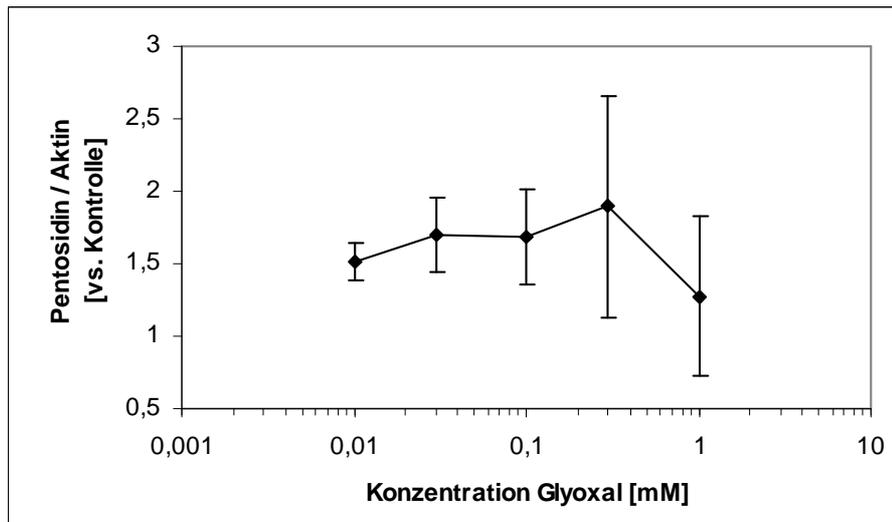
Abb. 11

Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Kraftentwicklung nach 40 min Reperfusion und der CML - Akkumulation

Die Korrelation der Daten bei steigender Glyoxalkonzentration für die CML – Akkumulation mit den Ergebnissen der Kontraktionskraft nach 40 min Reperfusion im Organbad wird dargestellt.

3.2.3 Pentosidin – Bildung nach Glyoxalbehandlung

Als ein weiteres AGE – Produkt wurde der Nachweis von Pentosin untersucht, welches zur Quervernetzung von Arginin- und Lysin- Resten führt. Der verwendete Antikörper ist geeignet, sowohl freies, als auch gebundenes Pentosidin in Geweben und Gewebeextrakten nachzuweisen. Die Untersuchung erfolgte mittels der Dot Blot Analyse. Es konnte keine Abhängigkeit zwischen steigender Glyoxalkonzentration und der Pentosidinbildung nachgewiesen werden (Abb. 12).

**Abb. 12****Einfluss der Glyoxalkonzentration auf die Pentosidin Expression**

Humane Myokardtrabekel von Senioren (≥ 70 Jahre) wurden im Organbad \pm Glyoxal in aufsteigender Konzentration (unbehandelte Kontrolle, 0,01 / 0,03 / 0,1 / 0,3 und 1 mM) wie in 3.1.1 beschrieben behandelt. Die Proteinexpression von Pentosidin wurde durch die Dot-Blot Analyse für die behandelten Trabekel und unbehandelten Kontrollen verifiziert und auf Aktin abgeglichen. Die Kontrollen wurden auf 1 normiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=3) angegeben.

3.2.4 Bildung weiterer AGEs nach Glyoxalbehandlung

Arg-Pyrimidin ist ein Methylglyoxal- Proteinaddukt. Diese Modifikation konnte im Western Blot dargestellt werden, allerdings ist diese erwartungsgemäß durch die Einwirkung der verwendeten Glyoxalkonzentrationen (Kontrolle, 0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM und 1 mM) nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

Die Bildung von 3-DG-Imidazon und Nitrotyrosine als weitere AGEs konnten im Western – Blot – Verfahren nach Glyoxalbehandlung nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.3 Zellulärer *Response* in Abhängigkeit von der Glyoxalbehandlung in humanem Myokardgewebe von Patienten ≤ 60 und ≥ 70 Jahren

Ein wesentlicher Bestandteil der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden sind die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die eine Reihe von Serin/Threonin-Kinasen wie z.B. ERK1/2^{MAPK} und p38^{MAPK} umfassen, als auch die Proteinkinase B (Akt), eine nicht mit den MAP Kinasen verwandte Serin/Threonin-Kinase. Es sollte analysiert werden, ob Glyoxal einen Einfluss auf die Aktivierung dieser Proteinkinasen hat.

3.3.1 Glyoxal – vermittelte Kinasenaktivierung

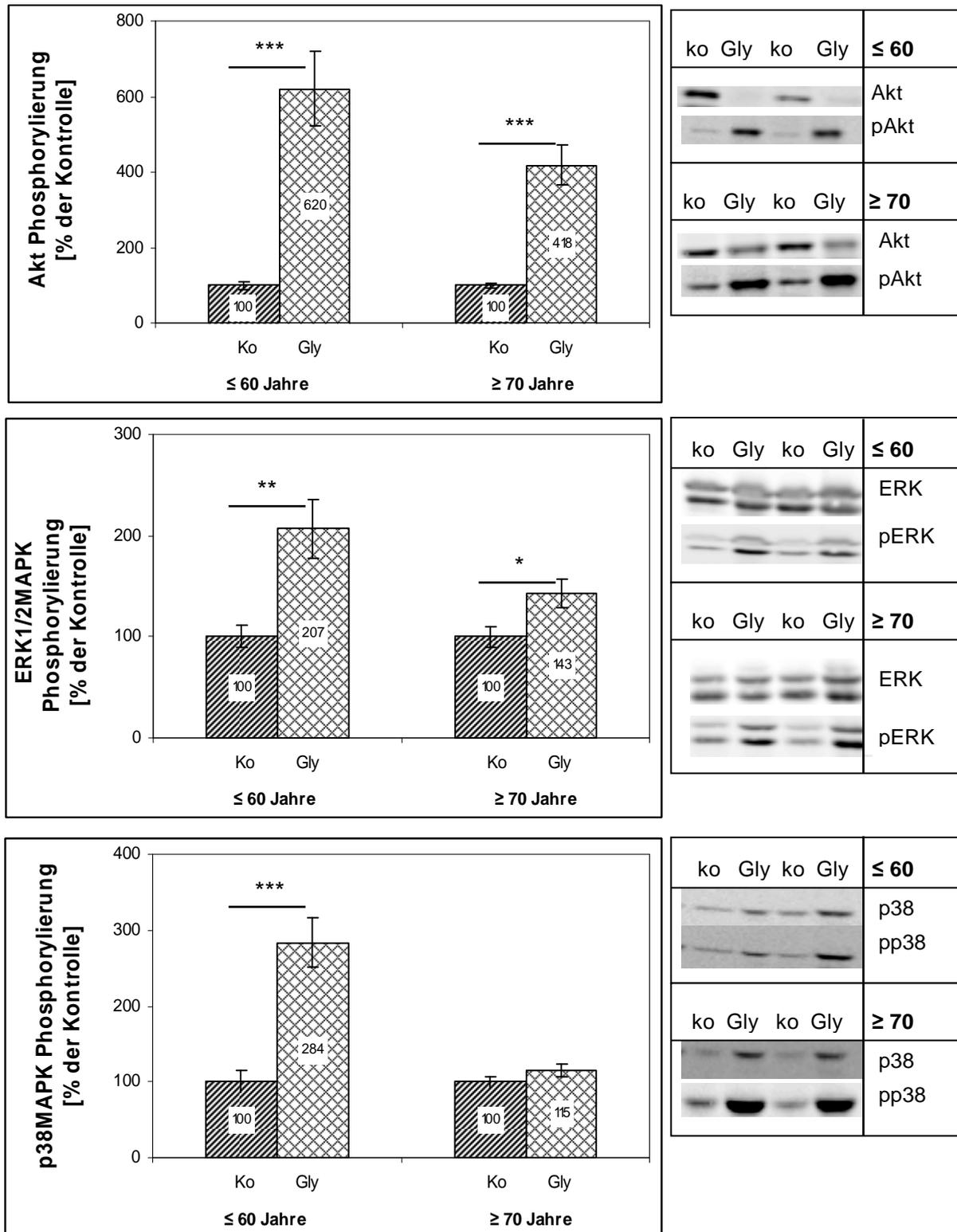
Die nach dem Organbadversuch eingefrorenen Myokardtrabekel wurden entsprechend der Proteinpräparation aufgearbeitet, Proteine isoliert und die Expression der Kinasen mit Hilfe des Western- Blot – Verfahrens bestimmt. Untersucht wurden je 10 unbehandelte und behandelte Trabekel für beide Altersgruppen ≤ 60 und ≥ 70 Jahre.

Eine stärkere Kraftentwicklung nach Ischämie - Reperfusion kann durch ein verbessertes Überleben der Myozyten bedingt sein. Insbesondere die Aktivierung (Phosphorylierung) der *Survival*-Kinase Akt trägt zum Überleben von Zellen bei. Daher wurde die Aktivierung der Akt - Kinase durch das Verhältnis von aktivem p-Akt zu Akt analysiert. Die Banden für Akt und pAkt zeigten sich bei annähernd 60 kDa. Sowohl für die Gruppe der Erwachsenen, als auch für die Gruppe der Senioren zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollen bei der Behandlung mit 1 mM Glyoxal eine stärkere Phosphorylierung der Akt – Kinase. Diese Aktivierung der Kinase ist mit Zellüberleben assoziiert. Die Ergebnisse stellen sich für die Erwachsenen ($p = 0,0005$) und die Senioren ($p = 0,0002$) höchst signifikant dar.

Des Weiteren wurde die Aktivierung der ERK1/2^{MAPK} im Western – Blot – Verfahren untersucht. Die ERK1/2^{MAPK} steht für Wachstum der Zellen. Die Doppelbanden stellten sich wie beschrieben bei 42 und 44 kDa dar (Cell-Signaling-Technology). Im Vergleich zu den Kontrollen zeigt sich durch die Behandlung der Trabekel mit 1 mM Glyoxal eine signifikante Erhöhung der ERK1/2^{MAPK} – Aktivierung bei den Erwachsenen ($p = 0,0055$) und bei den Senioren ($p = 0,026$).

Mit p38^{MAPK} wurde die Stressaktivierung dargestellt. Die Banden stellten sich im Western Blot bei 38 kDa dar. Die Ergebnisse sind gruppendifferent. In der Erwachsenengruppe wurde die Stresskinase p38^{MAPK} infolge der Behandlung mit Glyoxal im Vergleich zu den Kontrollen höchst signifikant ($p = 0,0002$) stärker aktiviert. Auch in dem Gewebe der Seniorengruppe kommt es durch die Glyoxalbehandlung zu einer stärkeren Phosphorylierung von p38^{MAPK}, allerdings nicht signifikant ($p = 0,217$).

Die entsprechenden Ergebnisse sind für beide Altersgruppen in Abb. 13 dargestellt.

**Abb. 13****Einfluss der Glyoxalbehandlung auf die Phosphorylierung verschiedener Kinasen**

Humane Myokardtrabekel von Erwachsenen (≤ 60 Jahre) und Senioren (≥ 70 Jahre) wurden im Organbad ± 1 mM Glyoxal wie in 3.1.1 beschrieben behandelt (ko – unbehandelte Kontrolle; Gly – 1 mM Glyoxal). Die Phosphorylierung der Kinasen Akt, ERK1/2^{MAPK} und p38^{MAPK} wurden durch die Western-Blot Analyse für die behandelten Trabekel und unbehandelten Kontrollen durch die Auswertung der phosphorylierten und unphosphorylierten Ergebnisse verifiziert. Die Kontrollen wurden auf 100 % festgesetzt. Es sind die Mittelwerte ± Standardfehler (n=10) mit *p≤0,05, **p≤0,01 und ***p≤0,001 vs. unbehandelte Kontrolle angegeben.

3.3.2 Glyoxal – Effekte auf Apoptose

Ischämie/Reperfusion kann zu Zellapoptose führen. Dabei kommt es zur Aktivierung von Caspasen. Eine wichtige Caspase ist dabei die enzymatisch aktive Caspase 9, die durch autokatalytische Spaltung der Pro-Caspase 9 entsteht und weitere Caspasen aktiviert, die die Apoptose-Signalkaskade irreversibel einleiten und Zellen degradieren. Daher wurde die Abhängigkeit der Aktivierung von Caspase 9 durch die Glyoxalwirkung untersucht.

Es wurden jeweils behandelte Proben (1 mM Glyoxal) und unbehandelte Kontrollen der zwei Altersgruppen ≤ 60 (je $n=10$) und ≥ 70 (je $n=9$) Jahre untersucht. Zur Auswertung erfolgte die Gegenüberstellung der Werte der Banden der gespaltenen Fragmente bei 35 / 37 kDa denen des ungespaltenen Fragmentes bei 47 kDa.

Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. In unseren Versuchen zeigt sich, dass in der Altersgruppe ≤ 60 Jahre keine Veränderung ($p=0,96$) und in der Altersgruppe ≥ 70 Jahre lediglich eine geringfügige Veränderung bezüglich der Spaltung von Caspase 9 nachgewiesen werden kann ($p=0,1$).

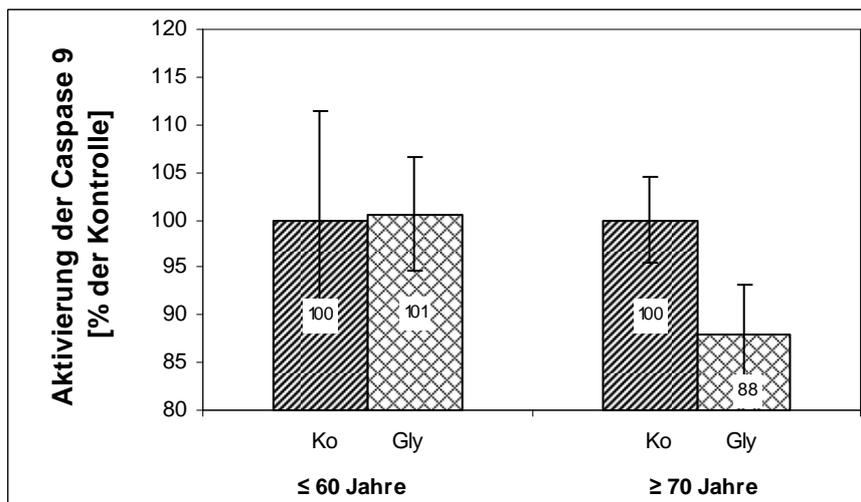


Abb. 14

Einfluss von Glyoxal auf die Aktivierung von Caspase 9 im humanen Myokardgewebe

Humane Myokardtrabekel von Erwachsenen (≤ 60 Jahre) und Senioren (≥ 70 Jahre) wurden im Organbad \pm von 1 mM Glyoxal wie in 3.1.1 beschrieben behandelt (ko – unbehandelte Kontrolle; Gly – 1 mM Glyoxal). Die Aktivierung von Caspase 9 wurde mittels der Western-Blot Analyse verifiziert. Die Kontrollen wurden auf 100 % normiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (≤ 60 Jahre: $n=10$; ≥ 70 Jahre: $n=9$) angegeben.

Zum weiteren Nachweis von zellulärem Stress bzw. Induktion der Apoptose im Rahmen der Behandlung von humanem Myokardgewebe mit Glyoxal wurde die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase durch den Einsatz von PARP Antikörper untersucht. Es ist ein Zielprotein der Interleukin Converting Enzyme sowie spezifischer Caspasen, insbesondere Caspase 3. PARP ist ein Reparaturenzym, das spezifisch an DNA-Strangbrüchen bindet. Durch die

Caspasen wird das 116 kDa große PARP in zwei Fragmente von 89 kDa und 24 kDa gespalten, was als spezifischer Marker zum Nachweis für Zellapoptose dient.

Es wurden auch hier jeweils behandelte Proben (1 mM Glyoxal) sowie unbehandelte Kontrollen der zwei Altersgruppen ≤ 60 (je $n=9$) und ≥ 70 (je $n=10$) Jahre untersucht. Zur Auswertung wurden die Werte der Banden des gespaltenen Fragmentes bei 89 kDa dem ungespaltenen Fragment bei 116 kDa gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt. Sowohl für die Gruppe der Erwachsenen, als auch für die Gruppe der Senioren zeigt sich im Vergleich zwischen den behandelten und unbehandelten Myokardgewebe kein signifikanter Unterschied (Erwachsene: $p=0,69$; Senioren: $p=0,27$).

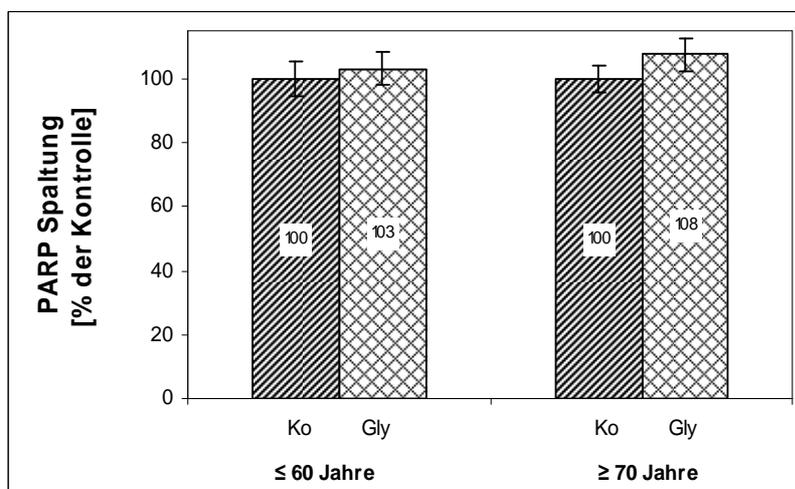


Abb. 15

Einfluss von Glyoxal auf die Spaltung von PARP im humanen Myokardgewebe

Humane Myokardtrabekel von Erwachsenen (≤ 60 Jahre) und Senioren (≥ 70 Jahre) wurden im Organbad ± 1 mM Glyoxal wie in 3.1.1 beschrieben behandelt (ko – unbehandelte Kontrolle; Gly – 1 mM Glyoxal). Die Spaltung von PARP wurde mittels der Western-Blot Analyse verifiziert. Die Kontrollen wurden auf 100 % normiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (≤ 60 Jahre: $n=9$; ≥ 70 Jahre: $n=10$) angegeben.

3.3.3 Expression von RAGE in Abhängigkeit von Glyoxal

Durch die Bindung von AGEs an zelluläre Rezeptoren wie RAGE werden Signalkaskaden sowie intrazellulärer oxidativer Stress induziert. Des Weiteren weiß man, dass bei Ischämie-Reperfusionsschäden die RAGE Expression induziert wird. Daher könnte der Glyoxal induzierte Schutz auch auf dieser Ebene nachweisbar sein. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob durch die Behandlung mit 1 mM Glyoxal im Vergleich zu den Kontrollen eine Veränderung der Proteinexpression von RAGE induziert wird. Dazu wurden die humanen Myokardtrabekel, nach initialem Organbadversuch, aufgearbeitet, Proteine isoliert und mittels des Western-Blot Verfahrens die Expression der Proteine bestimmt.

Zum Abgleich der Proteinexpression wurde als Beladungskontrolle Aktin verwendet. Die Banden für RAGE zeigten sich bei annähernd 55 kDa.

Die Versuche wurden für die Gewebeproben der Altersgruppen ≤ 60 und ≥ 70 Jahre durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

Untersucht wurden je 10 unbehandelte und behandelte Trabekel für beide Altersgruppen ≤ 60 Jahre und ≥ 70 Jahre. Nach Behandlung der Gewebeproben der Erwachsenengruppe zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant geringere Expression von RAGE ($p=0,034$). Auch im Myokardgewebe der Seniorengruppe besteht nach Glyoxaleinwirkung im Verhältnis zu den Kontrollen eine geringere Expression von RAGE, dies ist aber nicht signifikant ($p=0,2$).

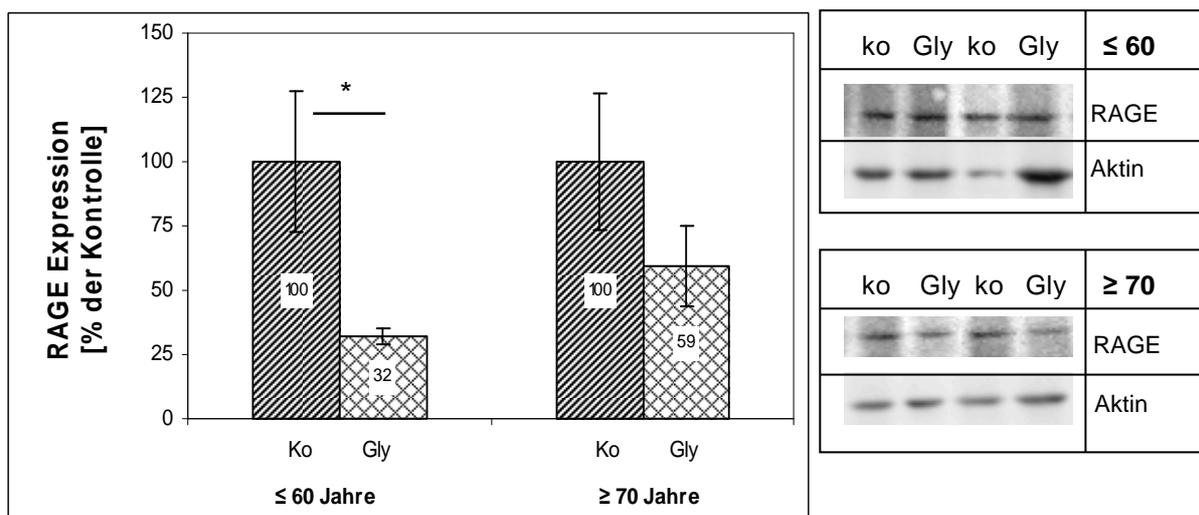


Abb. 16

Einfluss von Glyoxal auf die Expression von RAGE im humanen Myokardgewebe

Humane Myokardtrabekel von Erwachsenen (≤ 60 Jahre) und Senioren (≥ 70 Jahre) wurden im Organbad \pm von 1 mM Glyoxal wie in 3.1.1 beschrieben behandelt (ko – unbehandelte Kontrolle; Gly – 1 mM Glyoxal). Die Expression von RAGE wurde mittels der Western-Blot Analyse verifiziert und auf Aktin abgeglichen. Die Kontrollen wurden auf 100 % normiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=10$) mit $*p \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle angegeben.

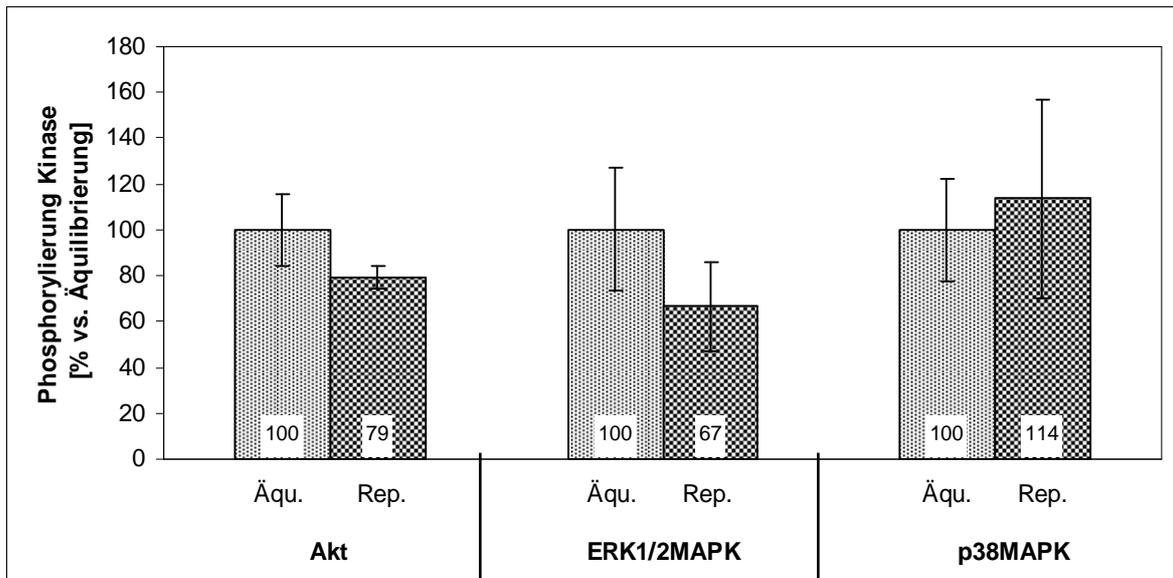
3.3.4 Einfluss der Ischämie / Reperfusion per se auf die Aktivierung der Kinasen (Akt, ERK1/2^{MAPK}, p38^{MAPK}), RAGE – Expression und Bildung von CML

Nachfolgend wurde untersucht, ob eine Abhängigkeit der Kinasenaktivierung von den unterschiedlichen Zeitpunkten im Organbadversuch bestehen. Die Myokardtrabekel von Patienten (n=4) beliebigen Alters (mittleres Alter= 58 Jahre) wurden jeweils zum Zeitpunkt der Äquilibration sowie zum Zeitpunkt nach 20 min Reperfusion nach vorausgegangener Ischämiephase von 30 min dem Organbad entnommen. Die Versuche erfolgten ohne Zugabe von Glyoxal. Die Herztrabekel wurden nach dem Organbadversuch in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei – 80 °C gelagert. Im Nachgang erfolgte die Isolierung der Proteine und Bestimmung der Expression mittels des Western- Blot-Verfahrens.

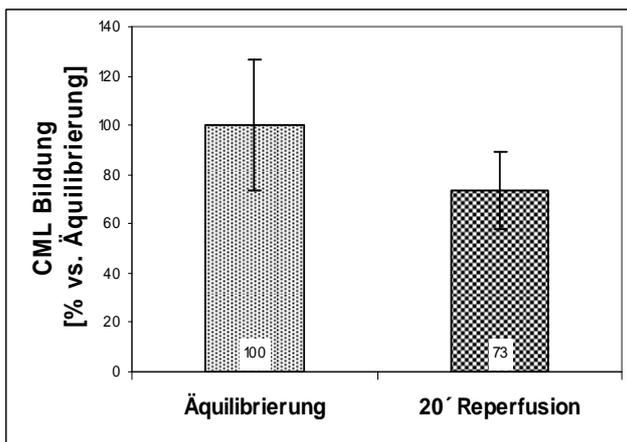
Zur Auswertung der Kinasenaktivierung wurden jeweils die phosphorylierten Formen mit den nicht-phosphorylierten Formen herangezogen. Zum Abgleich der Proteinexpression von CML und RAGE wurde als Beladungskontrolle Aktin verwendet.

In Abb. 17 (A-C) sind die Ergebnisse dargestellt. Signifikante Ergebnisse wurden nicht nachgewiesen.

A



B



C

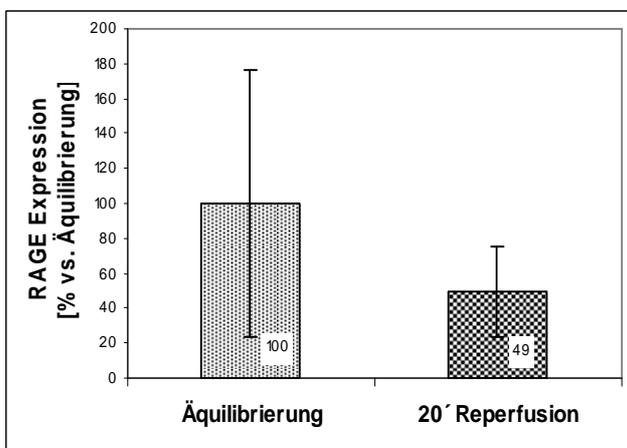


Abb. 17 (A-C)

Einfluss der Ischämie/ Reperfusion auf die Aktivierung von Kinasen, Expression von RAGE und Bildung von CML

Humane Myokardtrabekel wurden im Organbad unbehandelt nach der Äquilibrium sowie nach 20 min Reperfusion, nach vorausgegangener Ischämie von 30 min, entnommen. (Äqu. – Entnahme nach der Äquilibrium, Rep. – Entnahme nach 20 min Reperfusion). Die Phosphorylierung der Kinasen A) Akt, ERK1/2^{MAPK} und p38^{MAPK} sowie die B) Akkumulation von CML und C) Expression von RAGE wurde durch die Western-Blot Analyse verifiziert. Die Ergebnisse der Kinasen wurden durch Verhältnis der phosphorylierten zur unphosphorylierten Werte und die von CML und RAGE nach Abgleich auf Aktin ausgewertet. Die Werte nach der Äquilibrium wurden auf 100 % normiert. Es sind die Mittelwerte ± Standardfehler (n=4) angegeben.

3.4 Analyse der Glyoxalwirkung in Rattenmyozyten

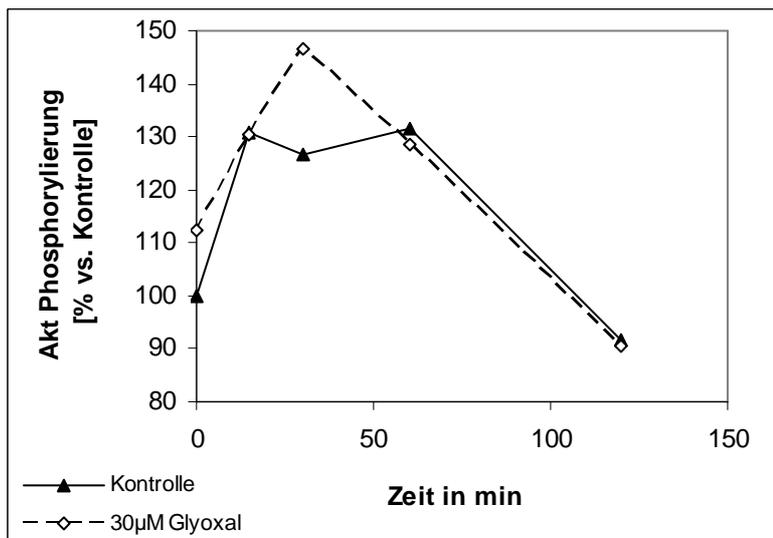
3.4.1 Abhängigkeit der Kinasenaktivierung Akt und ERK1/2^{MAPK} von der Glyoxalbehandlung zu verschiedenen Reperfusionzeitpunkten

Des Weiteren wurde versucht, die Ergebnisse aus den Organbadversuchen im Zellkulturmodell zu verifizieren. Dazu wurden kardiale Myozyten aus 300g schweren Ratten präpariert. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe wurde eine wirksame Konzentration von 30µM für Glyoxal identifiziert. Die Untersuchung erfolgte daher bei vorgenannter Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (jeweils n=3).

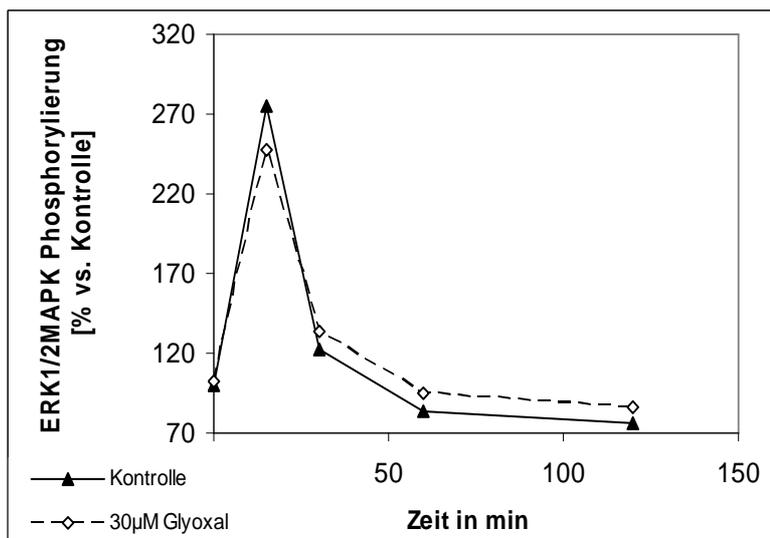
Die Simulation der Ischämie / Reperfusion an Rattenkardiomyozyten erfolgte nach dem Protokoll von Kim et al. (2006). Nach initialer Präinkubation der Myozyten mit Glyoxal für 90 min, folgte die Ischämiephase durch Inkubation für 3 h im Hypoxieschrank unter nahezu anaeroben Bedingungen (0,5% Sauerstoff). Anschließend erfolgte die Reoxygenierung / Reperfusion für insgesamt 2 h unter aeroben Bedingungen im Brutschrank. Nach Versuchende wurden die Zelllysate eingefroren und anschließend die Expression der Proteine mittels der Western- Blot Analyse bestimmt.

In den folgenden Diagrammen sind die Reperfusionzeitpunkte (0, 15', 30', 60' und 120') dargestellt. Zur Auswertung der Kinasen wurden jeweils die phosphorylierten Formen mit den nicht - phosphorylierten Formen herangezogen. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 A und B dargestellt. Die Aktivierungsintensität für die Kinase Akt ist verschieden für die Glyoxal behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Das Maximum der Aktivierung von Akt besteht bei den Glyoxal – behandelten Zellen nach 30 min, die Kontrollwerte verändern sich im Zeitraum zwischen 15 min und 60 min nur unwesentlich. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten von 60 und 90 min wird die Akt Kinase mit und ohne Behandlung in gleicher Weise aktiviert. Die Zeitkinetik für die ERK1/2^{MAPK} verhält sich für die behandelten Myozyten als auch für die unbehandelten Kontrollen gleichermaßen. Das Aktivierungsmaximum wird nach 15 min Reperfusion erreicht. Zu den Folgezeitpunkten sinkt die Aktivierung stetig ab und liegt bereits nach 60 min Reoxygenierung unterhalb des Ausgangsniveaus. Im Verlauf besteht hinsichtlich der Kinasenaktivierung von Akt als auch ERK1/2^{MAPK} zwischen den behandelten Myozyten und unbehandelten Kontrollen zu allen Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied.

A



B

**Abb. 18 (A-B)****Zeitabhängiger Einfluss der Glyoxalbehandlung auf die Aktivierung der Kinasen Akt und ERK1/2^{MAPK} in Rattenmyozyten**

Isolierte Rattenmyozyten wurden im Ischämie/Reperfusionversuch \pm 30 μ M Glyoxal wie folgt behandelt: Nach Präinkubation für 90 min wurden die Zellen für 3 h in Hypoxie mit KRH Puffer (pH 6,2) inkubiert und anschließend mit KRH Puffer (pH 7,4) für insgesamt 2 h reoxygeniert und die Aktivierung der Kinasen A) Akt und B) ERK1/2^{MAPK} zu den dargestellten Reperfusionzeitpunkten mittels Western-Blot Analyse detektiert. Die Ergebnisse der Kinasen wurden durch das Verhältnis der phosphorylierten zur unphosphorylierten Werte ausgewertet. Die unbehandelten Kontrollen zum Zeitpunkt 0 wurden auf 100 % normiert. Es sind die Mittelwerte (n=3) angegeben.

3.4.2 Abhängigkeit der Aktivierung von Caspase 9 von der Glyoxalbehandlung zu verschiedenen Reperfusionzeitpunkten

Nach Simulation der Ischämie und Reperfusion an Rattenkardiomyozyten wurden im Rahmen der Versuche außerdem die Aktivierung der Caspase 9 mittels Western-Blot Analyse bestimmt. Die Untersuchung erfolgte in Doppelbestimmung nach Behandlung der Myozyten mit 30 μM Glyoxal bzw. als unbehandelte Kontrollen ($n=2$). Daten konnten lediglich zu den Reperfusionzeitpunkten nach 60 min und 120 min ausgewertet werden. Zur Auswertung erfolgte die Gegenüberstellung der Werte der Banden der gespaltenen Fragmente bei 35 / 37 kDa denen des ungespaltenen Fragmentes bei 47 kDa. In der Abb. 19 ist ersichtlich, dass sowohl nach 60 min als auch nach 120 min Reperfusion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nach Glyoxalbehandlung eine geringere Aktivierung von Caspase 9 nachweisbar ist.

Die Ergebnisse nähern sich nach 60 min mit $p=0,07$ der Signifikanz an. Nach 120 min Reperfusion besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,49$).

PARP hat in diesem Experiment nicht funktioniert und auch Caspase 3 war mittels der Western-Blot Analyse nicht nachweisbar.

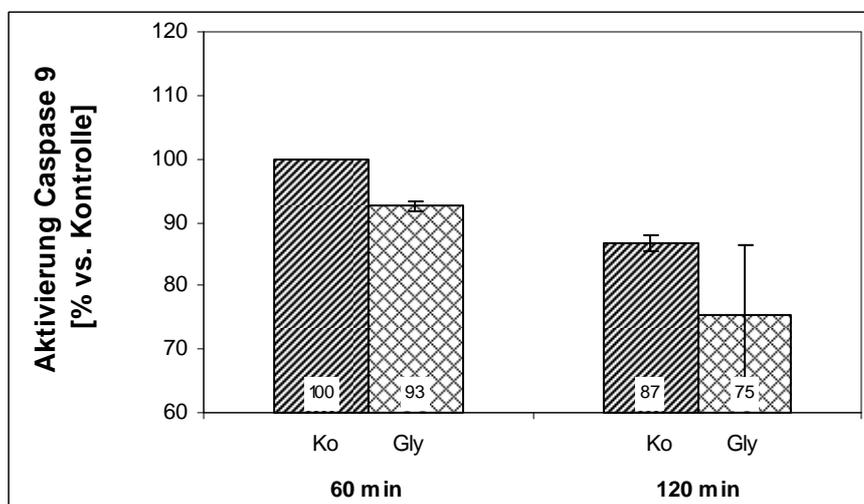


Abb. 19
Zeitabhängiger Einfluss der Glyoxalbehandlung auf die Aktivierung der Caspase 9 in Rattenmyozyten

Isolierte Rattenmyozyten wurden im Ischämie/Reperfuionsversuch \pm 30 μM Glyoxal (ko – unbehandelte Kontrolle; Gly – 30 μM Glyoxal) wie folgt behandelt: Nach Präinkubation für 90 min wurden die Zellen für 3 h in Hypoxie mit KRH Puffer (pH 6,2) inkubiert und anschließend mit KRH Puffer (pH 7,4) für insgesamt 2 h reoxygeniert und die Aktivierung der Caspase 9 zu den dargestellten Reperfusionzeitpunkten mittels Western-Blot Analyse detektiert. Die unbehandelten Kontrollen zum Zeitpunkt 60 min Reperfusion wurden auf 100 % normiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=2$) angegeben.

3.5 Zelltodnachweis im Organbadversuch durch Bestimmung der LDH Freisetzung im Überstand

3.5.1 Einfluss von Glyoxal auf die LDH Freisetzung im Organbadversuch

Es wurde untersucht, ob es nach der Ischämie und Reperfusion im Rahmen der Membranschädigung zu vermehrter LDH - Freisetzung als Maß für das Absterben von Zellen kommt. Dazu wurden die Proben (Überstände) aus den Organbadversuchen verwendet.

Die Myokardtrabekel von Patienten (n=3) beliebigen Alters (mittleres Alter 60,7 Jahre \pm 5,9 Jahre) wurden im Organbad \pm 1 mM Glyoxal in Doppelbestimmung behandelt. Die Überstände je n=6 der unbehandelten Kontrollen sowie behandelten Trabekel wurden nach 15 min Präinkubation, 30 min Ischämie und 20 min Reperfusion entnommen und mittels LDH - Release Assay vermessen. Der Mittelwert aus den 2 Kontrollwerten nach 15 min Präinkubation jeden Versuches bildete den Basiswert, mit dem die jeweiligen Messwerte eines Versuches abgeglichen wurden. In Abb. 20 sind die Ergebnisse dargestellt. Zu allen drei Zeitpunkten wird bei der Behandlung mit Glyoxal signifikant weniger LDH freigesetzt, als bei den Kontrollen (nach 15 min Präinkubation: $p = 0,003$; nach 30 min Ischämie: $p = 0,048$, nach 20 min Reperfusion: $p = 0,002$). Dies führt zu der Aussage, dass durch die Behandlung mit 1 mM Glyoxal im Vergleich zu den Kontrollen signifikant weniger Zellen dem Zelltod durch Nekrose unterliegen.

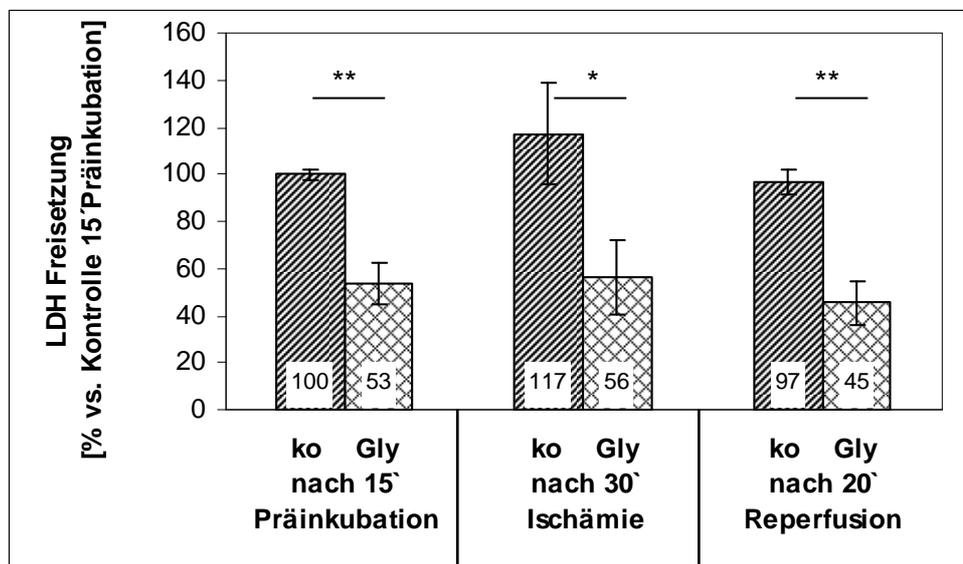


Abb. 20

Einfluss von Glyoxal im Ischämie / Reperfusionsversuch im Organbad auf den Zelltod

Humane Myokardtrabekel wurden im Ischämie / Reperfusionsversuch im Organbad \pm 1 mM Glyoxal (ko – unbehandelte Kontrolle; Gly – 1 mM Glyoxal) nach der Äquilibration für 15 min präinkubiert. Danach folgten 30 min Ischämie und 20 min Reperfusion. Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde der Überstand entnommen und der Anteil des Zelltodes mittels LDH-Release Assay analysiert. Die Ergebnisse sind auf 100 % der Kontrollen (nach Präinkubation) normiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=6) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle angegeben.

3.5.2 Einfluss von Caspaseinhibitor auf die LDH Freisetzung im Organbadversuch

Des Weiteren wurde der Einfluss der Behandlung von humanem Myokardgewebe mit Caspase-3 - Inhibitor auf die Freisetzung von LDH untersucht. Myokardtrabekel von Patienten (n=9) beliebigen Alters (mittleres Alter 64,4 Jahre \pm 1,8 Jahre) wurden im Organbad \pm der Zugabe von 5 μ M Caspaseinhibitor bis auf einen Versuch in Doppelbestimmung behandelt. Die Überstände je n=17 der unbehandelten Kontrollen sowie behandelten Trabekel wurden nach 60 min Äquilibration, 30 min Ischämie sowie 20 min und 40 min Reperfusion entnommen und mittels LDH – *Release Assay* vermessen. Der Mittelwert aus den zwei Kontrollwerten nach 60 min Äquilibration jeden Versuches bildete den Basiswert, mit dem die jeweiligen Messwerte eines Versuches abgeglichen wurden.

In Abb. 21 sind die Ergebnisse dargestellt. Es wird nachgewiesen, dass sich die LDH-Freisetzung durch Inkubation mit 5 μ M Caspaseinhibitor gegenüber den unbehandelten Kontrollen zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikant verändert hat. In Verbindung mit den nicht signifikanten Veränderungen aller Analysen zur Apoptose kann daher vermutet werden, dass diese Form von Zelltod nicht zum LDH *Release* bzw. zum Ischämie-Reperfusionsschaden beiträgt.

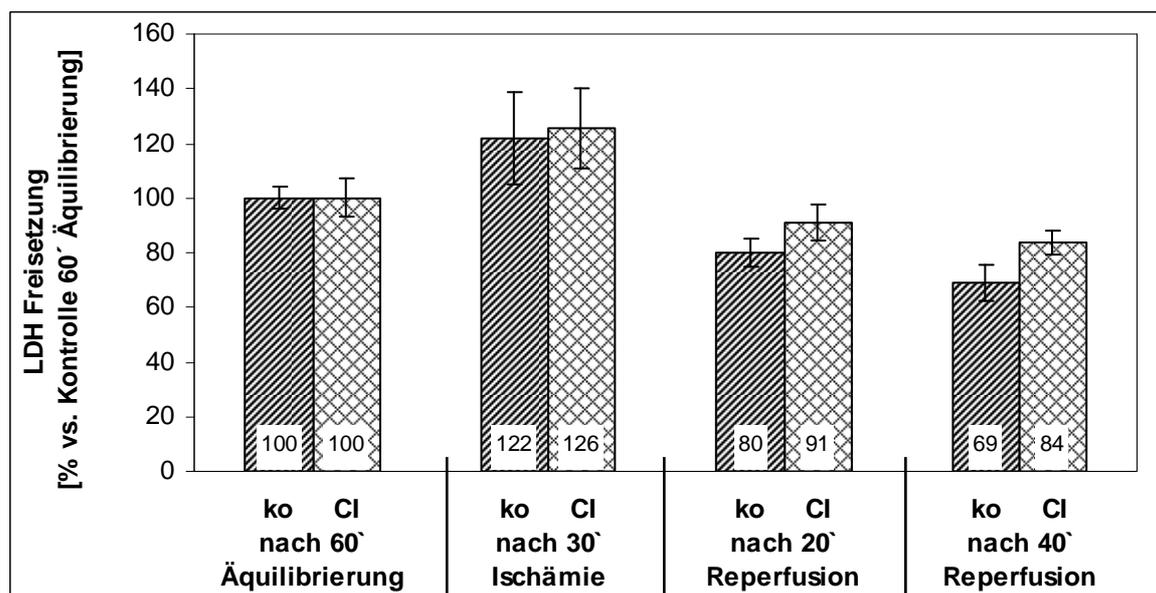


Abb. 21

Einfluss von Caspaseinhibitor im Ischämie / Reperfusionsversuch im Organbad auf den Zelltod
 Humane Myokardtrabekel wurden im Ischämie / Reperfusionsversuch im Organbad \pm 5 μ M Caspaseinhibitor (ko – unbehandelte Kontrolle; CI – 5 μ M Caspaseinhibitor) nach der Äquilibration von 60 min für 15 min präinkubiert. Danach folgten 30 min Ischämie und 40 min Reperfusion. Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde der Überstand entnommen und der Anteil des Zelltodes mittels LDH-*Release Assay* analysiert. Die Ergebnisse sind auf 100 % der Kontrollen (nach Präinkubation) normiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=17) angegeben.

4 Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind insbesondere in den Industriestaaten, so auch in Deutschland, die führende Todesursache (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2012), Prävalenz steigend. Diese umfassen sowohl Erkrankungen des Herzens, als auch der Blutgefäße. Grund dieser Entwicklung sind insbesondere veränderte Lebensgewohnheiten, die unter anderem umfassen: vermehrter psychischer Stress, reduzierte körperliche Betätigung, und fettreiche Ernährung. Aber auch die Zunahme der Lebenserwartung geht mit steigendem Risiko für Herzerkrankung einher, da ältere Patienten im Vergleich zu den jüngeren signifikant mehr Begleiterkrankungen und Risikofaktoren aufweisen (Friedrich et al., 2009). Mechanismen des Alterns sollten daher zur Ätiologie kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen. Mit erhöhter Lebenserwartung steigt andererseits auch das Alter der Patienten, zu dem sie sich Interventionen wie der Koronarangiographie aber auch Herz-chirurgischen Eingriffen unterziehen.

Die Reaktion von Glyoxal, ein Dicarbonyl, mit Proteinen führt zur Entstehung von AGEs (Wells-Knecht et al., 1995; Thornalley et al., 1999). AGEs selbst beziehungsweise ihre Interaktion mit ihren Rezeptoren stehen in Zusammenhang mit altersabhängigen Erkrankungen sowohl kardiovaskulärer, renaler aber auch neurodegenerativer Ätiologie (Simm et al., 2007), so dass deren Bildung zu einer der wichtigsten Alterungsmechanismen zählt. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass Glyoxal mit einer Konzentration von 10 mM im Organbad die Modifikation zellulärer Proteine induziert und die Kontraktion der humanen Myokard - Trabekel inhibiert. Am Anfang der Arbeit wurde daher angenommen, dass Glyoxal das Myokard altern lassen sollte und es empfindlicher gegenüber Ischämie-Reperfusionstress machen müsste. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der konzentrationsabhängige Effekt von Glyoxal im Ischämie-Reperfusionsversuch am humanen Myokard *ex vivo*, allerdings unter physiologischen Bedingungen im Organbad gezeigt werden. Des Weiteren wird dargestellt, welche Kinasen für diese unerwartete Schutzfunktion verantwortlich sein könnten.

4.1 Limitierung der Organbadversuche am humanen Myokard *ex vivo*

Die Untersuchung humaner Herzmuskeltrabekel im Organbad stellt eine große Bedeutung für die Untersuchung von exo- wie endogenen Einflüssen auf kontraktile Auswirkungen des Myokards dar. Die Zuordnung der Trabekel zu den Kontrollen bzw. behandelten Trabekeln mit Glyoxal erfolgte zufällig. Des Weiteren war ein direkter Vergleich von behandelten und unbehandelten Trabekeln eines Herzohres nicht immer möglich.

Die Trabekel selbst können gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur- und pH-Wert-Schwankungen der Lösungen, aber auch mechanischen Störfaktoren wie inadäquate Scherkräfte, Zug oder Erschütterung anfällig sein.

Zur Durchführung der Versuche werden Trabekel aus dem Herzohr, Myokard des rechten Vorhofes, das während des kardio-chirurgischen Eingriffs bei Anschluss der extrakorporalen Zirkulation entfernt wird, verwendet. Somit wurden unsere Untersuchungen *ex vivo* lediglich am humanen Vorhofmyokard, nicht am Ventrikelgewebe durchgeführt. Dabei ist bekannt, dass Ergebnisse am Vorhof nicht direkt auf Ventrikel übertragen werden können. Experimentell sind Untersuchungen am ventrikulären Myokard allerdings nur bei Herz - transplantierten Patienten möglich. Nachteilig hier wiederum ist, dass das Myokardgewebe vergleichsweise hochgradige Dysfunktionen aufweist und somit auch in diesem Falle die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf altersentsprechendes Gewebe fraglich bleibt.

Insgesamt betrachtet erlauben unsere Ergebnisse nur bedingt Rückschlüsse auf das gesamte Myokard, insbesondere das linksseitige Ventrikelmyokard.

4.2 Einfluss von Glyoxal auf humanes Myokardgewebe nach Ischämie-Reperfusion

4.2.1 Analyse der Wirkung von Glyoxal auf die Kontraktionskraft

Die AGE – Bildung erfolgt u.a. aus reaktiven Dicarboxylintermediaten. Eines der wichtigsten Intermediärprodukte ist Glyoxal. Während der Oxidation zu diesen Intermediärprodukten entstehen ROS wie das Hyperoxid-Anion (Nawroth et al., 1999). Daneben trägt auch die Bindung von AGE an zelluläre Rezeptoren wesentlich zur Bildung von oxidativem Stress bei (Nawroth et al., 1999; Wautier et al., 2001).

In unseren Versuchen beobachteten wir die Kontraktionskraft von humanen Vorhoftrabekeln nach einem Ischämie-Reperfusionsversuch unter Behandlung mit Glyoxal im Vergleich zu Kontrollgewebe. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei hoher Glyoxal-Konzentration von 10 mM keine Kontraktion der Trabekel mehr auszulösen war. Anhand der Ausgangssituation zu Beginn der Versuche war davon auszugehen, dass die Kontrollen im Vergleich zu den behandelten Trabekeln nach der Ischämie eine deutlich höhere Kontraktionskraft aufzeigen sollten. Somit erwarteten wir unter Behandlung des Myokards mit Glyoxal im Vergleich zum Kontrollgewebe einen Leistungsabfall sowohl vor als auch nach der Ischämie. Die erhaltenen Resultate waren unerwartet, denn die Versuchsergebnisse unserer Arbeit zeigten, dass die Behandlung mit 1 mM Glyoxal sowohl jüngeres, als auch älteres humanes Myokardgewebe signifikant vor Ischämie-Reperfusionsschaden schützt. Zudem wird im alten humanen Myokard gezeigt, dass der protektive Effekt von Glyoxal vor Ischämie-Reperfusionsschaden bereits bei geringen Konzentrationen besteht und eine Konzentrationsabhängigkeit der

Wirkung (0,01 mM – 0,3 mM) nachweisbar war. Im Gegensatz zu unseren Daten wird von Shangari et al. (2003) gezeigt, dass selbst geringe Konzentrationen ($< 10 \mu\text{M}$) von Glyoxal die Zytotoxizität erhöhen, indem das zelluläre antioxidante System inhibiert wird. Dabei ist allerdings zu beachten, dass diese Versuche an isolierten Ratten-Leberzellen durchgeführt wurden und schwierig mit unseren Ergebnissen vergleichbar sind.

Unter physiologischen Zellbedingungen wird Glyoxal intrazellulär unter anderem über das Glyoxalasesystem abgebaut. Die Arbeit von Abordo et al. (1999) macht deutlich, dass bei erhöhtem oxidativem Stress die Glyoxalkonzentration erhöht ist, da die Glyoxalase I bei reduzierten Kofaktoren, wie GSH, inhibiert wird. Zudem wurde bereits gezeigt, dass höhere Glyoxal - Konzentrationen selbst zytotoxisch wirken, indem sie GSH reduzieren, Sauerstoffradikale produzieren und infolge das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht (Shangari et al., 2003). Kontrovers dazu wiesen die Ergebnisse von Akhand darauf hin, dass im humanen Endothel Glyoxal zu einer Konzentration von 1 mM keinen Einfluss auf den GSH – Gehalt hat (Akhand et al., 2001).

Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, dass, wenn Glyoxal zytotoxisch wirkt und es im Rahmen der Ischämie aufgrund erhöhtem oxidativem Stress vermindert abgebaut werden kann, es während der Reperfusion zu einer erhöhten Kontraktionskraft im Myokardgewebe führt?

Kontroverse Daten liegen hinsichtlich der Toleranz nach Ischämie / Hypoxie in gealtertem Myokard vor. Nach unseren Ergebnissen besteht zwischen der funktionellen Erholung, der Reperfusion, nicht-behandelter Herzmuskeltrabekel nach Ischämie und dem Alter keine Beziehung, da sich im Vergleich zwischen dem Myokard der Senioren und dem von Erwachsenen kein signifikanter Unterschied der Kontraktionskraft zeigt. Eine Erklärung hierfür könnte die kleine Gruppengröße und die große Variabilität innerhalb der humanen Proben sein. Diese Daten werden durch eine frühere Arbeit von Simm et al. (2008) gestützt. Hier wurde gezeigt, dass, in Übereinstimmung mit unseren Daten, das Ausmaß der Nekrose an humanen Kardiomyozyten nach Ischämie altersunabhängig ist (Loubani et al., 2003). In der Studie von Mariani et al. (2000) wird allerdings dargestellt, dass die Kontraktionskraft des alternden humanen Myokards nach Ischämie / Hypoxie signifikant im Vergleich zu dem von Individuen ≤ 60 Jahren reduziert ist. Dennoch sind auch wir der Meinung, dass Modifikationen der myokardialen Funktion grundsätzlich mit dem Alter assoziiert sind. Die abweichenden Ergebnisse hinsichtlich der Toleranz nach Ischämie sind möglicherweise Folge der Größe und Komposition bezüglich Vorerkrankungen des Patientenkollektives.

4.2.2 Einfluss von Glyoxal auf die Bildung von Modifikationen im humanen Myokard

Glyoxal reagiert mit Aminosäureseitenketten wie z.B. von Lysin, was zur Bildung von CML, eines der bisher wichtigsten AGE, führt (Thornalley et al., 1999). AGEs können durch die Ausbildung von Quervernetzungen, so genannten *crosslinks* (Ulrich und Cerami, 2001) Gewebe modifizieren und u.a. zu Funktionseinschränkungen mit infolge Ausbildung kardialer Fibrose bzw. Myokardversteifung und daraus resultierender kardialer Dysfunktion führen (Badenhorst et al., 2003). Steigende CML - Konzentrationen korrelieren mit erhöhten postoperativen Komplikationen nach Herz-chirurgischen Eingriffen, insbesondere mit Herz-spezifischen Komplikationen (Simm et al., 2007). Es wird diskutiert, dass AGEs direkte Biomarker für spezielle Erkrankungen wie z.B. Diabetes oder Niereninsuffizienz im Alterungsprozess sind und nicht nur ein Biomarker des Alterns.

In unserer Arbeit erfolgte der Nachweis der AGE - Bildung immunhistochemisch mittels des anti-CML-Antikörpers. Anhand der vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, dass wie erwartet durch die Behandlung mit Glyoxal die CML – Bildung im Vergleich zu den Kontrollen deutlich ansteigt (Thornalley et al., 1999; Kasper et al., 2000). Außerdem kann in vorliegender Arbeit dargestellt werden, dass das Ausmaß der CML-Bildung direkt mit der Glyoxalkonzentration korreliert. Bereits durch Glomb und Monnier (1995) wurde gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen Glyoxal eine unmittelbare Vorstufe in der Bildung von CML darstellt. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurde zudem in humanen embryonalen Lungenepithelzellen (Kasper et al., 2000) sowie Retinazellen (Reber et al., 2002) nach Inkubation mit Glyoxal eine gesteigerte Bildung von CML nachgewiesen. Betrachtet man in unserer Arbeit die Kontraktionsentwicklung nach 40 Minuten Reperfusion im Organbad in Abhängigkeit von der konzentrationsabhängigen Bildung von CML zeigt sich interessanterweise eine signifikante positive Korrelation, indem Glyoxal sowohl zur vermehrten Bildung von CML, als auch zur myokardialen Kontraktionssteigerung führt. Wie bereits zuvor beschrieben führt die vermehrte Bildung von AGEs durch deren *crosslinks* u.a. zu kardialer Fibrose und damit funktionellen Defiziten (Badenhorst et al., 2003), so dass eine gesteigerte Kontraktionskraft langfristig sicherlich nicht zu erwarten war. Mögliche Wege der kardioprotektiven Wirkung von Glyoxal werden in folgenden Abschnitten anhand unserer Ergebnisse und bereits vorliegender Daten diskutiert und in Abb. 22 dargestellt.

Weitere Modifikationen wie Pentosidin und Arg-Pyrimidin konnten dagegen nicht in Abhängigkeit von Glyoxal nachgewiesen werden. Pentosidin entsteht bei der Reaktion zwischen Pentosen mit Lysinen bzw. Argininen (Sell und Monnier, 1989). Die erwartete konzentrationsabhängige Bildung der Modifikation konnten wir allerdings nicht darstellen. In der Arbeit von Kasper et al. (2000) wurde immuncytochemisch im humanen Zellkulturmodell

eine erste Reaktion mit dem Antikörper gegen Pentosidin im Vergleich zu CML bei einer 2-fach höheren Glyoxalkonzentration (200 μ M) nachgewiesen.

Arg-Pyrimidin ist insbesondere ein Reaktionsprodukt aus Methylglyoxal und Arginin, 3 DG-Imidazolone wird aus dem Dicarboxyl 3-Deoxy-glucoson mit reaktiven Arginin-Aminogruppen gebildet (Thornalley et al., 1999). Die Nachweisbarkeit von Arg-Pyrimidin kann wahrscheinlich auf die altersentsprechende physiologische Bildung im humanen Gewebe zurückgeführt werden. Daher ist der fehlende Einfluss von Glyoxal auf vorgenannte AGE-Produkte nicht unerwartet.

4.2.3 Expression des AGE-Rezeptors nach Glyoxal-Behandlung

Mit der Bindung von AGE an RAGE werden NADPH-oxidasen aktiviert, die zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies führen und damit intrazellulären oxidativen Stress induzieren (Wautier et al., 2001). Über die Aktivierung von Signalkaskaden wird der NF- κ B *Pathway* stimuliert, der zu einer inflammatorischen Reaktion führt (Kislinger et al., 1999; Bierhaus et al., 2001). Da die Expression von RAGE selbst durch NF- κ B induziert wird, erhöht sich die Expression von RAGE in einer so genannten positiven Rückkopplung. Der daraus resultierenden zellulären Dysfunktion im Rahmen der AGE-RAGE Interaktion werden Komplikationen von diversen chronischen Erkrankungen wie der Niereninsuffizienz oder Diabetes zugeschrieben (Kislinger et al., 1999; Lindsey et al., 2009a).

Die Expression von RAGE im humanen Myokard nach Glyoxalbehandlung zeigt ein unerwartetes Ergebnis: In beiden Altersgruppen ist die RAGE Expression im direkten Vergleich mit den Kontrollergebnissen vermindert. Trotz erhöhter Bildung von Proteinmodifikationen, CML, nach Glyoxalbehandlung wurde bei den Erwachsenen eine signifikant geringere RAGE - Expression nachgewiesen. In den Versuchen mit dem Myokardgewebe der Senioren zeigte sich zwar ebenfalls die Tendenz der verminderten Expression im Vergleich zu den Kontrollen, allerdings keine Signifikanz.

Die Expression des AGE – Rezeptors wird nach bisher aufgefasster Theorie neben ROS (Yao und Brownlee), NF- κ B (Bierhaus et al., 2001) und TNF- α insbesondere auch durch AGE selbst stimuliert (Tanaka et al., 2000). Dabei wurde gezeigt, dass AGE sowohl die Genexpression als auch den Proteingehalt von RAGE in humanen Gefäßendothel-Zellen induzieren. Unbehandelte Endothelzellen exprimieren dagegen nur wenig oder kein RAGE (Nawroth et al., 1999). Auch in weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die RAGE-Expression an Gefäßen von Patienten mit okklusiven Gefäßerkrankungen wie z.B. Diabetikern und Alzheimer Patienten, sozusagen Erkrankungen, die mit erhöhter AGE-Akkumulation assoziiert sind (Baynes und Thorpe, 1999; Baynes, 2000; Baynes und Thorpe,

2000), induziert wird (Ritthaler et al., 1995; Schmidt et al., 1999). Dies hätte zur Folge, dass weitere Bindungspartner für AGE entstehen, ein *circulus vitiosus*.

Der Unterschied zu unserer Arbeit ist dabei, dass die Behandlung des Myokards mit Glyoxal und nicht direkt mit AGEs erfolgte. Im Tiermodell wurde RAGE nach exogener Zufuhr von Dicarboxylen (Methylglyoxal) über mehrere Wochen im Kontrollvergleich in höherer Expression nachgewiesen (Berlanga et al., 2005). Inwieweit dies allerdings auf einen indirekten Effekt über die Glyoxal induzierten Proteinmodifikationen beruht bleibt ungeklärt. Der Grund für die durch uns nachgewiesene reduzierte RAGE – Proteinexpression nach Glyoxalbehandlung kann vorerst ebenfalls nicht geklärt werden. Wirkt Glyoxal durch die Inhibierung (Inaktivierung / Downregulation) der RAGE-Expression protektiv? Bereits Ergebnisse früherer Arbeiten ließen vermuten, dass Dicarboxyle die Funktion von Rezeptoren, den EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptor (Portero-Otin et al., 2002) und PDGF (*platelet – derived growth factor*) - Rezeptor (Cantero et al., 2007) beeinträchtigen können. Auch eine Schädigung zellulärer Proteine des Insulinsignalweges nach Dicarboxylbehandlung wurde im Tierzellkulturmodell aufgezeigt (Riboulet-Chavey et al., 2006). Zu diskutieren ist die Modifikation des Rezeptors direkt oder dessen Bindungsstelle, was den Rezeptor danach inhibiert und als solches nicht mehr erkennen lässt, sodass auch die Detektion durch den Antikörper nicht möglich ist. Nach Ergebnissen einer früheren Arbeit, in der der Einfluss von Dicarboxylen auf den EGF-Rezeptor untersucht wurde, wird vermutet, dass Glyoxal / Methylglyoxal eine Inhibierung der EGF-Rezeptor–Kinase induzieren und damit die Autophosphorylierung des Rezeptors und anschließenden Kinasekaskade inhibieren (Portero-Otin et al., 2002). Alternativ könnte die Downregulation durch erhöhten Rezeptor – Abbau als Ätiologie der verminderten Proteinexpression erklärt werden. So kann in Betracht gezogen werden, dass die Modifikation von RAGE durch Glyoxal zum Abbau des Rezeptors führt. Es ist bekannt, dass modifizierte Proteine nach Markierung, Ubiquitinierung, proteosomal (Vadasz et al., 2012) u.a. über das 26S Proteosom bzw. lysosomal (Bahr et al., 2012) eliminiert werden. Ein weiterer Aspekt wäre die Internalisierung nach Glyoxalbindung an RAGE mit anschließender Degradierung des Rezeptors.

Vorgenannte Möglichkeiten führen zur verminderten RAGE – Expression. Mittels unserer Experimente kann nicht differenziert werden, welcher Weg darauf begründet. Insgesamt betrachtet sind daher weitere Untersuchungen notwendig, um den Mechanismus der verminderten Expression zu klären.

Ischämie / Reperfusion induziert die Expression von RAGE und auch deren Liganden, was wiederum den Ischämie–Reperfusionsschaden erhöht (Bucciarelli et al., 2006). Durch vorgenannte Autoren wurde im Tiermodell dargestellt, dass der LDH-Release während der Reperfusion im Myokard bei RAGE-Null Mäusen und sRAGE behandelten Ratten im

Vergleich zu den Kontrollkardiomyozyten geringer ist (Bucciarelli et al., 2006), was impliziert, dass mit sinkender RAGE-Expression der Ischämie-Reperfusionsschaden reduziert wird. Zudem wurde auch beschrieben, dass sich mit der Blockierung von RAGE die Schäden und Dysfunktion am Myokard, gemessen am geminderten LDH-Release und der verbesserten Entwicklung des Linksventrikulären Drucks, nach Ischämie-Reperfusion reduzieren (Bucciarelli et al., 2008).

4.2.4 Klinische Relevanz der Interaktion zwischen AGE und AGE-Rezeptor

Die klinische Relevanz der AGE und deren Interaktion mit RAGE sind zweifelsohne von enormer Bedeutung. Durch die Behandlung mit ALT-711, einem *cross-link-breaker*, konnte bereits im Tiermodell sowohl bei Ratten (Candido et al., 2003), als auch bei Hunden (Liu et al., 2003) gezeigt werden, dass die myokardiale Dysfunktion reduziert werden kann. Auch die Hemmung der Interaktion zwischen AGE und RAGE durch die Überexpression von sRAGE ist ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt für die Zukunft. Die Applikation von sRAGE, eine lösliche extrazelluläre Domäne von RAGE, führt zur Hemmung der AGE-RAGE – Interaktion durch Bindung des Liganden an sRAGE selbst und verhindert die Bildung von atherosklerotischen Plaques in diabetischen Mäusen (Park et al., 1998). In humanen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass im Vergleich zu Gesunden geringere Konzentrationen von sRAGE bei Patienten mit koronarer Arteriosklerose (Falcone et al., 2005), akuten ischämischen Schlaganfällen (Park et al., 2009) und auch Diabetes Mellitus (Basta et al., 2006) nachweisbar sind. sRAGE wird damit die Eigenschaft als Biomarker für chronische, inflammatorische Erkrankungen wie Niereninsuffizienz und Diabetes zugeschrieben (Maillard-Lefebvre et al., 2009). In diesem Zusammenhang ist zu klären, ob Glyoxal ggf. einen Einfluss auf die Expression von sRAGE hat und über diesen Weg somit kardioprotektiv wirkt.

4.3 Analyse der Wirkung von Glyoxal auf zellulärer Ebene

4.3.1 Im humanen Myokard

In unseren Resultaten wird nach Glyoxalbehandlung kein signifikanter Einfluss auf die Caspase 9 im Vergleich zu den unbehandelten Trabekeln in beiden Altersgruppen nachgewiesen. In unterschiedlichsten Arbeiten wurde dagegen gezeigt, dass sich die Caspaseaktivität nach Behandlung mit Glyoxal erhöht und in Folge Apoptose zellulär induziert wurde, verdeutlicht u.a. durch die Erhöhung von Fractin (durch Caspase gespaltenes Aktinfragment) (Kasper et al., 2000; Tippelt et al., 2004). Im Rahmen der Aktivierung der Caspase 9 wird die Caspase-Signalkaskade aktiviert (Adams, 2003; Chen et al., 2008), was wiederum zur Aktivierung weiterer Caspasen, unter anderem der Caspase 3 (ein Schlüsselenzym, während der späten Phase der Apoptose) führt. So wird mit der Inkubation von Glyoxal die Aktivierung von Caspase 3 in verschiedenen Zellexperimenten u.a. in humanen embryonalen Lungenzellen (Kasper et al., 2000) und kapillären Retinaperizyten von Rindern (Liu et al., 2004) beschrieben. Untersuchungen der Apoptoseinduktion durch Glyoxal sind insgesamt umfassend, so dass auch in Retinazellen nach der Inkubation mit steigenden Konzentrationen von Glyoxal Apoptose induziert wird, nachgewiesen mit der pH-Änderung und Caspase 3 - Aktivierung (Reber et al., 2002). In den Ergebnissen dieser Arbeit zeichnete sich unter Glyoxalbehandlung im Ischämie / Reperusionsversuch weder eine Aktivierung noch signifikante Inhibierung, aber in der Seniorengruppe eine tendentiell geringere Spaltung von Caspase 9 ab, was zu einigen der vorgenannten Arbeiten kontrovers ist. Allerdings führten wir unsere Versuche zum einen an humanem Myokardgewebe und zudem nicht an isolierten Zellen, Kardiomyozyten, durch. Ein weiterer wesentlicher Aspekt besteht im Hinblick auf die Zeitkinetik. So wurden vorbeschriebene Zellkulturexperimente unter Inkubation mit Glyoxal für mindestens 24 h durchgeführt (Kasper et al., 2000; Liu et al., 2004; Tippelt et al., 2004), in unseren Versuchen hingegen für ca. 3-4 Stunden, was impliziert, dass die Wirkung von Glyoxal neben der Konzentration zusätzlich von der Inkubationszeit abhängig ist.

Auch bei der Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP), ein Ziel der Caspasenkaskade, konnte in der vorliegenden Arbeit keine erhöhte Spaltung unter Glyoxalbehandlung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis geht mit anderen Untersuchungen an humanen Endothelzellen konform, bei denen gezeigt wurde, dass Glyoxal auch mit hohen Endkonzentrationen bis 10 mM die Spaltung von PARP nicht induziert (Akhand et al., 2001). PARP ist als körpereigenes Enzym nach Einwirkung von Umweltstress an der DNA-Reparatur beteiligt. Insbesondere die Caspase 3 und 7 sind maßgebend an der Regulation von PARP beteiligt und führen zum proteolytischen Abbau der Polymerase (Cohen, 1997). PARP ist wichtig für

die Zelle, um ihre Viabilität aufrecht zu erhalten. Die Spaltung des Enzyms (116 kDa) in Fragmente der Größe 24 kDa und 89 kDa ist ein Marker für zelluläre Apoptose (Kaufmann et al., 1993). Ein signifikanter Einfluss von Glyoxal auf der Ebene von Caspase 9 und PARP im Apoptose – *Pathway* fand sich nicht.

Im Vergleich zu den unbehandelten Trabekeln zeigte sich, dass zu den untersuchten Zeitpunkten, nach Präinkubation, Ischämie und Reperfusion, unter Einfluss von Glyoxal im LDH-Release Assay signifikant weniger LDH nachgewiesen werden kann, was impliziert, dass weniger Zellen durch Nekrose / späte Apoptose untergegangen sind. In der Arbeit von Breborowicz et al. (2004) wurde in der Zellkultur mit humanen Mesothelzellen des Peritoneums nach Inkubation mit Glyoxal ebenfalls weniger LDH – Freisetzung vermessen, allerdings nicht signifikant im Kontrollvergleich. Nach Behandlung von humanem Myokardgewebe im Ischämie / Reperfusionsversuch mit Caspase-3 - Inhibitor im Organbad wird im Kontrollvergleich keine signifikante Veränderung des LDH – *Release* nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass Glyoxal entweder in die Signalkaskade der Caspasen einwirkt, möglicherweise durch Inhibierung, und damit der Zelltod im Rahmen der Ischämie – Reperfusionsschäden reduziert wird, Caspase 3 hier keine Rolle spielt oder aber keine Apoptose stattfindet.

Es wird angenommen, dass Kinasen, die zum Überleben beitragen, wie PI3K-Akt und ERK1/2^{MAPK}, anti-apoptotische Effekte induzieren und somit das Myokard vor Reperfusionsschaden schützen (Hausenloy und Yellon, 2004; Hausenloy et al., 2005). Die Proteinkinase B (Akt) z.B. fördert das Überleben einer Zelle, indem es durch die Phosphorylierung und Inaktivierung von mehreren Targets (Fayard et al., 2005), unter anderem Caspase 9, die Apoptose unterbindet. Sie nimmt damit eine wesentliche Stellung zur Kontrolle zwischen Überleben und programmierten Zelltod ein (Franke et al., 1997). Mit der Glyoxalbehandlung in unseren Versuchen werden sowohl beim Myokard der Erwachsenen, als auch dem der Senioren die Akt-Kinasen und die ERK1/2^{MAPK} aktiviert, was im Vergleich zu den Kontrollen zu einem deutlich signifikanten Anstieg der phosphorylierten Form dieser Kinasen führt. Die Kinase p38^{MAPK}, wurde lediglich im Myokard der Erwachsenen nach Behandlung mit Glyoxal stärker aktiviert, was als Stressindikator gesehen werden kann. Auch in der Seniorengruppe wird eine geringfügigere Aktivierung im Vergleich zu den Kontrollen verzeichnet, allerdings nicht signifikant.

Im Tiermodell mit Mäusen wurde bereits beschrieben, dass durch die Aktivierung von Akt Kardiomyozyten vor Ischämie-Reperfusionsschäden geschützt werden (Fujio et al., 2000). Daoud et al. (2001) zeigten in ihrer Arbeit, dass eine AGE-Inkubation die Kinasen ERK1/2^{MAPK} und auch p38^{MAPK} in primären Herzfibroblasten von erwachsenen Rattenherzen aktiviert. Auch in weiteren Tiermodell - Arbeiten wurde dargestellt, dass AGE die ERK1/2^{MAPK}

in Tubuluszellen der Niere (Zelllinie LLC-PK₁) (Simm et al., 1997) und auch von glatten Rattenmuskelzellen (Lander et al., 1997) aktivieren. Dies zeigt, dass im Rahmen vorgenannter Prozesse zellulärer Stress zur Aktivierung von Signalkaskaden führt.

Die Aktivierung der Kinasenkaskade wird auch als *Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)- Pathway* bezeichnet und als essentielle Größe der Kardioprotektion gesehen (Hausenloy und Yellon, 2004). Es wird angenommen, dass der *RISK-Pathway* sowohl durch ischämische Präkonditionierung (Tong et al., 2002), ischämische Postkonditionierung (Tsang et al., 2004), als auch pharmakologische Stimuli wie Insulin (Jonassen et al., 2001) oder Erythropoetin aktiviert wird (Hausenloy et al., 2005). Dabei kommt es zur Phosphorylierung von Akt bzw. Aktivierung von ERK1/2^{MAPK}. Die genauen Mechanismen, die den *RISK-Pathway* infolge der ischämischen Prä- und Postkonditionierung induzieren, sind bisher noch nicht komplett erklärt. Hausenloy et al. (2005) zeigen zwei mögliche Mechanismen des rezeptorvermittelten Schutzes, unter anderem durch die Aktivierung von Akt und ERK1/2^{MAPK}, als Resonanz nach einem Stimulus der ischämischen Präkonditionierung oder durch die Vermittlung über Adenosin, ROS bzw. die Proteinkinase C zum *RISK-Pathway*. Dieser bewirkt infolge die Inhibierung der mitochondrialen permeablen Transitions-pore (*mitochondrial permeability transition pore mPTP*) und schützt damit das Myokard (Hausenloy et al., 2005; Davidson et al., 2006). Der genaue Mechanismus wie vorgenannte *Survival-Kinasen* die *mPTP* inhibieren ist noch nicht ausreichend verstanden. Es wird vermutet, dass die Aktivierung von Akt u.a. zur Phosphorylierung der Glycogen Synthase Kinase (GSK) 3 β , der endothelialen Stickoxid (NO) Synthase sowie BAD (Bcl-2 assoziierter Todespromotor) führt (Fayard et al., 2005; Murphy und Steenbergen, 2008). Des Weiteren wird angenommen, dass die ERK1/2^{MAPK} ebenfalls den pro-apoptotischen Faktor BAD phosphoryliert und inhibiert (Murphy und Steenbergen, 2008).

Ischämie mit anschließender Reperfusion können über die Caspasenaktivierung (Holly et al., 1999) Apoptose induzieren (Fliss und Gattinger, 1996; Murphy und Steenbergen, 2008). Ischämie / Reperfusion, ohne prä-ischämisch stimulierendes Agents, hatte nach unseren Ergebnissen keinen Einfluss, weder die *Survival-Kinasen* Akt und ERK1/2^{MAPK} noch die Stresskinase p38^{MAPK} wurden in den vorliegenden Versuchen im Rahmen einer 20-minütigen Reperfusion nach vorausgegangener 30-minütiger Ischämie signifikant aktiviert. Zudem konnten wir keine vermehrte Bildung von CML nachweisen. Möglicherweise sind diese unerwarteten Ergebnisse auf die geringe Sensitivität des Westernblots zurückzuführen. Andererseits unterstützen diese Resultate wiederum, dass Glyoxal nicht direkt sondern mehr über die Aktivierung der ERK bzw. Akt Kinasen den *RISK-Pathway* und somit auch die Caspasen beeinflusst und damit kardioprotektiv wirkt. Prinzipiell ist eine konzentrations-abhängige, inhibierende Wirkung direkt auf die Caspasen ebenfalls denkbar.

Letztendlich müssen aber weitere Versuche zeigen, ob diese vorgeschlagenen Wege ursächlich am Schutz des Myokards beteiligt sind. In Abb. 22 sind mögliche Wege der kardioprotektiven Wirkung von Glyoxal zusammengefasst.

4.3.2 In Rattenkardiomyozyten im Zellkulturmodell

Neben den in *vitro* Versuchen an humanem Gewebe wurden zur Verifizierung Versuche an Ratten-Kardiomyozyten vorgenommen. Sowohl die Pro-*survival* Kinase Akt als auch ERK1/2^{MAPK} wurden in behandelten Rattenmyozyten untersucht.

Nach maximaler Aktivierung der Kinasen ERK1/2^{MAPK} (nach 15 min-Reperfusionzeit) und Akt (nach 30 min Reperfusionzeit) sind diese sowohl bei den Kontrollen, als auch nach Behandlung mit Glyoxal nur noch gering nachweisbar. Anhand der Resultate, die sich bei einer Reperfusionzeit von 2 Stunden nach initialer 3-stündiger Ischämie darstellen, ist ersichtlich, dass die humanen Versuchsergebnisse nicht direkt auf die Rattenmyozyten übertragbar sind. Der genaue Hintergrund ist vorerst unklar.

Zur Beurteilung des Einflusses von Glyoxal auf die Caspasen untersuchten wir im Tiermodell des Weiteren die Aktivierung der Caspase 9. Dabei zeigt sich zu den Reperfusionzeitpunkten (60 min, 120 min) zwar im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen eine geringere Aktivierung, allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Dieses Ergebnis geht damit mit dem im humanen Myokard weitestgehend konform. Kontrovers zu diesen Daten sind Ergebnisse älterer Arbeiten, in denen die Induktion von Apoptose in der Zellkultur durch Glyoxal bzw. deren AGE u.a. durch die Aktivierung von Caspase 3 in humanen embryonalen Lungenepithelzellen (Kasper et al., 2000) als auch humanen Osteoblast-ähnlichen Zellen (Tippelt et al., 2004) dargestellt wurde. Insgesamt betrachtet, scheint der positive Effekt von Glyoxal sowohl in der Zellkultur als auch im Gewebe durchaus konzentrationsabhängig zu sein und schlägt auch bei hohen Konzentrationen in Gewebsschädigung um. Sowohl bei Kasper et al. (2000), als auch Tippelt et al. (2004) wurden im Vergleich zu unseren Versuchen höhere Konzentrationen in der Zellkultur angewandt. Zudem haben aber auch wir in früheren Versuchen zeigen können, dass hohe Glyoxalkonzentrationen (10 mM) im humanen Myokardgewebe toxisch sind.

Unsere Ergebnisse im humanen Myokard ließen sich nicht auf die Zellkultur im Tiermodell übertragen. Dabei ist die Komplexität des menschlichen Organismus u.a. im Rahmen der insbesondere im Alter zunehmenden Komorbiditäten, wie Adipositas, Diabetes Mellitus, arterielle Hypertonie und chronische Niereninsuffizienz von erheblicher Bedeutung.

4.4 Klinische Relevanz von Glyoxal

Akute myokardiale Ereignisse sind neben Neoplasien eine der häufigsten Todesursachen. Eine zeitnahe Reperfusion nach kardialer Ischämie ist und bleibt ein zentraler Aspekt. Entscheidend sind die mit dem Alterungsprozess einhergehenden kardiovaskulären Veränderungen (Lakatta, 2002), die zu Dysfunktionen und in deren Folge kardiovaskulären Erkrankungen, wie z.B. Herzinsuffizienz, akuten Myokardinfarkt, führen können.

Einerseits sind Ergebnisse nach Rekanalisierungstherapien durch den bereits gesetzten Ischämieschaden begrenzt (Bucciarelli et al., 2006), andererseits kann Reperfusion selbst über die Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden Reperfusionsschaden, dem sogenannten *reperfusion injury* induzieren (Murphy und Steenbergen, 2008).

Eine zentrale Bedeutung zur Kardioprotektion nimmt vermutlich der *RISK Pathway* ein, indem *Survival*-Kinasen aktiviert werden mit infolge Inhibierung der *mPTP* (Murphy und Steenbergen, 2008). Die *mPTP* und der *RISK-Pathway* scheinen daher zentrale Rollen zum Schutz des Myokards vor Ischämie-Reperfusionsschäden und auch Management weiterer kardiovaskulärer Erkrankungen einzunehmen.

Somit ist es von großem Interesse den Reperfusionsschaden zu reduzieren. In Abhängigkeit von der Konzentration ist die lokale Gabe von Glyoxal ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt, da wir zeigen konnten, dass Glyoxal konzentrationsabhängig in humanem Myokard signifikant vor Ischämie-Reperfusionsschaden schützt. Dabei ist allerdings neben dem hier dargestellten positiven Effekt die toxische Wirkung (Shangari et al., 2003) zu beachten. Zudem ist die korrelierende CML – Bildung nach Glyoxalbehandlung von nicht unerheblicher Bedeutung, da die AGE – Bildung neben Proteinmodifikationen und Induktion der Radikalbildung, insbesondere die Bildung von *crosslinks* in den Geweben und daraus resultierenden Funktionseinschränkungen, u.a. durch Fibrose, zur Folge haben. Hier fehlen Langzeitversuche, insbesondere z.B. im Tier, um dies beurteilen zu können.

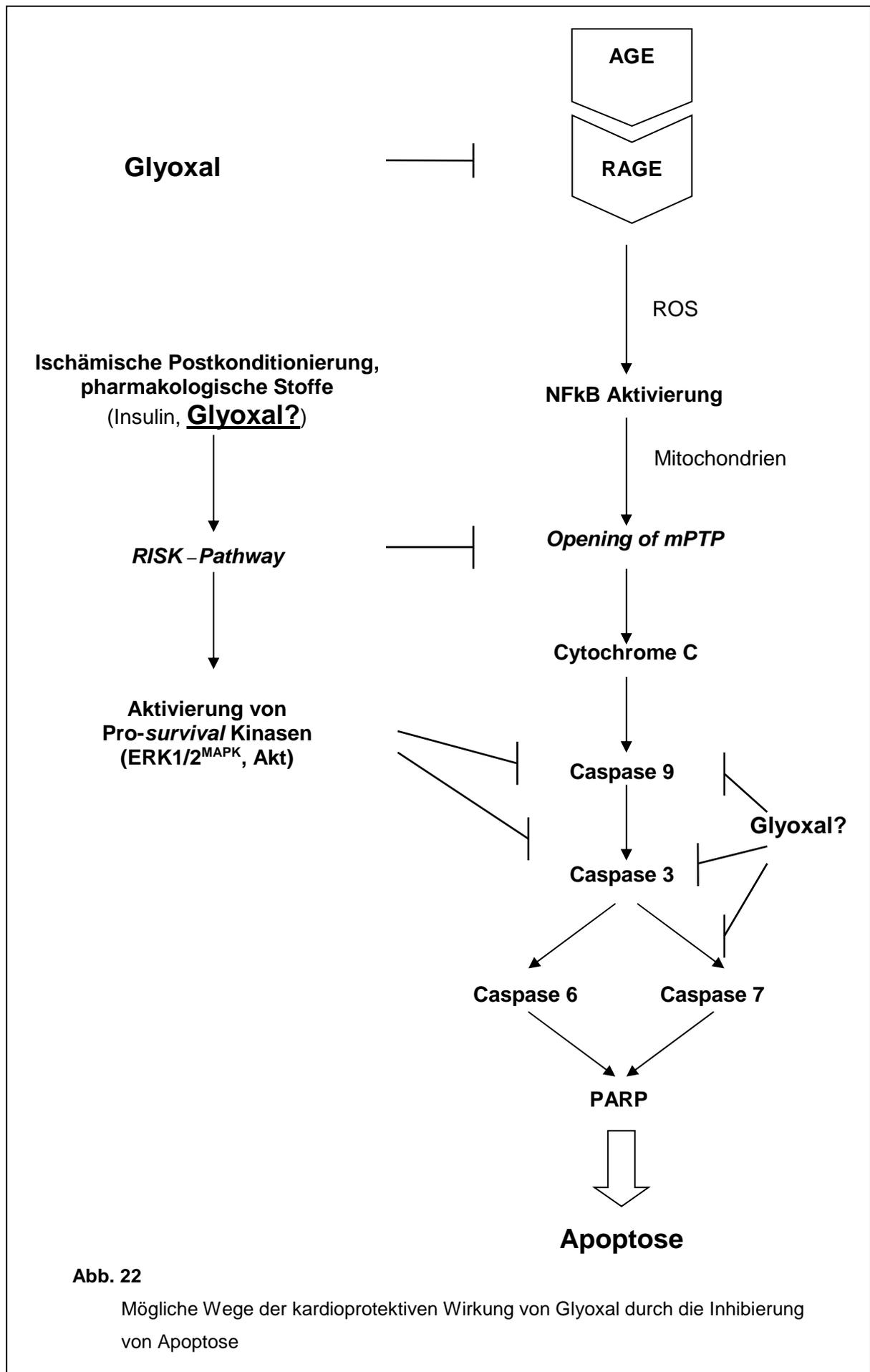


Abb. 22

Mögliche Wege der kardioprotektiven Wirkung von Glyoxal durch die Inhibierung von Apoptose

5 Zusammenfassung und Ausblick

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind insbesondere bedingt durch den Lebensstil, aber auch der steigenden Lebenserwartung die häufigsten Todesursachen der Industriestaaten.

Unter Behandlung von humanem Myokardgewebe untersuchten wir die Wirkung von Glyoxal, einem reaktiven Dicarbonyl, im Ischämie-Reperusionsversuch im Vergleich zu Kontrollgewebe. Glyoxal wird nach bisheriger Auffassung eine zytotoxische Wirkung zugeschrieben. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine 10 – fach höhere Konzentration, als die hier verwendete maximale Konzentration, die Kontraktion des humanen Myokards inhibiert.

Advanced glycation endproducts, u.a. Reaktionsprodukte aus Glyoxal und Proteinen, wird eine entscheidende Rolle bei der Ätiopathogenese von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zugesagt. Insbesondere die Interaktion von AGE mit deren Rezeptoren, RAGE, aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden, was zur Entstehung zellulärer Dysfunktionen führt und sich letztendlich in der Genese chronischer Erkrankungen wie z.B. Diabetes Mellitus und der koronaren Herzkrankheit, widerspiegelt. Eine zentrale Bedeutung der Kardioprotektion ist initial die Vorbeugung kardiovaskulärer Risikofaktoren und bei Auftreten eines akuten Ereignisses die Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens.

In dieser Arbeit wurden 63 Herzohren unter Berücksichtigung zweier Altersgruppen, jeweils aus dem rechten Vorhofmyokard während des kardio-chirurgischen Eingriffs der Patienten gewonnen, Trabekel präpariert und mit Glyoxal bzw. als Kontrolle *ex vivo*, unter physiologischen Bedingungen im Organbad, behandelt. Die Gewebeproben dienten im Anschluss der Untersuchung zellulärer Kinasen und Signaltransduktion.

Anhand unserer Ergebnisse kann nachgewiesen werden, dass unter Einfluss von Glyoxal die Kontraktionskraft konzentrationsabhängig im Ischämie-Reperusionsversuch im Kontrollvergleich signifikant verbessert wird. Korrelierend dazu lassen die signifikante Aktivierung der *Survival*-Kinasen Akt und ERK1/2^{MAPK} sowie die reduzierte Expression von RAGE der behandelten Trabekel einen kardioprotektiven Effekt vermuten. Untermuert werden diese Ergebnisse, indem unter isolierter Ischämie / Reperfusion von unbehandeltem Myokard kein Einfluss auf die *Survival*-Kinasen sowie RAGE – Expression dargestellt werden konnte. Hervorzuheben ist, dass, entsprechend zur verminderten RAGE-Expression, unter Glyoxal weniger Zelltod durch Nekrose, signalisiert im Rahmen des verringerten LDH-*Releases*, nachgewiesen werden konnte. Zudem wird eine inhibierende Wirkung von Glyoxal auf die Caspasenkaskade vermutet.

Anhand der in dieser Arbeit entstandenen Erkenntnisse ist es gegebenenfalls möglich, neuartige Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, die positiv inotrop auf Myokardgewebe, nach Ischämie-Reperfusionsschäden, wirken. Dazu könnte auch die lokale Behandlung mit Dicarbonylen wie Glyoxal zählen. Dabei ist der Aspekt der Zytotoxizität allerdings zu beachten, den Glyoxal innehat. Die Konzentration scheint diesbezüglich von entscheidender Bedeutung zu sein. Über das potentielle therapeutische Target muss noch weiter geforscht werden. Caspasen, als zentrale Targets des Apoptose-*Pathways*, induzieren myokardialen Schaden nach Ischämie und Reperfusion. Daher ist davon auszugehen, dass die therapeutische Inhibierung der Caspasen, direkt oder indirekt, zur Reduktion des Myokardschadens beiträgt. Eine zentrale Rolle vermuten wir in der Aktivierung der *Survival*-Kinasen. In weiteren experimentellen Arbeiten ist zu eruieren, ob und an welchem Target die Caspase-Signalkaskade inhibiert wird, um zu klären, warum die Glyoxalbehandlung zur Verbesserung der Kontraktilität beiträgt.

Des Weiteren ist zu klären, wie Glyoxalbehandlung trotz erhöhter AGE-Bildung zur verminderten RAGE-Expression führen konnte. Denn im Rahmen der verminderten RAGE – Expression und damit reduzierten AGE – RAGE Interaktion sinkt der Zellschaden im Gewebe. Diesbezüglich sind Arbeiten über den genauen Mechanismus indiziert.

Andererseits ist weiter zu untersuchen inwieweit insbesondere im Alter die Bildung von AGE und damit der Ligand für RAGE unterbunden werden und bereits in dieser Schlüsselstelle protektiv eingewirkt werden kann. Aber auch Substanzen wie Aminoguanidin bzw. Pyridoxamin, die die Bildung von AGE inhibieren, sind therapeutische Ansätze. In tierexperimentellen Studien konnte bereits ein Benefit von Aminoguanidin gezeigt werden, allerdings sind ebenfalls Nebenwirkungen wie u.a. Anämie, Leberinsuffizienz bekannt, so dass der Einsatz beim Menschen bisher limitiert ist.

6 Literaturverzeichnis

- Abordo, E. A., H. S. Minhas and P. J. Thornalley (1999). "Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity." Biochem Pharmacol **58** (4): 641-648.
- Adams, J. M. (2003). "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." Genes Dev **17** (20): 2481-2495.
- Akhand, A. A., K. Hossain, H. Mitsui, M. Kato, T. Miyata, R. Inagi, J. Du, K. Takeda, Y. Kawamoto, H. Suzuki, K. Kurokawa and I. Nakashima (2001). "Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for map family kinases and caspase activation in human endothelial cells." Free Radic Biol Med **31** (1): 20-30.
- Allsopp, R. C., H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E. V. Younglai, A. B. Futcher, C. W. Greider and C. B. Harley (1992). "Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **89** (21): 10114-10118.
- Anversa, P., T. Palackal, E. H. Sonnenblick, G. Olivetti, L. G. Meggs and J. M. Capasso (1990). "Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart." Circ Res **67** (4): 871-885.
- Badenhorst, D., M. Maseko, O. J. Tsotetsi, A. Naidoo, R. Brooksbank, G. R. Norton and A. J. Woodiwiss (2003). "Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats." Cardiovasc Res **57** (3): 632-641.
- Bahr, B. A., M. L. Wisniewski and D. Butler (2012). "Positive lysosomal modulation as a unique strategy to treat age-related protein accumulation diseases." Rejuvenation Res **15** (2): 189-197.
- Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120** (4): 483-495.
- Barlovic, D. P., A. Soro-Paavonen and K. A. Jandeleit-Dahm (2011). "RAGE biology, atherosclerosis and diabetes." Clin Sci (Lond) **121** (2): 43-55.
- Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med **336** (15): 1066-1071.
- Bartling, B., I. Friedrich, R. E. Silber and A. Simm (2003). "Ischemic preconditioning is not cardioprotective in senescent human myocardium." Ann Thorac Surg **76** (1): 105-111.
- Basta, G., A. M. Sironi, G. Lazzarini, S. Del Turco, E. Buzzigoli, A. Casolaro, A. Natali, E. Ferrannini and A. Gastaldelli (2006). "Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with glycemic control and S100A12 protein." J Clin Endocrinol Metab **91** (11): 4628-4634.
- Baynes, J. W. (2000). "From life to death--the struggle between chemistry and biology during aging: the Maillard reaction as an amplifier of genomic damage." Biogerontology **1** (3): 235-246.
- Baynes, J. W. and S. R. Thorpe (1999). "Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm." Diabetes **48** (1): 1-9.
- Baynes, J. W. and S. R. Thorpe (2000). "Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis." Free Radic Biol Med **28** (12): 1708-1716.
- Bergmann, O., R. D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabe-Heider, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B. A. Buchholz, H. Druid, S. Jovinge and J. Frisen (2009). "Evidence for cardiomyocyte renewal in humans." Science **324** (5923): 98-102.

- Berlanga, J., D. Cibrian, I. Guillen, F. Freyre, J. S. Alba, P. Lopez-Saura, N. Merino, A. Aldama, A. M. Quintela, M. E. Triana, J. F. Montequin, H. Ajamieh, D. Urquiza, N. Ahmed and P. J. Thornalley (2005). "Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds." Clin Sci (Lond) **109** (1): 83-95.
- Bierhaus, A., M. A. Hofmann, R. Ziegler and P. P. Nawroth (1998). "AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept." Cardiovasc Res **37** (3): 586-600.
- Bierhaus, A., P. M. Humpert, M. Morcos, T. Wendt, T. Chavakis, B. Arnold, D. M. Stern and P. P. Nawroth (2005). "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products." J Mol Med (Berl) **83** (11): 876-886.
- Bierhaus, A., S. Schiekofer, M. Schwaninger, M. Andrassy, P. M. Humpert, J. Chen, M. Hong, T. Luther, T. Henle, I. Kloting, M. Morcos, M. Hofmann, H. Tritschler, B. Weigle, M. Kasper, M. Smith, G. Perry, A. M. Schmidt, D. M. Stern, H. U. Haring, E. Schleicher and P. P. Nawroth (2001). "Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB." Diabetes **50** (12): 2792-2808.
- Braunwald, E. and R. A. Kloner (1985). "Myocardial reperfusion: a double-edged sword?" J Clin Invest **76** (5): 1713-1719.
- Breborowicz, A., J. Witowski, A. Polubinska, M. Pyda and D. Oreopoulos (2004). "L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid reduces in vitro cytotoxicity of glucose degradation products." Nephrol Dial Transplant **19** (12): 3005-3011.
- Bucciarelli, L. G., R. Ananthakrishnan, Y. C. Hwang, M. Kaneko, F. Song, D. R. Sell, C. Strauch, V. M. Monnier, S. F. Yan, A. M. Schmidt and R. Ramasamy (2008). "RAGE and modulation of ischemic injury in the diabetic myocardium." Diabetes **57** (7): 1941-1951.
- Bucciarelli, L. G., M. Kaneko, R. Ananthakrishnan, E. Harja, L. K. Lee, Y. C. Hwang, S. Lerner, S. Bakr, Q. Li, Y. Lu, F. Song, W. Qu, T. Gomez, Y. S. Zou, S. F. Yan, A. M. Schmidt and R. Ramasamy (2006). "Receptor for advanced-glycation end products: key modulator of myocardial ischemic injury." Circulation **113** (9): 1226-1234.
- Candido, R., J. M. Forbes, M. C. Thomas, V. Thallas, R. G. Dean, W. C. Burns, C. Tikellis, R. H. Ritchie, S. M. Twigg, M. E. Cooper and L. M. Burrell (2003). "A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes." Circ Res **92** (7): 785-792.
- Candido, R., K. A. Jandeleit-Dahm, Z. Cao, S. P. Nesteroff, W. C. Burns, S. M. Twigg, R. J. Dilley, M. E. Cooper and T. J. Allen (2002). "Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **106** (2): 246-253.
- Cantero, A. V., M. Portero-Otin, V. Ayala, N. Auge, M. Sanson, M. Elbaz, J. C. Thiers, R. Pamplona, R. Salvayre and A. Negre-Salvayre (2007). "Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor-beta: implications for diabetic atherosclerosis." Faseb J **21** (12): 3096-3106.
- Cell-Signaling-Technology "Phospho-p44/42 MAP Kinase (ERK1/2) (Thr 202/Tyr 204) Antibody." Cell Signaling.
- Chang, K. C., K. L. Hsu, C. D. Tseng, Y. D. Lin, Y. L. Cho and Y. Z. Tseng (2006). "Aminoguanidine prevents arterial stiffening and cardiac hypertrophy in streptozotocin-induced diabetes in rats." Br J Pharmacol **147** (8): 944-950.
- Chen, Q., E. J. Vazquez, S. Moghaddas, C. L. Hoppel and E. J. Lesnefsky (2003). "Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III." J Biol Chem **278** (38): 36027-36031.

- Chen, Z. H., Y. Saito, Y. Yoshida and E. Niki (2008). "Effect of oxygen concentration on free radical-induced cytotoxicity." Biosci Biotechnol Biochem **72** (6): 1491-1497.
- Cheng, W., B. Li, J. Kajstura, P. Li, M. S. Wolin, E. H. Sonnenblick, T. H. Hintze, G. Olivetti and P. Anversa (1995). "Stretch-induced programmed myocyte cell death." J Clin Invest **96** (5): 2247-2259.
- Chuyen, N. V. (2006). "Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs." Mol Nutr Food Res **50** (12): 1140-1149.
- Cigola, E., J. Kajstura, B. Li, L. G. Meggs and P. Anversa (1997). "Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro." Exp Cell Res **231** (2): 363-371.
- Cleutjens, J. P. (1996). "The role of matrix metalloproteinases in heart disease." Cardiovasc Res **32** (5): 816-821.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J **326** (Pt 1): 1-16.
- Daoud, S., R. Schinzel, A. Neumann, C. Loske, D. Fraccarollo, C. Diez and A. Simm (2001). "Advanced glycation endproducts: activators of cardiac remodeling in primary fibroblasts from adult rat hearts." Mol Med **7** (8): 543-551.
- Davidson, S. M., D. Hausenloy, M. R. Duchon and D. M. Yellon (2006). "Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection." Int J Biochem Cell Biol **38** (3): 414-419.
- Dunn, J. A., D. R. McCance, S. R. Thorpe, T. J. Lyons and J. W. Baynes (1991). "Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen." Biochemistry **30** (5): 1205-1210.
- Falcone, C., E. Emanuele, A. D'Angelo, M. P. Buzzi, C. Belvito, M. Cuccia and D. Geroldi (2005). "Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25** (5): 1032-1037.
- Fayard, E., L. A. Tintignac, A. Baudry and B. A. Hemmings (2005). "Protein kinase B/Akt at a glance." J Cell Sci **118** (Pt 24): 5675-5678.
- Ferreira, A. E., A. M. Ponces Freire and E. O. Voit (2003). "A quantitative model of the generation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in the Maillard reaction between collagen and glucose." Biochem J **376** (Pt 1): 109-121.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408** (6809): 239-247.
- Fliss, H. and D. Gattinger (1996). "Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium." Circ Res **79** (5): 949-956.
- Franke, T. F., D. R. Kaplan and L. C. Cantley (1997). "PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis." Cell **88** (4): 435-437.
- Friedrich, I., A. Simm, J. Kotting, F. Tholen, B. Fischer and R. E. Silber (2009). "Cardiac surgery in the elderly patient." Dtsch Arztebl Int **106** (25): 416-422.
- Fu, M. X., J. R. Requena, A. J. Jenkins, T. J. Lyons, J. W. Baynes and S. R. Thorpe (1996). "The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions." J Biol Chem **271** (17): 9982-9986.
- Fu, M. X., K. J. Wells-Knecht, J. A. Blackledge, T. J. Lyons, S. R. Thorpe and J. W. Baynes (1994). "Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction." Diabetes **43** (5): 676-683.

- Fujio, Y., T. Nguyen, D. Wencker, R. N. Kitsis and K. Walsh (2000). "Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart." Circulation **101** (6): 660-667.
- Glomb, M. A. and V. M. Monnier (1995). "Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction." J Biol Chem **270** (17): 10017-10026.
- Grunwald, S., R. Krause, M. Bruch, T. Henle and M. Brandsch (2006). "Transepithelial flux of early and advanced glycation compounds across Caco-2 cell monolayers and their interaction with intestinal amino acid and peptide transport systems." Br J Nutr **95** (6): 1221-1228.
- Hammes, H. P., A. Alt, T. Niwa, J. T. Clausen, R. G. Bretzel, M. Brownlee and E. D. Schleicher (1999). "Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy." Diabetologia **42** (6): 728-736.
- Harman, D. (1981). "The aging process." Proc Natl Acad Sci U S A **78** (11): 7124-7128.
- Harman, D. (2001). "Aging: overview." Ann N Y Acad Sci **928**: 1-21.
- Harman, D. (2006). "Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span." Ann N Y Acad Sci **1067**: 10-21.
- Hausenloy, D. J., A. Tsang and D. M. Yellon (2005). "The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning." Trends Cardiovasc Med **15** (2): 69-75.
- Hausenloy, D. J. and D. M. Yellon (2004). "New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway." Cardiovasc Res **61** (3): 448-460.
- Hayashi, T., Namiki, M. (1986). "Role of sugar fragmentation in the Maillard reaction." Dev Food Sci **13**: 29-38.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." Exp Cell Res **37**: 614-636.
- Hayflick, L. (1998). "A brief history of the mortality and immortality of cultured cells." Keio J Med **47** (3): 174-182.
- Heilbronn, L. K., L. de Jonge, M. I. Frisard, J. P. DeLany, D. E. Larson-Meyer, J. Rood, T. Nguyen, C. K. Martin, J. Volaufova, M. M. Most, F. L. Greenway, S. R. Smith, W. A. Deutsch, D. A. Williamson and E. Ravussin (2006). "Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial." Jama **295** (13): 1539-1548.
- Heilbronn, L. K. and E. Ravussin (2003). "Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans." Am J Clin Nutr **78** (3): 361-369.
- Herold (2012). "Innere Medizin."
- Hirose, H., A. Amano, S. Yoshida, A. Takahashi, N. Nagano and T. Kohmoto (2000). "Coronary artery bypass grafting in the elderly." Chest **117** (5): 1262-1270.
- Hodge, J. E. (1953). "Chemistry of browning reactions in model systems. ." Agric Food Chem **1**: 928-943.

- Hofmann, M. A., S. Drury, C. Fu, W. Qu, A. Taguchi, Y. Lu, C. Avila, N. Kambham, A. Bierhaus, P. Nawroth, M. F. Neurath, T. Slattey, D. Beach, J. McClary, M. Nagashima, J. Morser, D. Stern and A. M. Schmidt (1999). "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides." *Cell* **97** (7): 889-901.
- Holly, T. A., A. Drincic, Y. Byun, S. Nakamura, K. Harris, F. J. Klocke and V. L. Cryns (1999). "Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo." *J Mol Cell Cardiol* **31** (9): 1709-1715.
- Hori, O., J. Brett, T. Slattey, R. Cao, J. Zhang, J. X. Chen, M. Nagashima, E. R. Lundh, S. Vijay, D. Nitecki and et al. (1995). "The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system." *J Biol Chem* **270** (43): 25752-25761.
- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." *Cell* **80** (2): 225-236.
- Jonassen, A. K., M. N. Sack, O. D. Mjos and D. M. Yellon (2001). "Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling." *Circ Res* **89** (12): 1191-1198.
- Kasper, M., C. Roehlecke, M. Witt, H. Fehrenbach, A. Hofer, T. Miyata, C. Weigert, R. H. Funk and E. D. Schleicher (2000). "Induction of apoptosis by glyoxal in human embryonic lung epithelial cell line L132." *Am J Respir Cell Mol Biol* **23** (4): 485-491.
- Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson and G. G. Poirier (1993). "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." *Cancer Res* **53** (17): 3976-3985.
- Khalifah, R. G., J. W. Baynes and B. G. Hudson (1999). "Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions." *Biochem Biophys Res Commun* **257** (2): 251-258.
- Kim JS, J. Y., Lemasters JJ. (2006). "Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(5): H2024-2034.
- Kislinger, T., C. Fu, B. Huber, W. Qu, A. Taguchi, S. Du Yan, M. Hofmann, S. F. Yan, M. Pischetsrieder, D. Stern and A. M. Schmidt (1999). "N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression." *J Biol Chem* **274** (44): 31740-31749.
- Kloner, R. A. and S. H. Rezkalla (2004). "Cardiac protection during acute myocardial infarction: where do we stand in 2004?" *J Am Coll Cardiol* **44** (2): 276-286.
- Koenig, R. J., S. H. Blobstein and A. Cerami (1977). "Structure of carbohydrate of hemoglobin Alc." *J Biol Chem* **252** (9): 2992-2997.
- Koschinsky, T., C. J. He, T. Mitsuhashi, R. Bucala, C. Liu, C. Buenting, K. Heitmann and H. Vlassara (1997). "Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (12): 6474-6479.
- Koyama, H., T. Shoji, H. Yokoyama, K. Motoyama, K. Mori, S. Fukumoto, M. Emoto, T. Shoji, H. Tamei, H. Matsuki, S. Sakurai, Y. Yamamoto, H. Yonekura, T. Watanabe, H. Yamamoto and Y. Nishizawa (2005). "Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25** (12): 2587-2593.
- Kuhla, B., H. J. Luth, D. Haferburg, K. Boeck, T. Arendt and G. Munch (2005). "Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* **1043**: 211-216.

- Lakatta, E. G. (2002). "Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons." Heart Fail Rev **7** (1): 29-49.
- Lakatta, E. G. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging." Circulation **107** (3): 490-497.
- Lakatta, E. G. and D. Levy (2003a). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." Circulation **107** (1): 139-146.
- Lakatta, E. G. and D. Levy (2003b). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease." Circulation **107** (2): 346-354.
- Lakatta, E. G. and S. J. Sollott (2002). "The "heartbreak" of older age." Mol Interv **2** (7): 431-446.
- Lander, H. M., J. M. Tauras, J. S. Ogiste, O. Hori, R. A. Moss and A. M. Schmidt (1997). "Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress." J Biol Chem **272** (28): 17810-17814.
- Lapolla, A., R. Reitano, R. Seraglia, G. Sartore, E. Ragazzi and P. Traldi (2005). "Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress." Mol Nutr Food Res **49** (7): 685-690.
- Ledl, F., Schleicher, E. (1990). "Die Maillard - Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper - neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. ." Angewandte Chemie **102**: 597-634.
- Lee, H. C. and Y. H. Wei (2001). "Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging." Biogerontology **2** (4): 231-244.
- Lindsey, J. B., F. Cipollone, S. M. Abdullah and D. K. McGuire (2009a). "Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications." Diab Vasc Dis Res **6** (1): 7-14.
- Lindsey, J. B., J. A. de Lemos, F. Cipollone, C. R. Ayers, A. Rohatgi, D. A. Morrow, A. Khera and D. K. McGuire (2009b). "Association between circulating soluble receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study." Diabetes Care **32** (7): 1218-1220.
- Liu, B., M. Bhat, A. K. Padival, D. G. Smith and R. H. Nagaraj (2004). "Effect of dicarbonyl modification of fibronectin on retinal capillary pericytes." Invest Ophthalmol Vis Sci **45** (6): 1983-1995.
- Liu, J., M. R. Masurekar, D. E. Vatner, G. N. Jyothirmayi, T. J. Regan, S. F. Vatner, L. G. Meggs and A. Malhotra (2003). "Glycation end-product cross-link breaker reduces collagen and improves cardiac function in aging diabetic heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285** (6): H2587-2591.
- Loubani, M., S. Ghosh and M. Galinanes (2003). "The aging human myocardium: tolerance to ischemia and responsiveness to ischemic preconditioning." J Thorac Cardiovasc Surg **126** (1): 143-147.
- Maillard-Lefebvre, H., E. Boulanger, M. Daroux, C. Gaxatte, B. I. Hudson and M. Lambert (2009). "Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases." Rheumatology (Oxford) **48** (10): 1190-1196.
- Maillard, L. C. (1912). "Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoides par voie methodique. ." C.R. Acad. Sci. **154**: 66-68.

- Makita, Z., S. Radoff, E. J. Rayfield, Z. Yang, E. Skolnik, V. Delaney, E. A. Friedman, A. Cerami and H. Vlassara (1991). "Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy." N Engl J Med **325** (12): 836-842.
- Mariani, J., R. Ou, M. Bailey, M. Rowland, P. Nagley, F. Rosenfeldt and S. Pepe (2000). "Tolerance to ischemia and hypoxia is reduced in aged human myocardium." J Thorac Cardiovasc Surg **120** (4): 660-667.
- Marshall, C. J. (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." Cell **80** (2): 179-185.
- Murphy, E. and C. Steenbergen (2008). "Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury." Physiol Rev **88** (2): 581-609.
- Murry, C. E., R. B. Jennings and K. A. Reimer (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." Circulation **74** (5): 1124-1136.
- Nass, N., B. Bartling, A. Navarrete Santos, R. J. Scheubel, J. Borgermann, R. E. Silber and A. Simm (2007). "Advanced glycation end products, diabetes and ageing." Z Gerontol Geriatr **40** (5): 349-356.
- Nawroth, P. P., A. Bierhaus, G. E. Vogel, M. A. Hofmann, M. Zumbach, P. Wahl and R. Ziegler (1999). "[Non-enzymatic glycation and oxidative stress in chronic illnesses and diabetes mellitus]." Med Klin (Munich) **94** (1): 29-38.
- Olshansky, S. J., D. J. Passaro, R. C. Hershov, J. Layden, B. A. Carnes, J. Brody, L. Hayflick, R. N. Butler, D. B. Allison and D. S. Ludwig (2005). "A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century." N Engl J Med **352** (11): 1138-1145.
- Park, H. Y., K. H. Yun and D. S. Park (2009). "Levels of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Acute Ischemic Stroke without a Source of Cardioembolism." J Clin Neurol **5** (3): 126-132.
- Park, L., K. G. Raman, K. J. Lee, Y. Lu, L. J. Ferran, Jr., W. S. Chow, D. Stern and A. M. Schmidt (1998). "Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts." Nat Med **4** (9): 1025-1031.
- Portero-Otin, M., R. Pamplona, M. J. Bellmunt, M. C. Ruiz, J. Prat, R. Salvayre and A. Negre-Salvayre (2002). "Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling." Diabetes **51** (5): 1535-1542.
- Rabbani, N. and P. J. Thornalley (2008). "Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress." Biochem Soc Trans **36** (Pt 5): 1045-1050.
- Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch and R. J. Davis (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270** (13): 7420-7426.
- Reber, F., M. Kasper, A. Siegner, E. Kniep, G. Seigel and R. H. Funk (2002). "Alteration of the intracellular pH and apoptosis induction in a retinal cell line by the AGE-inducing agent glyoxal." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **240** (12): 1022-1032.
- Rensing L, G. A. (2004). "Warum altern wir? Zur Rolle Freier Radikale bei der Begrenzung der Lebenszeit." Blickpunkt der Mann (Wissenschaftliches Journal für Männergesundheit) 2004; 2 (3)7-12: 7-12.
- Riboulet-Chavey, A., A. Pierron, I. Durand, J. Murdaca, J. Giudicelli and E. Van Obberghen (2006). "Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species." Diabetes **55** (5): 1289-1299.

- Ritthaler, U., Y. Deng, Y. Zhang, J. Greten, M. Abel, B. Sido, J. Allenberg, G. Otto, H. Roth, A. Bierhaus and et al. (1995). "Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease." Am J Pathol **146** (3): 688-694.
- Rosenfeldt, F. L., S. Pepe, A. Linnane, P. Nagley, M. Rowland, R. Ou, S. Marasco and W. Lyon (2002). "The effects of ageing on the response to cardiac surgery: protective strategies for the ageing myocardium." Biogerontology **3** (1-2): 37-40.
- Schleicher, E. D., E. Wagner and A. G. Nerlich (1997). "Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging." J Clin Invest **99** (3): 457-468.
- Schluter, K. D. and D. Schreiber (2005). "Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture." Methods Mol Biol **290**: 305-314.
- Schmidt, A. M., S. D. Yan, J. L. Wautier and D. Stern (1999). "Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis." Circ Res **84** (5): 489-497.
- Sell, D. R. and V. M. Monnier (1989). "Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process." J Biol Chem **264** (36): 21597-21602.
- Shangari, N., W. R. Bruce, R. Poon and P. J. O'Brien (2003). "Toxicity of glyoxals--role of oxidative stress, metabolic detoxification and thiamine deficiency." Biochem Soc Trans **31** (Pt 6): 1390-1393.
- Shangari, N. and P. J. O'Brien (2004). "The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress." Biochem Pharmacol **68** (7): 1433-1442.
- Simm, A., I. Friedrich, R. J. Scheubel, T. Gursinsky, R. E. Silber and B. Bartling (2008). "Age dependency of the cariporide-mediated cardio-protection after simulated ischemia in isolated human atrial heart muscles." Exp Gerontol **43** (7): 691-699.
- Simm, A., G. Munch, F. Seif, O. Schenk, A. Heidland, H. Richter, S. Vamvakas and R. Schinzel (1997). "Advanced glycation endproducts stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK1." FEBS Lett **410** (2-3): 481-484.
- Simm, A., J. Wagner, T. Gursinsky, N. Nass, I. Friedrich, R. Schinzel, E. Czeslik, R. E. Silber and R. J. Scheubel (2007). "Advanced glycation endproducts: a biomarker for age as an outcome predictor after cardiac surgery?" Exp Gerontol **42** (7): 668-675.
- Statistisches Bundesamt Deutschland (2011). "Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die häufigsten Todesursachen (ab1998)." Todesursachenstatistik Zweigstelle Bonn
- Statistisches Bundesamt Deutschland (2012). "2011: Krankheiten des Herz- / Kreislaufsystems weiterhin häufigste Todesursache. ." Pressemitteilung Nr. 425 vom 06.12.2012.
- Sun, H. Y., N. P. Wang, F. Kerendi, M. Halkos, H. Kin, R. A. Guyton, J. Vinten-Johansen and Z. Q. Zhao (2005). "Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288** (4): H1900-1908.
- Suzuki, D., T. Miyata, N. Saotome, K. Horie, R. Inagi, Y. Yasuda, K. Uchida, Y. Izuhara, M. Yagame, H. Sakai and K. Kurokawa (1999). "Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions." J Am Soc Nephrol **10** (4): 822-832.

- Tanaka, N., H. Yonekura, S. Yamagishi, H. Fujimori, Y. Yamamoto and H. Yamamoto (2000). "The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells." J Biol Chem **275** (33): 25781-25790.
- Theroux, P., B. R. Chaitman, N. Danchin, L. Erhardt, T. Meinertz, J. S. Schroeder, G. Tognoni, H. D. White, J. T. Willerson and A. Jessel (2000). "Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators." Circulation **102** (25): 3032-3038.
- Thornalley, P. J. (1990). "The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life." Biochem J **269** (1): 1-11.
- Thornalley, P. J. (1998). "Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors." Chem Biol Interact **111-112**: 137-151.
- Thornalley, P. J. (2002). "Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options." Int Rev Neurobiol **50**: 37-57.
- Thornalley, P. J. (2003). "Glyoxalase I-structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation." Biochem Soc Trans **31** (Pt 6): 1343-1348.
- Thornalley, P. J. (2008). "Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease." Drug Metabol Drug Interact **23** (1-2): 125-150.
- Thornalley, P. J., L. G. Edwards, Y. Kang, C. Wyatt, N. Davies, M. J. Ladan and J. Double (1996). "Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis." Biochem Pharmacol **51** (10): 1365-1372.
- Thornalley, P. J., A. Langborg and H. S. Minhas (1999). "Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose." Biochem J **344 Pt 1**: 109-116.
- Thorpe, S. R. and J. W. Baynes (2003). "Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives." Amino Acids **25** (3-4): 275-281.
- Tippelt, S., C. Ma, M. Witt, S. Bierbaum and R. H. Funk (2004). "Collagen type I prevents glyoxal-induced apoptosis in osteoblastic cells cultured on titanium alloy." Cells Tissues Organs **177** (1): 29-36.
- Tong, H., K. Imahashi, C. Steenbergen and E. Murphy (2002). "Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective." Circ Res **90** (4): 377-379.
- Tsang, A., D. J. Hausenloy, M. M. Mocanu and D. M. Yellon (2004). "Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway." Circ Res **95** (3): 230-232.
- Ulrich, P. and A. Cerami (2001). "Protein glycation, diabetes, and aging." Recent Prog Horm Res **56**: 1-21.
- Uribarri, J., M. Peppas, W. Cai, T. Goldberg, M. Lu, C. He and H. Vlassara (2003). "Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients." J Am Soc Nephrol **14** (3): 728-731.
- Vadasz, I., C. H. Weiss and J. I. Sznajder (2012). "Ubiquitination and proteolysis in acute lung injury." Chest **141** (3): 763-771.

- Verzija, N., J. DeGroot, E. Oldehinkel, R. A. Bank, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, M. T. Bayliss, J. W. Bijlsma, F. P. Lefeber and J. M. Tekoppele (2000). "Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen." *Biochem J* **350 Pt 2**: 381-387.
- Vlassara, H. and M. R. Palace (2002). "Diabetes and advanced glycation endproducts." *J Intern Med* **251** (2): 87-101.
- Vlassara, H. and J. Uribarri (2004). "Glycoxidation and diabetic complications: modern lessons and a warning?" *Rev Endocr Metab Disord* **5** (3): 181-188.
- Wautier, J. L., C. Zoukourian, O. Chappey, M. P. Wautier, P. J. Guillausseau, R. Cao, O. Hori, D. Stern and A. M. Schmidt (1996). "Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats." *J Clin Invest* **97** (1): 238-243.
- Wautier, M. P., O. Chappey, S. Corda, D. M. Stern, A. M. Schmidt and J. L. Wautier (2001). "Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280** (5): E685-694.
- Wells-Knecht, K. J., D. V. Zyzak, J. E. Litchfield, S. R. Thorpe and J. W. Baynes (1995). "Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose." *Biochemistry* **34** (11): 3702-3709.
- Wolff, S. P. and R. T. Dean (1987). "Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes." *Biochem J* **245** (1): 243-250.
- Wolffenbittel, B. H., C. M. Boulanger, F. R. Crijns, M. S. Huijberts, P. Poitevin, G. N. Swennen, S. Vasan, J. J. Egan, P. Ulrich, A. Cerami and B. I. Levy (1998). "Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (8): 4630-4634.
- Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis and M. E. Greenberg (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." *Science* **270** (5240): 1326-1331.
- Yan, S. D., A. M. Schmidt, G. M. Anderson, J. Zhang, J. Brett, Y. S. Zou, D. Pinsky and D. Stern (1994). "Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins." *J Biol Chem* **269** (13): 9889-9897.
- Yan, S. D., Zhu, H., Fu, J., Yan, S.F., Roher, A., Tourtellotte, W. W., Rajavashisth, T., Godman, G.C., Stern, D., Schmidt, A.M. (1997). "Amyloid-b peptide-Receptor for Advanced Glycation Endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: A proinflammatory pathway in Alzheimer disease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5296-5301.
- Yang, S. H., A. GALANIS, A. D. SHARROCKS (1999). "Targeting of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases to MEF2 Transcription Factors." *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (19): 4028-4038.
- Yang, S. H., A. Galanis and A. D. Sharrocks (1999). "Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors." *Mol Cell Biol* **19** (6): 4028-4038.
- Yang, Z., Z. Makita, Y. Horii, S. Brunelle, A. Cerami, P. Sehajpal, M. Suthanthiran and H. Vlassara (1991). "Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins." *J Exp Med* **174** (3): 515-524.
- Yao, D. and M. Brownlee "Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands." *Diabetes* **59** (1): 249-255.

7 Thesen

1. Die Behandlung von humanem Myokardgewebe von Erwachsenen als auch Senioren mit 1 mM Glyoxal schützt signifikant vor Ischämie-Reperfusionsschäden.
2. Der positiv inotrope Effekt ist konzentrationsabhängig. Hohe Dosierungen von 10 mM wirken aber zytotoxisch.
3. Unter Glyoxalbehandlung werden im humanen Myokard Erwachsener und Senioren die *Survival* - Kinasen Akt und ERK1/2^{MAPK} signifikant aktiviert.
4. Die Bildung von Carboxy-Methyl-Lysin, CML, einem *Advanced glycation Endproduct* nimmt mit steigender Glyoxalkonzentration zu.
5. Die Expression von RAGE, Rezeptor für *Advanced Glycation Endproduct*, ist nach Behandlung des Myokardgewebes mit Glyoxal in der Altersgruppe ≤ 60 Jahre signifikant reduziert.
6. Die reduzierte RAGE-Expression korreliert mit signifikant geringerem Zelltod im LDH-*Release Assay* sowie einer signifikant verbesserten Kontraktionskraft im Glyoxal – behandelten Myokard im Vergleich zum unbehandelten Myokard.
7. Der Ischämie / Reperfusionsversuch alleine führt nicht zur Bildung von CML (als möglichen Marker nach Bildung von Glyoxal).
8. Glyoxal hat im humanen Myokard keinen signifikanten Einfluss auf Apoptose – *Pathways* auf Ebene der Caspase 9 / Poly- (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP).
9. Die Behandlung von humanem Myokardgewebe mit Caspaseinhibitor schützt nicht vor Zelltod im Ischämie / Reperfusionsversuch.
10. Die protektive Wirkung von Glyoxal beruht insbesondere auf der Aktivierung der *Survival*-Kinasen (Akt und ERK1/2^{MAPK}) und weniger auf der direkten Inhibierung der Apoptose.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Nachname	Elke <u>Beatrice</u> Müller, geb. Schneider
Geburtsdatum	16.06.1978
Geburtsort	Frankenberg
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

09/1985 – 08/1992	Polytechnische Oberschule Leubsdorf
09/1992 – 07/1998	Gymnasium Oederan
09/1995 – 08/1996	Austauschjahr USA / South Dakota

Berufliche Ausbildung zur Bankkauffrau

08/1998 – 06/2001	Ausbildung in der Kreissparkasse Freiberg
-------------------	---

Beschäftigung als Bankkauffrau

06/2001 – 09/2002	Bilanzanalyse der Kreissparkasse Freiberg
-------------------	---

Studium der Humanmedizin

10/2002 – 11/2008	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2004	Abschluss Physikum (Ärztliche Vorprüfung)
11/2008	Approbation als Arzt

Facharztweiterbildung

07/2009 – 06/2010	Assistenzärztin in der Allgemeinen- und Unfallchirurgie Spital Linth
07/2010 – 12/2011	Assistenzärztin Zentrum für Innere Medizin Hirslanden Klinik Aarau
01/2012 – 12/2014	Assistenzärztin Innere Medizin Kantonsspital Olten
11/2013	Facharztprüfung Allgemeine Innere Medizin
11/2014	Fachärztin Allgemeine Innere Medizin
seit 02/2015	Oberärztin Medizinische Universitätsklinik, Kantonsspital Aarau

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass die vorliegende Arbeit selbständig durch mich und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Die aus anderen Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche entsprechend kenntlich gemacht.

Frühere Promotionsversuche der Autorin bestehen nicht. Die vorliegende Dissertation wird erstmalig und nur an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingereicht.

Beatrice Müller

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. R.-E. Silber danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation im Labor der Herz- und Thoraxchirurgie der Martin – Luther – Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Andreas Simm erstellen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Simm für die Überlassung des interessanten Themas, sowie die kontinuierliche wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung und sein beständiges Interesse am Vorgehen dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung der Herzohren aus dem Operationssaal danke ich den klinischen Mitarbeitern der Herz- und Thoraxchirurgie.

Außerdem möchte ich Dr. Norbert Nass für seine Unterstützung, sowohl theoretisch als auch praktisch, während meiner Dissertation danken.

Insbesondere der MTA Thekla Wangemann danke ich für die ausführliche Einarbeitung in das Organbadlabor sowie die Zellkultur.

Der MTA Corinna Giersberg danke ich für die detaillierte Einarbeitung in die Methodik der Immunhistochemie.

Ich möchte mich auch bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Labors der Herz- und Thoraxchirurgie für das gute Arbeitsklima und die konstruktiven Hinweise sowie fachlichen Anregungen bedanken. Ganz besonders danke ich Simone, Grit und Corinna für Ihre mentale Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt abschließend meinen Eltern und meinem Mann für ihre fortwährende Geduld und Verständnis.