

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

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Rolf-Edgar Silber

Die Rolle von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten und deren Rezeptor RAGE im kardiovaskulären System

H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

eines habilitierten Doktors der Medizin (Dr. med. habil.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: **Dr. med. Britt Hofmann**

geboren am 24.07.1968 in Halle (Saale)

Gutachter / in :

1. Prof. Dr. med. M. Weyand
2. Prof. Dr. med. R. Leyh

Datum der Verteidigung: 17. Februar 2015 in Halle (Saale)

Referat

Die kardiovaskulären Erkrankungen zeigen eine stetig steigende Inzidenz und stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Die Entstehung von kardiovaskulären Veränderungen ist ein multifaktorieller Vorgang, der durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung und unseren westlichen Lebensstil mit einer Zunahme von sogenannten Zivilisationskrankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2 und essentieller arterieller Hypertonie entscheidend mitbeeinflusst wird. Die Akkumulation von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten, den so genannten Advanced Glycation End-products (AGEs), wird für Veränderungen im kardiovaskulären System mitverantwortlich gemacht. Aus diesem Grund fokussierte die Arbeit auf die Wirkung von AGEs im kardiovaskulären System. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass AGE-modifizierte Proteine die Zellmigration offensichtlich nicht direkt über Rezeptor vermittelte Reaktionen hemmen, vielmehr trägt die modifizierte extrazelluläre Matrix zu Veränderungen des „normalen Mikromilieus“ der Zellen bei. Dies beeinflusst die Adhäsion, Aktinpolymerisation und damit die gerichtete Zellwanderung negativ und führt so zu Veränderungen der Zell- und Gewebefunktionen. Mit zunehmender AGE-Modifikation des Kollagens kommt es zur Reduktion sowohl der Chemotaxis wie auch der Migration von Zellen. AGE-modifiziertes Kollagen wurde in vaskulärem und kardialem Gewebe nachgewiesen. Der Grad der Modifizierung durch fortgeschrittene Glykierung stand in engem Zusammenhang mit dem Alter, der Inzidenz von Diabetes mellitus und war prädiktiv für den postoperativen Verlauf der untersuchten KHK Patienten. Die Veränderungen im Bereich der großen arteriellen Gefäße hatten zudem einen wesentlichen Einfluss auf die Schwere der Ausprägung der koronaren Herzerkrankung. Die vaskulären und kardialen AGE assoziierten Modifikationen wurden durch die nicht-invasiven Parameter carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit (cfPWV) und Hautautofluoreszenz (sAF) reflektiert. Die Hautautofluoreszenz erwies sich als prädiktiver Parameter für die postoperative Morbidität der untersuchten KHK Patienten. Neben der direkten Wirkung von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten über die Quervernetzung von Proteinen stand auch die rezeptorvermittelte Wirkung im Fokus. Diese wurde in einem Mausmodell untersucht. Die Experimente zeigten, dass im gesunden Organismus eine fettreiche Ernährung ein linksventrikuläres Remodeling induziert und zu Aortenklappen-Veränderungen im Sinne einer Aortenklappenstenose führt. Hierfür könnte die Interaktion von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten mit dem Zelloberflächenrezeptor RAGE entscheidend sein, aber auch die durch die Ernährung induzierte Hyperlipidämie scheint möglicherweise über oxidiertes Low Density Lipoprotein (LDL) einen Einfluss zu haben.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass bei kardiovaskulären Erkrankungen fortgeschrittene Glykierungsendprodukte sowohl über die Quervernetzung der Kollagenmatrix (*Crosslinking*) wie auch über ihren Rezeptor RAGE zu Alterationen führen, die von klinischer Relevanz sind. Die Veränderungen durch fortgeschrittene Glykierung sind mit nicht-invasiven Parametern erfassbar, bis zu einem gewissen Grad möglicherweise noch reversibel und somit therapeutisch beeinflussbar.

Hofmann, Britt. Die Rolle von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten und deren Rezeptor RAGE im kardiovaskulären System. Halle, Univ., Med. Fak., Habil., 47 Seiten, 2014.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| <i>Referat</i> | <i>i</i> |
| <i>Inhaltsverzeichnis</i> | <i>ii</i> |
| <i>Abkürzungen und Erläuterungen</i> | <i>iv</i> |
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Fortgeschrittene Glykierungsendprodukte – Entstehung und Einfluss | 4 |
| 2.1. Entstehung von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten | 4 |
| 2.1.1. Endogene Entstehung | 4 |
| 2.1.2. Exogene Aufnahme | 6 |
| 2.2. Einfluss von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten | 7 |
| 2.2.1. Quervernetzung von Strukturproteinen | 7 |
| 2.2.2. Bindung an den Rezeptor RAGE | 8 |
| 3. Nicht-invasive Marker der Gefäßfunktion und der fortgeschrittenen Glykierung | 11 |
| 3.1. Die zentrale Pulswellengeschwindigkeit | 11 |
| 3.2. Die Hautautofluoreszenz | 13 |
| 4. Zielstellung der Arbeit | 15 |
| 5. Wirkung fortgeschrittener Glykierungsendprodukte im kardio-vaskulären System | 16 |
| 5.1. Glykierung der extrazellulären Matrix und Zellmigration | 16 |
| 5.2. AGE-Modifikationen der vaskulären Matrix | 19 |
| 5.3. AGE-Modifikationen der kardialen Matrix | 20 |
| 5.4. Zusammenhang von AGE-Modifikationen der vaskulären und kardialen Matrix mit nicht-invasiven Parametern | 23 |

| | |
|--|-------------|
| 5.4.1. Mit der zentralen Pulswellengeschwindigkeit..... | 23 |
| 5.4.2. Mit der Hautautofluoreszenz..... | 27 |
| 5.5. Einfluss des Rezeptors für fortgeschrittene Glykierungsprodukte - RAGE - auf die Entstehung von kardialen und valvulären Veränderungen..... | 31 |
| 6. Zusammenfassung und Ausblick..... | 34 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 37 |
| 8. Eigene veröffentlichte Originalarbeiten zur Habilitationsschrift ^a | 45 |
| 9. Thesen | 46 |
| Anhang..... | vi |
| | |
| 8.1. Glycation of extracellular matrix proteins impairs migration of immune cells. Haucke E, Navarrete-Santos A, Simm A, Silber RE, Hofmann B (2014). <i>Wound Repair Regen.</i> 22(2):239-245. | x |
| 8.2. Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function? Hofmann B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Navarrete Santos A (2013). <i>Exp Gerontol.</i> 48(1):38-44. | xi |
| 8.3. Carotid to femoral pulse wave velocity reflects the extent of coronary artery disease. Hofmann B, Riemer M, Erbs C, Plehn A, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014). <i>J Clin Hypertens (Greenwich).</i> 16:629–633. | xii |
| 8.4. Relationship between cardiac tissue glycation and skin autofluorescence in coronary artery disease patients. Hofmann B, Jacobs K, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014). <i>Diabetes Metab.</i> http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2014.12.001 | xiii |
| 8.5. RAGE influences the development of aortic valve stenosis in mice on a high fat diet. Hofmann B, Yakobus Y, Indrasari M, Nass N, Navarrete Santos A, Kraus FB, Silber RE, Simm A (2014). <i>Exp Gerontol.</i> 59:13-20. | xiv |

Abkürzungen und Erläuterungen

| | |
|-------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AB | Beta-Amyloid-Peptide |
| AGEs | <i>Advanced Glycation Endproducts</i> , (fortgeschrittene Glykierungsendprodukte) |
| a.u. | Arbitrary Units |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CDCF | <i>Collagenase Digestible Collagen Fraction</i> , (Kollagenase-verdauliche Kollagenfraktion) |
| CEL | N- ϵ -(carboxyethyl)lysin |
| cfPWV | <i>Carotid to femoral Pulse Wave Velocity</i> , (carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit) |
| CML | N- ϵ -(carboxymethyl)lysin |
| Col | <i>Collagen</i> , (Kollagen) |
| Crosslink | Quervernetzung |
| CW Doppler | Continuous Wave Doppler |
| et al. | und andere |
| esRAGE | <i>endogenous secretory Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i> , (lösliche Form von RAGE) |
| HbA _{1c} | <i>Hemoglobin A_{1c}</i> , (glykiertes Hämoglobin) |
| HDL | <i>High Density Lipoprotein</i> |
| HFD | Hochfettdiät |
| HMGB1 | <i>High-Mobility-Group-Protein B1</i> |
| ICF | <i>Insoluble Collagen Fraction</i> , (unlösliche Kollagenfraktion) |
| IL | Interleukin |
| KHK | koronare Herzkrankheit |
| LDL | <i>Low Density Lipoprotein</i> , (Lipoprotein geringer Dichte); <i>oxidized (ox)LDL</i> |
| LV | linker Ventrikel |
| MAC-1 | Leukozyten Integrin Mac-1 |
| MAPK | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> , (Proteinkinase) |
| mm | Millimeter |
| mm ² | Quadratmillimeter |
| MMP | <i>Matrix Metalloproteinase</i> , (Matrixmetalloproteinase) |
| MW | Mittelwert |
| n | Anzahl |
| ND | Normaldiät |
| NF | <i>Nuclear Factor: NF-κB</i> , (Transkriptionsfaktor) |

| | |
|----------------|---|
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PDCF | <i>Pepsin Digestible Collagen Fraction</i> , (Pepsin-verdauliche Kollagenfraktion) |
| RAGE | <i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i> , (Zelloberflächenrezeptor) |
| RAGE KO | RAGE Knockout Mäuse, C57BL/6N RAGE -/- |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| s | Sekunden |
| SEM | Standardfehler des Mittelwerts |
| SD | Standardabweichung |
| sAF | <i>Skin Autofluorescence</i> , (Hautautofluoreszenz) |
| SDF-1 α | <i>Stromal cell-derived Faktor 1α</i> |
| Sp1 | <i>Specificity protein 1</i> , (Transkriptionsfaktor) |
| sRAGE | <i>secretory Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i> , (lösliche Form von RAGE) |
| S100 | Proteine der Multigen Familie S-100 |
| STS score | Model zur Kalkulation der Morbidität und Mortalität in der Erwachsenenherzchirurgie nach Vorgaben der <i>Society of Thoracic Surgeons</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TGF | <i>Transforming Growth Factor</i> , (Wachstumsfaktor) |
| u.a. | unter anderem |
| WHO | <i>World Health Organization</i> , (Weltgesundheitsorganisation) |
| WT | Wildtypmäuse, C57BL/6N |
| μ m | Mikrometer |

1. Einleitung

Unsere mittlere Lebenserwartung hat sich in den letzten 160 Jahren nahezu verdoppelt und es wird erwartet, dass sie bis zum Jahr 2050 auf das Alter von über 90 Jahren steigt¹. Dies ist vor allem auf eine verbesserte Gesundheitsversorgung, bessere hygienische Bedingungen und eine gute Grundversorgung mit Nahrungsmitteln zurückzuführen. Allerdings ist Altern mit einem Nachlassen von physiologischen und biochemischen Funktionen von Geweben und Organen verbunden, was zum verstärkten Auftreten von degenerativen Erkrankungen im Alter führt². Auf der anderen Seite ist unser westlicher Lebensstil durch den Mangel an Bewegung, den übermäßigen Genuss von hochverarbeiteten Lebensmitteln und von Lifestyle-Drogen wie Tabak und Alkohol, mit einer Zunahme von degenerativen Erkrankungen, wie Diabetes Typ 2, essentieller arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit, schon bei der jungen und mittelalten Bevölkerung der Industrienationen, verbunden. Aus diesem Grund nehmen einige Forscher an, dass ein weiterer Anstieg der mittleren Lebenserwartung in der westlichen Welt eher nicht zu erwarten ist³. Besonders kardiovaskuläre Erkrankungen führen bei den Älteren, aber auch schon bei einigen jüngeren Mitmenschen zu einer Einschränkung der Lebensqualität und stellen die häufigste Todesursache bei Männern und Frauen in Deutschland dar⁴. Für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen spielt die allmähliche Anreicherung von altersbedingt und/oder ernährungsbedingt modifizierten Biomolekülen eine Rolle. Im normalen Alterungsprozess kommt es zu einer Zunahme von modifizierten Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren in Zellen und Körperflüssigkeiten auf Grund der Leistungsverminderung endogener Reparatur- und Abbausysteme. Diese Veränderungen finden aber nicht nur im Rahmen des Alterns statt, sie können auch durch eine sehr fett- und zuckerreiche Ernährung und durch oxidativen Stress beschleunigt werden. In unserem Körper können modifizierte Biomoleküle unter anderem durch nicht-enzymatische Glykierung von Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden entstehen und werden dann als fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (AGEs) bezeichnet. Fortgeschrittene Glykierungsendprodukte tragen zum einen durch die Bildung von Quervernetzungen an langlebigen Proteinen, wie Kollagen, zur Versteifung von Gefäßen und Organen bei. Zum anderen führen sie über die Bindung an ihren Rezeptor RAGE zu einer Aktivierung inflammatorischer Mechanismen⁵ und zu einer Zunahme von oxydativem Stress⁶.

In meiner Forschungsarbeit steht zentral die Frage nach der Rolle von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten und ihrem Rezeptor RAGE im kardiovaskulären System. Dazu wurden in experimentellen Untersuchungen die Modifikationen von humanen Gefäßen und kardialen Gewebe erfasst, in Beziehung zu nicht-invasiven Markern der Glykierung sowie Gefäßveränderung gesetzt, und mit dem postoperativen Verlauf korreliert. Außerdem wurde experimentell der Einfluss von Matrixmodifikationen auf die Zellmigration in einem Gefäßmodell untersucht. In einem weiteren Projekt wurde die Rolle des AGE Rezeptors RAGE im Zusammenhang mit der Entstehung von Aortenklappen-Veränderungen unter einer Hochfetterernährung im Mausmodell erforscht.

Diese Forschungsergebnisse sind als wissenschaftliche Artikel erschienen und wurden von mir auf Tagungen vorgestellt. Sie bilden die Grundlage dieser kumulativen Habilitationsschrift und beschreiben:

- **Matrixmodifikation durch fortgeschrittene Glykierung und den Einfluss auf die Zellmigration**

Publiziert in:

Haucke E, Navarrete-Santos A, Simm A, Silber RE, Hofmann B (2014). Glycation of extracellular matrix proteins impairs migration of immune cells. *Wound Repair Regen.* 22(2):239-245.

- **Gefäßkollagenmodifikationen durch fortgeschrittene Glykierung und deren Korrelation zu nicht-invasiven Markern der Gefäßsteifigkeit und Glykierung**

Publiziert in:

Hofmann B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Navarrete Santos A (2013). Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function? *Exp Gerontol.* 48(1):38-44.

Hofmann B, Riemer M, Erbs C, Plehn A, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014). Carotid to femoral pulse wave velocity reflects the extent of coronary artery disease. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 16:629–633.

Simm A, Navarrete Santos A, Hofmann B, Bushnaq H, Nass N (2012) Protein glycation as a pathological mechanism in diabetes. *Z Gerontol Geriatr* 45(2):95-99.

Simm A, Nass N, Bartling B, Hofmann B, Silber RE, Navarrete Santos A (2008) Potential biomarkers of ageing. *Biol Chem* 389(3):257-265.

- **kardiale Modifikationen durch fortgeschrittene Glykierung und deren Korrelation zu nicht-invasiven Markern der Glykierung**

Publiziert in:

Hofmann B, Jacobs K, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014). Relationship between cardiac tissue glycation and skin autofluorescence in coronary artery disease patients. *Diabetes Metab.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2014.12.001>.

- **den Einfluss des Rezeptors für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte - RAGE – auf die Entstehung von kardialen und valvulären Veränderungen bei Mäusen unter einer Hochfetterernährung**

Publiziert in:

Hofmann B, Yakobus Y, Indrasari M, Nass N, Navarrete Santos A, Kraus FB, Silber RE, Simm A (2014) RAGE influences the development of aortic valve stenosis in mice on a high fat diet. *Exp Gerontol.* 59:13-20.

Leuner B, Max M, Thamm K, Kausler C, Yakobus Y, Bierhaus A, Sel S, Hofmann B, Silber RE, Simm A, Nass N (2012) RAGE influences obesity in mice. Effects of the presence of RAGE on weight gain, AGE accumulation, and insulin levels in mice on a high fat diet. *Z Gerontol Geriatr* 45(2):102-108.

Den wissenschaftlichen Aufsätzen vorangestellt ist eine integrative Darstellung der in den jeweiligen Artikeln untersuchten Komponenten in Bezug auf das kardiovaskuläre System unter besonderer Berücksichtigung der fortgeschrittenen Glykierungsendprodukte und ihres Rezeptors RAGE. Begonnen wird mit einer Rekapitulation der biochemischen Grundlagen und pathophysiologischen Wirkungen der fortgeschrittenen Glykierungsendprodukte und des Rezeptors RAGE sowie der genutzten nicht-invasiven Marker der Glykierung und Gefäßfunktion. Die nächsten Kapitel beschäftigten sich mit Kollagenmodifikationen im Bereich der Gefäße und des Herzens und deren Einfluss auf Zellmigration, Gefäßversteifung und kardiale Funktion sowie der Nutzung von nicht-invasiven Markern der Gefäßfunktion und der Glykierung als Prädiktoren für die kardiovaskuläre Situation und den postoperativen Verlauf. Der letzte Abschnitt dieser integrativen Darstellung setzt sich mit den Auswirkungen einer Hochfetterernährung, auf die Entstehung von kardialen und valvulären Veränderungen in einem Mausmodell unter besonderer Berücksichtigung des Rezeptors RAGE auseinander. Am Ende folgt eine wissenschaftliche Einordnung der erzielten Ergebnisse.

2. Fortgeschrittene Glykierungsendprodukte – Entstehung und Einfluss

Der französische Biochemiker Louis Camille Maillard berichtete 1912 erstmals von einer Reaktion, die zu charakteristischen gelb-bräunlich gefärbten Reaktionsprodukten führte. Diese nicht-enzymatische Bräunungsreaktion von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren wurde nach ihrem Entdecker, Maillard-Reaktion, benannt⁷.

2.1. Entstehung von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten

2.1.1. Endogene Entstehung

Bei der Maillard-Reaktion findet eine im allgemeinen als Glykierung bezeichnete Umsetzung von Aminosäuren, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren mit reduzierenden Zuckern, wie z.B. Glucose oder Fructose, statt. In Folge verschiedener Umlagerungs- und Oxidationsreaktionen entstehen die fortgeschrittenen Glykierungsendprodukte, sogenannte *Advanced Glycation Endproducts* oder AGEs. Diese gelten als eine heterogen gemischte Substanzgruppe. Die Maillard-Reaktion oder nicht-enzymatische Glykierung lässt sich in drei Reaktionsphasen einteilen. Zu Beginn steht die Addition einer Carbonylgruppe eines reduzierten Zuckers (z.B. Glukose) mit einer freien Aminogruppe eines Proteins, Lipids oder einer Nukleinsäure. Unter Elimination von Wasser kommt es zu Bildung einer Schiff'schen Base. Dies geschieht innerhalb von Minuten bis Stunden und das Reaktionsprodukt ist reversibel. Im langsameren zweiten Schritt der Reaktion findet eine Umlagerungsreaktion in eine Aminodesoxyketose, das stabilere Amadori-Produkt, statt⁸. Eines der ersten bekannten Produkte der Amadori-Umlagerung ist das glykierte Hämoglobin (HbA_{1c})⁹. Die Entstehung hängt von der Menge an Glukose und freien Aminogruppen ab, und verläuft bei einem basischen pH-Wert schneller. Der HbA_{1c}-Wert spiegelt die mittlere Blutglukosekonzentration über einen Zeitraum von etwa drei Wochen wieder und wird daher zur Kontrolle der Therapie bei Diabetes mellitus eingesetzt^{10, 11}. Die Amadori-Umlagerung ist für die meisten langlebigen Proteine, wie Hämoglobin, dennoch reversibel. Weitere bekannte reaktive Zwischenprodukte des zweiten Schritts der Maillard-Reaktion sind die α -Dicarbonylverbindungen, wie Glyoxal und Methylglyoxal, sowie die bei der Oxidation von Lipiden entstehenden reaktiven Oxoaldehyde^{8, 12, 13}. Im letzten Schritt der Maillard-Reaktion führt eine Kombination aus erhöhten Blutzuckerspiegeln, oxidativen und nicht-oxidativen Prozessen schließlich durch Umstellungsreaktionen an den Amadori-Zwischenprodukten zur Bildung der thermisch stabilen, irreversiblen fortgeschrittenen Glykierungsendprodukte. Dieser Prozess ist von der Konzentration der Ausgangsstoffe, der Temperatur und der Zeit

abhängig. Durch die inter- und intramolekularen Verbindungen bei der Entstehung von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten kommt es häufig zur Quervernetzung zwischen Proteinen. Neben der Entstehung von Glykierungsendprodukten aus Amadori-Produkten können sie auch bei der Autoxidation von Glukose oder Fruktose (Wolff Pathway)¹⁴, dem Polyol-Stoffwechsel und beim Ketonkörperabbau¹² gebildet werden.

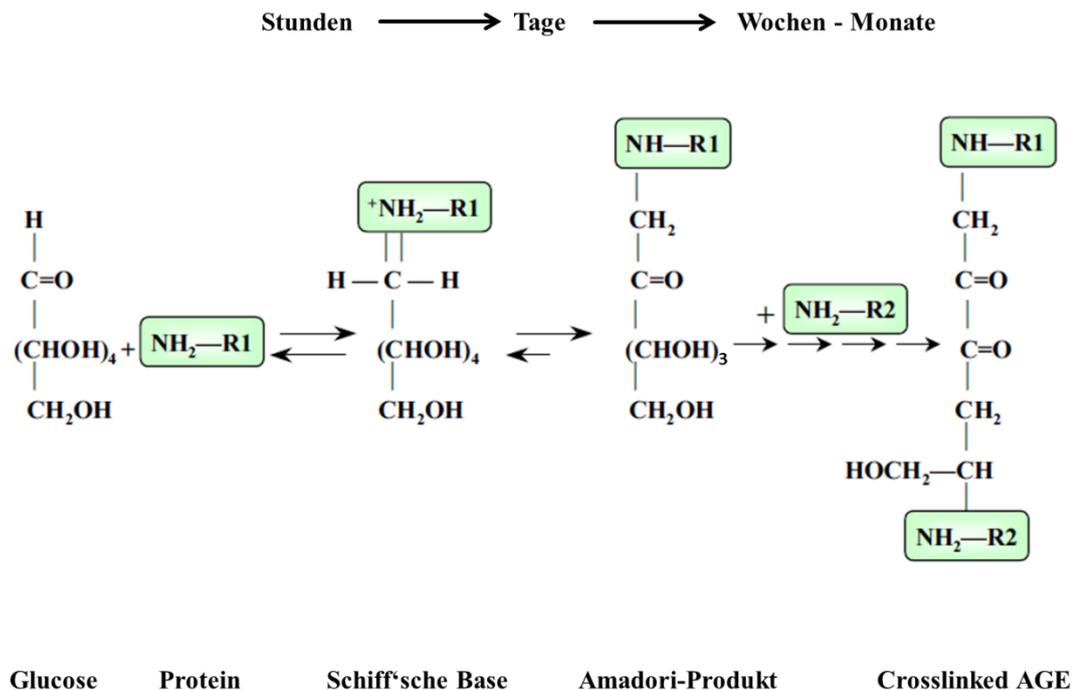


Abbildung 1: Schematische Darstellung der AGE-Entstehung¹⁵

Die Carbonylgruppe der Glukose bildet mit der freien Aminosäure eines Proteins die Schiff'sche Base. Das bei der Amadori-Umlagerung entstandene Zwischenprodukt bildet mit weiteren Amadori-Produkten Quervernetzungen aus, so dass die so genannten quervernetzten oder *crosslinked* AGEs entstehen.

Die *in vivo* gebildeten fortgeschrittenen Glykierungsendprodukte werden abhängig von ihrer Herkunft in Advanced Glycation Endproducts (AGEs) oder Advanced Lipoxidation Endproducts (ALEs) unterschieden. Während die ersteren bei den bereits genannten Reaktionen entstehen, werden ALEs durch die Oxidation von Lipiden gebildet. Diese Reaktion findet statt, wenn mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die Hauptkomponenten biologischer Membranen, durch reaktive Sauerstoffradikale attackiert werden¹¹.

Im Weiteren werden hier beide Gruppen unter dem Begriff fortgeschrittene Glykierungsendprodukte oder AGEs zusammengefasst.

Aufgrund der vielfältigen Entstehungswege stellen die fortgeschrittenen Glykierungsendprodukte eine sehr komplexe und heterogene Gruppe von Biomolekülen dar. Die mittlerweile charakterisierten AGEs lassen sich in vier Hauptgruppen einteilen. Die Klassifizierung erfolgt in nicht-fluoreszierend und quervernetzend (z.B. Imidazolone), nicht-fluoreszierend und nicht-quervernetzend (z.B. Carboxymethyllysine (CML), Carboxyethyllysine (CEL)), fluoreszierend und quervernetzend (z.B. Pentosidine)¹⁶ und in fluoreszierend und nicht-quervernetzend (z.B. Argpyrimidine)¹⁷. Auf Grund dieser Eigenschaften sind unterschiedliche Methoden zur Quantifizierung notwendig. Der Anteil von AGEs in Geweben und Plasma kann durch die Messung der charakteristischen Fluoreszenz der AGEs bei 440 nm nach einer Anregung bei 360 nm bestimmt werden¹⁸. Für Argpyrimidine und Pentosidine ist die Fluoreszenz bei 405 nm nach einer Anregung bei 330 nm charakteristisch¹⁹. Mit Hilfe immunologischer Methoden, wie ELISA oder Western Blot, lassen sich sowohl nicht-fluoreszierende wie auch fluoreszierende Glykierungsendprodukte quantifizieren²⁰.

2.1.2. Exogene Aufnahme

Die Entstehung von AGEs unter physiologischen Bedingungen in Folge der Maillard-Reaktion ist nicht die einzige Quelle die zur Anreicherung von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten in unserem Körper führt. Während durch die geringe Temperatur *in vivo* die AGE Bildung ein langsamer Prozess ist, entstehen exogene AGEs durch hohe Temperaturen und Zuckerkonzentrationen bei der Nahrungsmittelverarbeitung sehr schnell. Durch Grillen, Rösten und Braten von Lebensmitteln bilden sich große Mengen an AGEs²¹. Interessanterweise haben protein- und fettreiche Nahrungsmittel den höchsten Gehalt an AGEs, während kohlenhydratreiche Nahrungsmittel deutlich geringere Werte aufweisen²². Einen hohen AGE Anteil findet man auch in Tabakwaren, da bei der Herstellung von Tabakerzeugnissen u.a. Zucker als Zusatzstoff eingesetzt wird. Die Feueretrocknung der Tabakblätter löst dann ähnliche chemische Vorgänge wie bei der Maillard-Reaktion aus. Schließlich werden durch das Verbrennen der Tabakwaren die AGE-Verbindungen freigesetzt und können so inhaliert werden²³. Vergleichbare Prozesse finden auch bei der Herstellung von Bier und Spirituosen statt. Unsere tägliche Aufnahme von Amadori-Produkten über die Nahrung beträgt in etwa 500 bis 1200 mg, die von AGEs ungefähr 25 bis 75 mg²⁴. Im Dünndarm werden etwa 10 % der über die Nahrung aufgenommenen Glykierungsendprodukte resorbiert. Koschinsky et al.²⁵ konnten zeigen, dass bei normaler Nierenfunktion etwa ein Drittel der resorbierten AGEs innerhalb von 48 Stunden

ausgeschieden wird. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion ist die Ausscheidungsrate deutlich geringer, was zu einer verstärkten Akkumulation von AGEs bei Niereninsuffizienz führt²⁵. Ein Teil der exogen aufgenommenen AGEs verbleibt im Körper und trägt zusammen mit den endogen gebildeten AGEs zur Anreicherung der fortgeschrittenen Glykierungsendprodukte in Plasma- und Gewebeproteinen im Laufe des Lebens bei.

2.2. Einfluss von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten

2.2.1. Quervernetzung von Strukturproteinen

An Proteinen mit langer Halbwertszeit (z.B. Kollagen) bewirken fortgeschrittene Glykierungsendprodukte durch die Ausbildung von intermolekularen und intramolekularen Quervernetzungen Strukturveränderungen, die zu einer verminderten Funktionalität bis hin zum vollständigen Funktionsverlust dieser langlebigen Strukturproteine führen. Ein solches Strukturprotein ist Kollagen, welches sich hauptsächlich in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes findet. Die extrazelluläre Matrix stellt den Hautanteil des Bindegewebes dar, sie befindet sich zu einem geringen Anteil auch in Epithel- und Muskelgeweben. Die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix sind Kollagenfasern, elastische Fasern (z.B. Elastin), Adhäsionsproteine, wie Fibronectin und Laminin, und Proteoglykane. Die vielfältige Zusammensetzung der extrazellulären Matrix wird von ihren Aufgaben, wie z.B. der mechanischen Stabilisierung und Gewährleistung der Elastizität von Gewebe, bestimmt. Im menschlichen Organismus bildet Kollagen mit 30 % den größten Anteil an der gesamten Proteinmasse²⁶. Von großer Bedeutung sind die fibrillären Kollagene, zu deren Gruppe die Kollagene Typ I und III gehören. Sie machen etwa 90 % des gesamten Kollagens aus²⁷. Eine wichtige Eigenschaft ist die hohe Zugfestigkeit von Kollagenfasern. Diese beruht auf physiologischen Quervernetzungen, die während der Fibrillenbildung entstehen. Diese Art von Kollagenmolekülquervernetzungen wird bei der Biosynthese der Kollagene gebildet. Auch durch nicht-enzymatische Glykierung können Quervernetzungen von Kollagenen entstehen. Aufgrund der im Alter verminderten Umsatzrate, der hohen biologischen Halbwertszeit und bei hohen extrazellulären Glukosekonzentrationen, wie z.B. bei schlecht eingestelltem Diabetes mellitus, sind Kollagenmoleküle besonders anfällig für nicht-enzymatische Glykierungen^{13, 28, 29}. Einige AGEs sind in der Lage kovalente Quervernetzungen innerhalb der Kollagenfibrillen einzugehen. Diese unphysiologischen Quervernetzungen führen zu einer zunehmenden Versteifung und einem Elastizitätsverlust des Gewebes. Das alternde Herz ist durch einen Verlust an Myozyten und die Proliferation

von Fibroblasten, welche Kollagen produzieren, gekennzeichnet³⁰. Die Akkumulation von interstitiellem Kollagen verändert die physiologischen Eigenschaften des alternden Herzens. Dies spiegelt sich in einer zunehmenden Fibrose, linksventrikulären Hypertrophie und diastolischen Dysfunktion wieder^{31, 32}. Gewebe, wie die Gefäße und das Herz, die reich an extrazellulärer Matrix und langlebigen Proteinen sind, sind von Modifikationen durch AGEs, wie z.B. *Crosslink* Bildung, besonders betroffen³³⁻³⁵. Durch die Bildung dieser *Crosslinks* kommt es zu einem weiteren Verlust der Elastizität des Gewebes gefolgt von einer zunehmenden Versteifung und weiteren Verstärkung der vaskulären und kardialen Dysfunktion im Alter^{36, 37} sowie bei bestimmten Erkrankungen, wie Diabetes mellitus^{18, 38} und Niereninsuffizienz³⁹⁻⁴¹. Die Modifikationen durch fortgeschrittene Glykierungsendprodukte verändern die Eigenschaften des Kollagens³⁵. Die Quervernetzungen führen zu einer abnehmenden Löslichkeit und erhöhter Denaturierungstemperatur der Kollagene. Außerdem sind modifizierte Kollagene gegenüber dem Abbau durch Matrix-Metalloproteinasen (z.B. Kollagenase) resistenter⁴². Dies ist dadurch erklärbar, dass einerseits die Kollagenfibrillen aufgrund der Quervernetzungen dichter gepackt sind und andererseits die Angriffsstellen für die Enzyme durch AGEs blockiert werden⁴³. Die zunehmende Glykierung der Kollagene in den Gefäßwänden der Arterien steht auch in einem bedeutenden Zusammenhang mit der Entstehung von Arteriosklerose⁴⁴. Shekhonin et al. konnten Kollagen Typ I und III in gesunden und in arteriosklerotischen Gefäßen, besonders in der Intima nachweisen^{45, 46}. Die Tatsache, dass Kollagene in der Subendothelschicht und der im Alter häufig verdickten Intima ansässig sind, ist relevant für den Einfluss der fortgeschrittenen Glykierung auf die Entstehung der Arteriosklerose.

Des Weiteren können AGEs zirkulierende Proteine wie LDL modifizieren¹⁵. Glykiertes LDL (AGE-LDL) wird verstärkt durch humane Intimazellen der Aorta und durch Makrophagen aufgenommen. Dies führt zur vermehrten Bildung von Schaumzellen in der arteriellen Intima und fördert so die Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen⁴⁷. AGEs beeinflussen auch die Endothelfunktion durch die Steigerung von oxidativem Stress und sie aktivieren inflammatorische Prozesse über ihren Rezeptor RAGE^{48, 49}.

2.2.2. Bindung an den Rezeptor RAGE

Rezeptorabhängige Wirkungen von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten werden über ihre Bindung an Rezeptorproteine vermittelt. Es gibt verschiedene mögliche Bindungspartner für AGEs, wie z.B. Galektin-3 (AGE-Rezeptor 3), CD36 oder Lactoferrin, wobei der Rezeptor RAGE, der am besten untersucht ist¹¹. Der Rezeptor für

fortgeschrittene Glykierungsendprodukte - RAGE - gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und wird u.a. auf der Zelloberfläche von Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, glatten Muskelzellen und T-Lymphozyten exprimiert¹⁶. RAGE ist ein Multiligandenrezeptor an den neben AGEs auch S100-Proteine, Amyloid- β -Peptide und Amphoterin binden können. Unter physiologischen Bedingungen wird RAGE insbesondere in den Typ-I-Alveolarzellen der Lunge exprimiert⁵⁰. Im Vergleich zur Lunge wird RAGE in anderen Geweben nur geringfügig exprimiert. Allerdings kann unter pathologischen Bedingungen eine höhere RAGE Expression induziert werden. Dies konnte bei der diabetischen Vasculopathie⁵¹ und auch nach mechanischen Gefäßverletzungen durch eine Ballondilatation⁵² gezeigt werden. RAGE ist ein Transmembranrezeptor, dessen Struktur sich aus insgesamt 3 Einheiten, einer extrazellulären, intrazellulären sowie cytosolischen Domäne, zusammensetzt. Die extrazelluläre Domäne dient zur Bindung der RAGE-Liganden und besteht aus einer variablen V-Region und zwei konstanten Regionen. Die Transmembrandomäne verankert den Rezeptor in der Zelle und die cytosolische Komponente dient zur Weiterleitung der Rezeptorsignaltransduktion (Abb.2). Bei der Bindung von AGEs an RAGE werden NADPH-Oxidasen aktiviert. Dies hat eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) und eine Zunahme von intrazellulärem oxidativen Stress zur Folge^{13, 53}. Zunehmender oxidativer Stress bewirkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B⁵⁴. Bei NF- κ B handelt es sich um einen Proteinkomplex, der durch Bindung an regulatorische Abschnitte der DNA die Transkription von Zytokinen (z.B. IL-6, TNF- α), Adhäsionsmolekülen (z.B. VCAM-1), prothrombotischen und vasokonstriktiven Genprodukten, sowie von RAGE (positive Rückkopplung) beeinflusst⁵⁵. Als Transkriptionsfaktor spielt NF- κ B eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Zellproliferation und Apoptose sowie bei Entzündungsprozessen⁵⁶. Die Interaktion von AGE mit RAGE bewirkt außerdem die Aktivierung einer Vielzahl weiterer zellulärer Signalkaskaden¹¹. Wei et al. konnten zeigen, dass AGEs die Verkalkung von Gefäßen über die RAGE-ROS Interaktion steuern⁵⁷. Außer der gesteigerten ROS Produktion führt die Bindung von AGE an RAGE auch zu einer verminderten zellulären Abwehr⁵⁶. Die Blockade von RAGE verzögert die inflammatorische Antwort, während die Aktivierung von RAGE am Endothel und den Lymphozyten zu einer zellulären Reaktion führt, die die Ausschüttung von pro-entzündlichen Mediatoren forciert¹¹. Chavakis et al.⁵⁸ fanden heraus, dass RAGE ein Gegenrezeptor für das Leukozyten Integrin Mac-1 ist, welches direkt die Leukozytenrekrutierung steuert. Die Aktivierung von RAGE an Leukozyten führt zu einer NF- κ B abhängigen Genexpression.

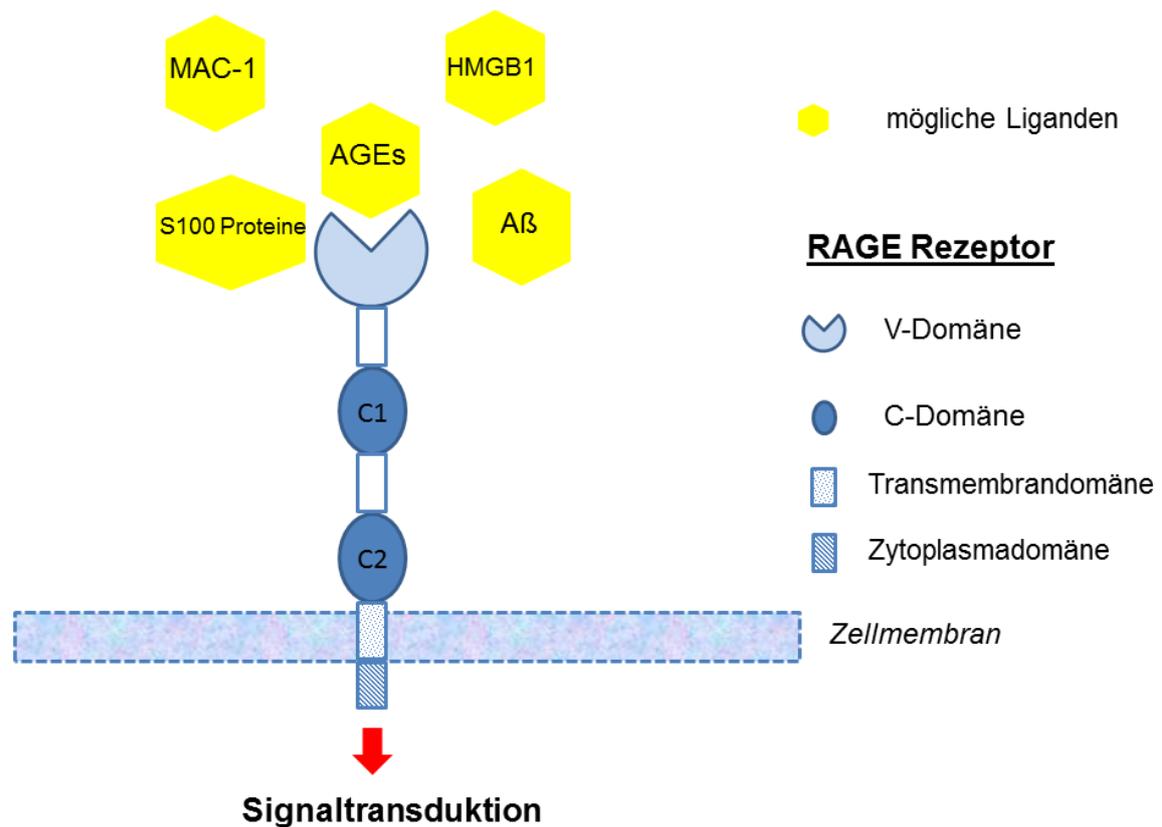


Abbildung 2: Schematische Darstellung des RAGE-Rezeptors

V-Domäne, variable Region des Rezeptors; C-Domänen, konstante Regionen des Rezeptors; A β , Beta-Amyloid-Peptide; AGEs, fortgeschrittene Glykierungsendprodukte; HMGB1, High-Mobility-Group-Protein B1; MAC-1, Leukozyten Integrin Mac-1; S100 Proteine, Proteine der Multigen Familie S-100. (Hofmann; unveröffentlicht)

Neben der membrangebundenen Form von RAGE gibt es im Blut noch lösliche Isoformen (sRAGE und esRAGE), welche lediglich aus der extrazellulären Domäne bestehen. Sie scheinen durch alternatives Splicing des RAGE-Gens (esRAGE) oder bei der Abspaltung der membrangebundenen RAGE-Domäne durch Metalloproteinasen (sRAGE) zu entstehen^{59, 60}. sRAGE ist ebenfalls in der Lage, AGEs zu binden und konkurriert somit mit RAGE um den Bindungspartner. Aufgrund dessen wird sRAGE eine physiologische Rolle als kompetitiver Inhibitor der AGE-RAGE-Interaktion zugeschrieben, und damit auch die Hemmung der RAGE-vermittelten Signalwege. In der Tat konnte Falcone et al. zeigen, dass geringe Spiegel von sRAGE im Plasma mit einer erhöhten KHK Inzidenz verbunden sind⁶¹. Bucciarelli et al. fanden, dass die Verabreichung von sRAGE bei diabetischen Apo-E Knockout Mäusen eine Verminderung von arteriosklerotischen Veränderungen zur Folge hatte⁶². Allerdings berichteten Simm et al., dass sich erhöhte intraoperative sRAGE Spiegel bei koronarchirurgischen Eingriffen negativ auf die postoperativen Verläufe auswirkten⁶³.

3. Nicht-invasive Marker der Gefäßfunktion und der fortgeschrittenen Glykierung

3.1. Die zentrale Pulswellengeschwindigkeit

Die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität steht in enger Beziehung zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der arteriellen Gefäßwand, die vorzugsweise im Bereich der Aorta und der proximalen elastischen Arterien auftritt. Mit fortschreitendem Alter und unter dem Einfluss verschiedener Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Hypertonus und Niereninsuffizienz, manifestiert sich die Zunahme der arteriellen Gefäßsteifigkeit. Diese beeinflusst die Herz-Kreislauf-Funktion durch den Anstieg des Pulsdrucks, der kardialen Nachlast und die Verminderung der Koronarperfusion infolge des sinkenden diastolischen Blutdrucks negativ.

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts begann die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit der arteriellen Gefäßfunktion des Menschen. Mahomed beschrieb 1874 erstmals den Unterschied der arteriellen Pulswelle (Sphygmographie) zwischen normotensiven und hypertensiven Personen⁶⁴. Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelten Riva-Rocci⁶⁵ und Korotkow⁶⁶ die Sphygmomanometrie, die die Pulskonturanalyse zunächst verdrängte. Bramwell und Hill⁶⁷ entwickelten schließlich mit der Bestimmung der Pulswellengeschwindigkeit eine nicht-invasive Methode zur Untersuchung der arteriellen Gefäßfunktion. Mit Beginn des 21. Jahrhunderts erfuhr die Pulswellenanalyse eine Renaissance⁶⁸. Heute stellt die nicht-invasive Messung der zentralen (carotideo-femorale) Pulswellengeschwindigkeit als Marker der aortalen Gefäßelastizität den „Goldstandard“ der nicht-invasiven Untersuchung der Gefäßsteifigkeit dar⁶⁹.

Beim Gesunden puffert die Aorta durch ihrer Eigenschaft der reversiblen Dehnbarkeit den durch den linksventrikulären Auswurf bedingten Blutdruckanstieg und wandelt einen zyklisch-pulsatilen Blutflusses in eine kontinuierlich-phasische Strömung um (Windkesselfunktion)⁷⁰. Die beim Auswurf des Schlagvolumens entstehende Druckwelle (Puls) läuft mit der Pulswellengeschwindigkeit (Pulse Wave Velocity, PWV) durch das arterielle Gefäßsystem und wird an den Abgängen des Gefäßbaums, besonders jedoch an den prä-kapillaren Widerstandsgefäßen der unteren Extremität, reflektiert. Die Auswirkung der reflektierten Pulswelle auf den Anstieg des aortalen Blutdrucks hängt im Wesentlichen davon ab, zu welchem Zeitpunkt des Herzzyklus die reflektierte Welle die thorakale Aorta erreicht. Bei jungen Menschen mit elastischer Aorta fällt die reflektierte Pulswelle während der Diastole ein. Es kommt also physiologisch zu einem Anstieg des mittleren diastolischen

Blutdrucks. Dieses wichtige Phänomen geht mit zunehmender Gefäßsteifigkeit verloren. Der Elastizitätsverlust der Gefäße resultiert in einer höheren Pulswellengeschwindigkeit, so dass die reflektierte Welle bereits in der Systole einfällt und damit den systolischen Blutdruck erhöht. Die Zunahme der Gefäßsteifigkeit und damit verbundene Abnahme der aortalen Windkesselfunktion hat charakteristische Veränderungen der Hämodynamik durch die verminderte Retraktionskraft der Aorta und die Verlagerung der reflektierten Pulswelle in die Systole zur Folge.

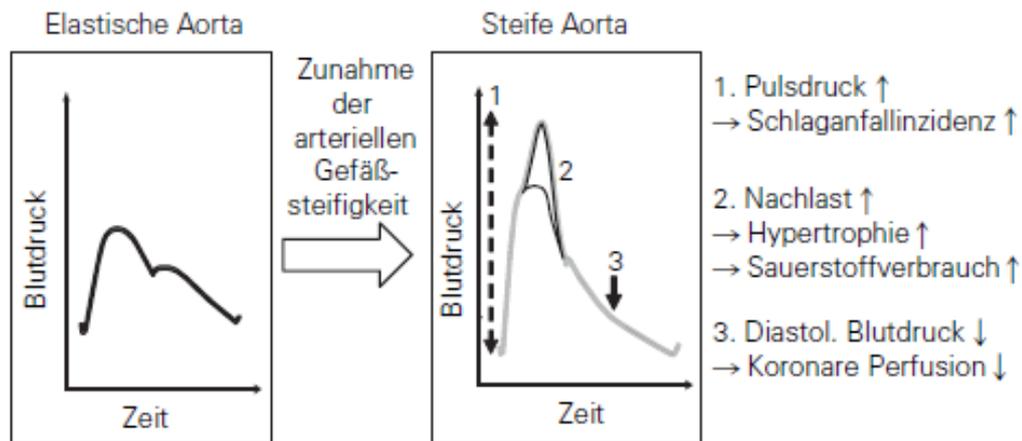


Abbildung 3: Darstellung der Veränderungen beim Verlust der arteriellen Gefäßelastizität⁷¹

Die Pulswellengeschwindigkeit (m/s) stellt das Verhältnis zwischen der zurückgelegten Distanz der Pulswelle und der Pulstransitzeit zwischen den beiden Messpunkten dar. Die zentrale oder aortale Pulswellengeschwindigkeit wird anhand von Pulscurven der Arteria carotis und Arteria femoralis bestimmt. Als hämodynamische Größe wird die Pulswellengeschwindigkeit vom Blutdruck und der Herzfrequenz beeinflusst⁷². Die aortale Pulswellengeschwindigkeit liegt bei jungen Menschen zwischen 4 bis 8 m/s und bei älteren Personen abhängig vom Elastizitätsverlust zwischen 8 und 14 m/s⁷¹. Patienten mit koronarer Herzkrankheit als Manifestationsform der Arteriosklerose weisen deutlich höhere Pulswellengeschwindigkeiten auf als gesunde Probanden^{73, 74}. Seit der "Framingham Heart Study"⁷⁵ ist weitestgehend akzeptiert, dass eine höhere aortale Gefäßsteifigkeit mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse verbunden ist. In der Vergangenheit wurde die Pulswellengeschwindigkeit meist mit Hilfe von transkutanen Druckaufnehmern (Tonometer)⁷⁶ an den Gefäßen aufgezeichnet und die zwischen ihnen liegende Strecke mit einem Maßband auf der Körperoberfläche bestimmt. Diese Methode ist zeitaufwendig, verlangt eine gute Ausbildung des Untersuchers und es muss zur Messung die A. femoralis in der Leiste exponiert werden⁷⁷. Neuere automatisierte oszillometrische Verfahren haben

den Vorteil, dass die Pulswellengeschwindigkeit zuverlässig ohne langwieriges Untersuchertraining und die Freilegung der Leistenregion erhoben werden kann. Bei der oszillometrischen Messung erfolgt die Berechnung der PWV anhand der aufgezeichneten Pulscurven und der daran berechneten Zeitdifferenz zwischen den beiden Pulswellen⁷⁸.

Für die nicht-invasive Messung der Pulswellengeschwindigkeit in den hier dargestellten Untersuchungen wurde der oszillometrische Vicorder[®] Apparat (SMT Medical, Würzburg, Deutschland) genutzt⁷⁹⁻⁸⁶.

3.2. Die Hautautofluoreszenz

Die Messergebnisse von im Blut zirkulierenden AGEs unterliegen sehr starken Schwankungen, z.B. postprandial⁸⁷, deshalb hat sich die Messung von gewebsgebundenen fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten zunehmend durchgesetzt. Besonders in Geweben mit einem hohen Anteil an extrazellulärer Matrix (und langsamen Protein-Turnover), wie der Haut, der Gefäßwand und der Augenlinse wurde eine hohe und stabile AGE Akkumulation nachgewiesen^{88, 89}. Die Messung in diesen Geweben eignet sich deshalb besser für langfristige Aussagen⁹⁰. Als eine einfache, nicht-invasive Methode zur Messung von gewebsgebundenen AGEs hat sich die Messung der Hautautofluoreszenz (Skin autofluorescence, sAF) etabliert^{91, 92}. Die spektroskopische Messung der sAF beruht auf der natürlichen Lichtemission einiger AGEs, wie Pentosidin und CEL, wohingegen nicht-fluoreszierende AGEs, wie CML, nicht erfasst werden⁹³. Zur Gesamtautofluoreszenz der Haut tragen außerdem weitere autofluoreszierende Substrate, wie redoxregulierte Fluorophore (z.B. NADH, Flavin-Adenin-Dinukleotid und Porphyrine) bei^{94, 95}. Allerdings ist die Variabilität der Hautautofluoreszenz zu 76% durch die des Pentosidins erklärbar⁹⁶. Für die nicht-invasive Messung der sAF wurde in den Untersuchungen der validierte AGE-Reader (DiagnOptics, Groningen, Niederlande) verwendet^{91, 97}. Der Proband legt seinen Unterarm auf eine spezielle Messlehne, in deren Mitte sich ein Fenster befindet. Durch dieses Fenster wird auf ein etwa 4 cm² großes Hautareal, welches gegen Umgebungslicht abgeschirmt ist, Anregungslicht aufgestrahlt. Das aus mehreren lichtemittierenden Dioden aufgestrahlte Licht hat eine maximale Intensität bei einer Wellenlänge von etwa 360 nm im Frequenzbereich von 300-420 nm. Ein Detektor misst mit Hilfe verschiedener Fotodioden die Frequenzverteilung und die Strahlungsintensität des emittierten und reflektierten Lichts im Wellenlängenbereich von 300 bis 600 nm. Das Ergebnis der Messung wird in willkürlichen Einheiten (*Arbitrary Units*, a.u.) angegeben. Es ist der Quotient aus der Intensität des reflektierten Lichts durch die Intensität des Exzitationslichts multipliziert mit

100⁹⁸. Eine Messung dauert etwa 12 Sekunden. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden drei aufeinanderfolgende Messungen der sAF von drei verschiedenen Stellen der Innenseite des Unterarms, die frei von Narben, Hyperpigmentierungen und anderen dermatologischen Veränderungen waren, gemittelt. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass diese Stellen nicht mit Selbstbräunungscreme oder anderen Hautpflegemitteln vorbehandelt waren. Die Validierung dieser Messmethode erfolgte in zahlreichen Studien, u.a. wurden die sAF Ergebnisse mit den biochemischen Analysen von Hautbiopsien verglichen^{91, 99, 100}. Interessanterweise ergab sich nicht nur zwischen der Hautautofluoreszenz und der Konzentration von fluoreszierenden AGEs sondern auch zur Konzentration nicht-fluoreszierender AGEs ein signifikanter Zusammenhang. Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass unterschiedliche AGEs parallel gebildet werden. Meerwaldt et al.⁹¹ konnten zeigen, dass wiederholte sAF Messungen an einem Tag eine intraindividuelle Variabilität von 5,03 % aufweisen. Die saisonale Variabilität der Hautautofluoreszenz war 5,87 %. Die Standardabweichung der sAF liegt bei 0,5 a.u., was 20% des Mittelwerts entspricht¹⁰¹.

Tabelle 1: Hautautofluoreszenz gemessen bei Probanden und KHK Patienten

| Altersgruppe (Jahre) | sAF bei Probanden MW ± SD (a.u.) | sAF bei KHK Patienten MW ± SD (a.u.) | t-Test p-Wert |
|---------------------------------|---|---|--------------------------|
| 40-49 | 1,93 ± 0,25 (n=67) | 2,34 ± 0,44 (n=15) | < 0,0001 |
| 50-59 | 2,15 ± 0,33 (n=82) | 2,58 ± 0,6 (n=56) | < 0,0001 |
| 60-69 | 2,26 ± 0,45 (n=139) | 2,73 ± 0,54 (n=114) | < 0,0001 |
| 70-79 | 2,47 ± 0,51 (n=93) | 2,82 ± 0,59 (n=133) | < 0,0001 |
| > 80 | 2,76 ± 0,48 (n=21) | 3,14 ± 0,67 (n=16) | 0,05 |

sAF, Hautautofluoreszenz; KHK, koronare Herzkrankheit. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung in willkürlichen Einheiten dargestellt. (Hofmann, Simm; unveröffentlicht)

4. Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, welche Auswirkungen fortgeschrittene Glykierungsendprodukte und der Rezeptor RAGE im kardiovaskulären System haben. Dazu sollten Kollagenmodifikationen im Bereich der Gefäße und des Herzens und deren Einfluss auf die Zellmigration, die Gefäßversteifung und die kardiale Funktion untersucht werden. Darüber hinaus sollten nicht-invasive Marker der Gefäßfunktion und der fortgeschrittenen Glykierung als Prädiktoren für die kardiovaskuläre Situation und den postoperativen Verlauf evaluiert werden. Ein weiteres Vorhaben konzentrierte sich auf die Auswirkungen einer fettreichen Ernährung auf die Entstehung von kardialen und valvulären Veränderungen im Mausmodell unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses des AGE-Rezeptors RAGE.

5. Wirkung fortgeschrittener Glykierungsendprodukte im kardio-vaskulären System

5.1. Glykierung der extrazellulären Matrix und Zellmigration

Die extrazelluläre Matrix ist eine komplexe und hoch organisierte Struktur von Kollagenfasern, elastischen Fasern (z.B. Elastin), Adhäsionsproteinen, wie Fibronectin und Laminin, sowie Proteoglykanen. Die fibrillären Kollagene Typ I und III gehören zu den Hauptkomponenten der Gewebematrix. Durch Veränderungen der extrazellulären Matrix in Folge von Glykierung könnte die Migration und Adhäsion von Zellen, wie Endothelzellen und Fibroblasten, verändert werden. Dies wiederum würde die Immunreaktionen im Gewebe verändern und somit die Wundheilung nach Operationen wie auch das Einheilen von, z.B. Bypassgraftmaterial, negativ beeinflussen. Insbesondere im Alter und bei Diabetes wurden derartige Probleme beschrieben. Aus diesem Grund haben wir in einem *in vitro* Modell den Einfluss von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten und der durch sie veränderten Matrix auf die Adhäsion und Migration von T-Zellen untersucht. Hierzu wurde mit einer humanen Jurkat T-Zelllinie gearbeitet. Die Jurkat-T-Zellen wurden auf die Expression von AGE-Rezeptoren untersucht. Hier zeigte sich, dass sie Galectin-3 und RAGE mäßig exprimierten, wobei eine hohe Expression des Rezeptors CD36 zu verzeichnen war. Im Weiteren wurde die stimulierte und nicht stimulierte Migration der T-Zellen mit Hilfe von Transwell Experimenten untersucht. Die Stimulation erfolgte mit dem *stromal cell-derived* Faktor 1 α (SDF-1 α), der ein Chemokin ist und an seinem Hauptproduktionsort dem Knochenmark nachweislich die Migration, d. h. die zielgerichtete Wanderung, die Aktinpolymerisation und somit die Verankerung von hämatopoetischen Stammzellen (CD34-positive Zellen) bewirkt¹⁰². Der CXCR4-Rezeptor für SDF-1 α wurde von den genutzten Jurkat T-Zellen exprimiert. In den Experimenten wurden der Einfluss von AGEs auf die Zellen direkt durch die Vorinkubation mit AGE-modifiziertem Plasma und die anschließende Untersuchung der Wanderung, sowie der Einfluss von AGE-modifiziertem Plasma in der unteren Kammer des Transwells auf die Wanderung und schließlich der Einfluss von AGE-modifizierter Matrix auf die Zellwanderung und die Zelladhäsion untersucht. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Untersuchungen ergaben, dass die gerichtete Wanderung der T-Zellen mit SDF-1 α Stimulation 3,5 mal höher war, aber die Vorinkubation der Zellen mit AGE-modifiziertem Plasma die stimulierte und nicht stimulierte Wanderung nicht beeinflusste.

AGEs haben daher wahrscheinlich wenig Einfluss auf die Migrationsfähigkeit per se. Die Gabe von AGE-modifiziertem Plasma zusammen mit SDF-1 α in die untere Kammer des Transwells hemmte die SDF-1 α induzierte Jurkat Zellmigration in einem signifikanten Ausmaß. Im Folgenden wurde das Matrixprotein Fibronectin mit Methylglyoxal (Induktor der AGE-Modifikation Arg-pyrimidin) modifiziert. Die stimulierte und nicht stimulierte Migration der Jurkat T-Zellen wurde durch die AGE-modifizierte Fibronectinmatrix gehemmt. Da die Voraussetzung für die Zellmigration die Adhäsion und die den Migrationszyklus einleitende Aktinpolymerisation ist wurde nun evaluiert, ob diese Mechanismen durch die fortgeschrittene Glykierung beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der Jurkat T-Zellen durch eine AGE-Modifikation der Matrix deutlich reduziert wird und die Aktinpolymerisation gehemmt ist (Abb.4).

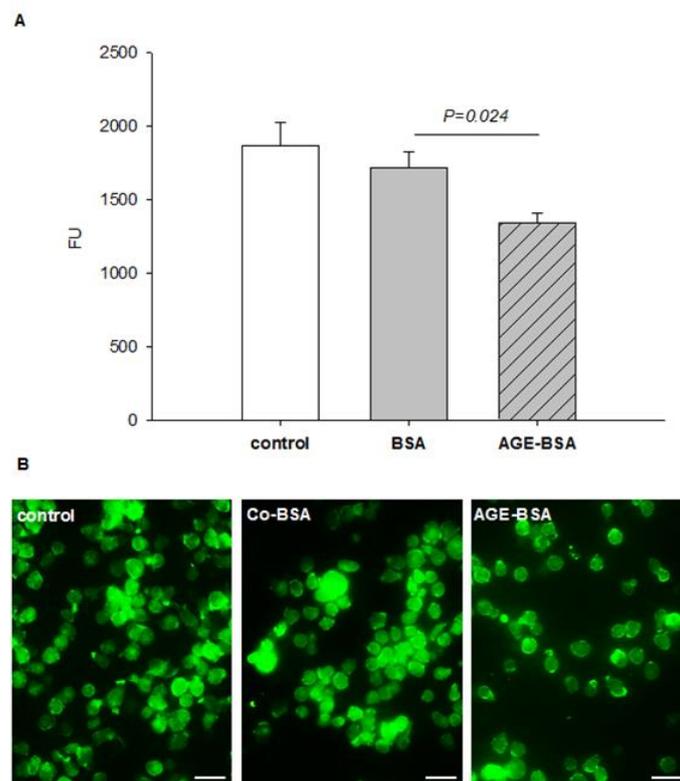


Abbildung 4: Aktinpolymerisation von adhärennten Jurkat T-Zellen

Eine Fibronectin Matrix wurde für eine Stunde mit 100 μ g PBS (Control), oder 100 μ g Co-BSA (Kontroll-BSA) oder 100 μ g AGE-BSA (AGE-modifiziertes BSA) vorbehandelt.

A) Die Fluoreszenz wurde mit einem Mikroplate Reader bei 495 nm Anregung und 520 nm Emission gemessen. Die Daten sind als MW \pm SEM angegeben.

B) Die Aktinpolymerisation wurde durch eine Phalloidin Färbung visualisiert, (Balken = 20 μ m).

Aus Haucke et al., 2014 (8.1)

Um diese *in vitro* Ergebnisse in Bezug zur *in vivo* Situation zu setzen, wurde aus humanem venösem Bypass Graft Material Kollagen Typ I und III isoliert. Die Modifikation des isolierten Kollagens wurde mittels der AGE-spezifischen Fluoreszenz und immunhistologisch mit Hilfe eines Arg-Pyrimidin Antikörpers untersucht. So konnte ein hochmodifizierter und niedrig modifizierter Kollagenpool gebildet werden. Die stimulierte und nicht stimulierte Wanderung der T-Zellen wurde durch das isolierte modifizierte und hochmodifizierte Kollagen, welches als Matrix verwendet wurde, signifikant gehemmt (Abb.5).

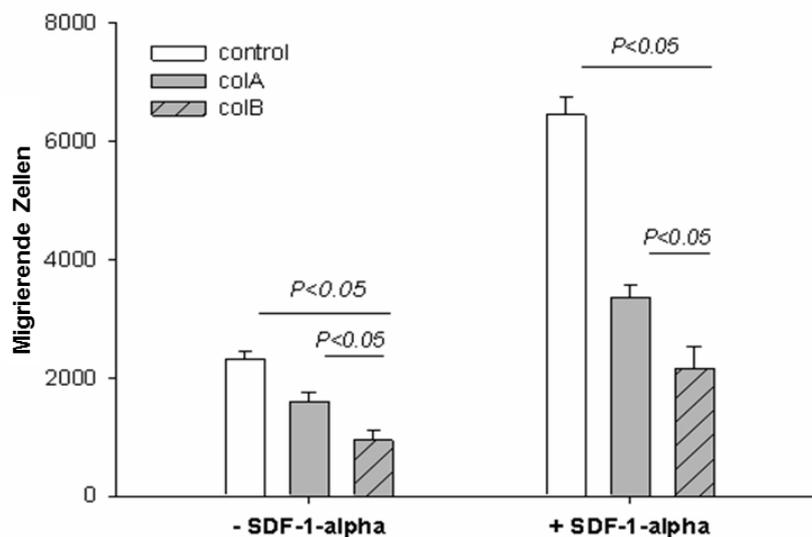


Abbildung 5: Transmigration von Jurkat T-Zellen

(-SDF-1 α) ohne und mit Stimulation (+SDF-1 α) durch eine Matrix aus humanem AGE-modifizierten Kollagen. Die Daten sind als MW \pm SEM angegeben. ColA – geringer modifiziertes humanes Kollagen. ColB – höher modifiziertes humanes Kollagen. Aus Haucke et al., 2014 (8.1)

Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten nachgewiesen werden, dass AGE-modifizierte lösliche Proteine die Zellmigration offensichtlich nicht direkt über Rezeptor vermittelte Reaktionen hemmen. Dagegen kommt es im Verlaufe der Glykierung der extrazellulären Matrix zu Veränderungen des „normalen Mikromilieus“ der Zellen. Dies beeinflusst die Adhäsion, Aktinpolymerisation und damit die gerichtete Zellwanderung

negativ und führt so zu Veränderungen der Zell- und Gewebefunktionen. Es konnte gezeigt werden, dass Kollagen mit zunehmender AGE-Modifikation sowohl die Chemotaxis wie auch die Migration signifikant reduziert. Während viele Arbeitsgruppen sich auf die zellvermittelten Effekte löslicher fortgeschrittener Glykierungsendprodukte konzentrieren, weisen unsere Daten eher darauf hin, dass Veränderungen der extrazellulären Matrix das Hauptproblem in diesem Zusammenhang sind.

Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert in dem Manuskript:

Haucke E, Navarrete-Santos A, Simm A, Silber RE, Hofmann B (2014). Glycation of extracellular matrix proteins impairs migration of immune cells. *Wound Repair Regen.* 22(2):239-245.

5.2. AGE-Modifikationen der vaskulären Matrix

Um die vaskulären Modifikationen durch fortgeschrittene Glykierungsendprodukte zu untersuchen, erfolgte die Extraktion von Kollagenfraktionen aus dem Venengewebe von 52 KHK Patienten. Die erste Kollagenfraktion (*Pepsin Digestible Collagen Fraction*, PDCF) wurde durch Säure und Pepsin extrahiert – die sogenannte pepsin- und säurelösliche Kollagenfraktion¹⁰³. Das pepsin- und säureunlösliche Kollagen verbleibt nach dem Pepsinverdau im restlichen Venenmaterial. Durch den Verdau dieser primär unlöslichen Fraktion mit Proteinase K und Kollagenase Typ I erhielt man Peptide des stärker modifizierten Kollagens (*Collagenase Digestible Collagen Fraction*, CDCF)^{28, 42}. Diese Fraktion stellt die kollagenase- und proteinaselösliche Kollagenfraktion dar. Die extrahierten Peptide wurden anschließend mittels Fluoreszenzmessung (360 nm Anregung, 440 nm Emission) und Anwendung des Slot-Blot-Verfahrens auf AGE-Modifikationen hin untersucht. Über eine quantitative Analyse von Hydroxyprolin (*4-Hydroxyproline Assay*)¹⁰⁴ ließ sich die isolierte Kollagenmenge bestimmen. Somit konnten vergleichende Aussagen über das Ausmaß an modifiziertem Kollagen in den jeweiligen Proben gemacht werden. Die Untersuchungen ergaben eine Reihe interessanter Ergebnisse. So konnte gezeigt werden, dass die Isolierbarkeit der ersten, durch Säure und Pepsin, isolierten Kollagenfraktion der Venen mit steigendem Alter der Patienten signifikant abnimmt. Da man davon ausgeht, dass Kollagene nicht quantitativ durch Säure und Pepsin extrahierbar sind, wurde die Behandlung des Gewebes mit Kollagenase Typ I und Proteinase K hinzugezogen. Interessant waren die Untersuchungen der unterschiedlichen Kollagenfraktionen im Zusammenhang mit Alter, Diabetes und anderen Patientenparametern. In den Analysen der Fluoreszenzen und der Detektion der Arg-Pyrimidin Modifikationen, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen

den isolierten Kollagenfraktionen. Die Kollagenase-verdauliche Kollagenfraktion (CDCF) wies in beiden Fällen signifikant mehr Modifikationen auf, als die Pepsin-verdauliche Kollagenfraktion (PDCF). Die analysierte extrazelluläre Matrix der Venen zeigte eine Erhöhung der gemessenen AGE-Fluoreszenz in der CDCF mit steigendem Alter der Patienten, wohingegen die PDCF mit höherem Alter weniger AGE-Fluoreszenz aufwies. Je weniger Kollagen aus Venen durch den Verdau mit Kollagenase isoliert werden konnte, desto mehr Fluoreszenz zeigte dieses. Dies spricht dafür, dass mit steigendem Alter die AGE bedingten Modifikationen am Kollagen zunehmen und gleichzeitig diese durch die Quervernetzungen zu einer erschwerten Extrahierbarkeit führen. Die vorliegenden Untersuchungen wurden an humanem venösem Material der *Vena saphena magna*, was nach aortokoronaren Bypass-Operationen übrig geblieben war, durchgeführt. Leider stand nicht genügend arterielles Graftmaterial zur Verfügung, um entsprechende Daten aus Arterien zu gewinnen. Man könnte vermuten, dass Modifikationen im arteriellen Material sogar ausgeprägter sind, da dieses über mehr extrazelluläre Matrix verfügt¹⁰⁵ und im arteriellen System höhere Glukosespiegel registriert wurden¹⁰⁶. Dagegen spricht, dass die *Arteria thoracica interna* als arterielles Graft in klinischen Studien selbst bei Diabetikern bessere Langzeitergebnisse zeigte als venöse Grafts¹⁰⁷.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine gute Korrelation der analysierten modifizierten Kollagen Fraktionen zum Alter der Patienten und zum Auftreten von Typ-2 Diabetes gezeigt werden konnte.

Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert in dem Manuskript:

Hofmann B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Navarrete Santos A (2013). Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function? *Exp Gerontol.* 48(1):38-44.

5.3. AGE-Modifikationen der kardialen Matrix

Die meisten Untersuchungen zur Bestimmung des Ausmaßes der fortgeschrittenen Glykierung im Gewebe fanden bisher an Hautbiopsien statt. Obwohl bekannt ist, dass das Herz im Alter und bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus von einer interstitiellen Akkumulation von modifizierten und quervernetzten Kollagenen betroffen ist, was zu Veränderungen der physiologischen Eigenschaften des Herzens führt, gibt es hierzu bisher keine Daten vom Menschen. Um die kardialen Modifikationen durch fortgeschrittene Glykierungsendprodukte zu untersuchen, haben wir drei Kollagenfraktionen aus dem

Vorhofohrgewebe von 72 KHK Patienten isoliert. Neben den bereits erwähnten Kollagenfraktionen, der Pepsin-verdaulichen Kollagenfraktion (PDCF) und der Kollagenase-verdaulichen Kollagenfraktion (CDCF), ist es uns gelungen durch Hydrolyse eine weitere, noch stärker modifizierte Kollagenfraktion, die unlösliche (*Insoluble Collagen Fraction*, ICF) Kollagenfraktion, zu extrahieren. Wir haben diese Kollagenfraktion so benannt, da es sich hier um das Material handelt, was offensichtlich auf Grund der starken Quervernetzungen weder durch den Pepsinverdau, noch durch die Kollagenase- und Proteinase-Behandlung, extrahierbar ist. Die extrahierten Fraktionen wurden wiederum mittels Messung der intrinsischen AGE-Fluoreszenz (360 nm Anregung, 440 nm Emission) auf AGE-Modifikationen hin untersucht. Über eine quantitative Analyse von Hydroxyprolin (*4-Hydroxyproline Assay*)¹⁰⁴ ließ sich die isolierte Kollagenmenge bestimmen. Somit konnten vergleichende Aussagen über das Ausmaß an modifiziertem Kollagen in den jeweiligen Proben gemacht werden. Unsere Analysen zeigten anhand der intrinsischen AGE-Fluoreszenz, dass die PDCF am wenigsten AGE-modifiziert ist. Die CDCF war stärker modifiziert und die ICF war die am stärksten AGE-modifizierte Kollagenfraktion. Die intrinsische AGE-Fluoreszenz der CDCF und der ICF korrelierte positiv mit dem Alter der Patienten. Die Menge an AGE-modifiziertem Kollagen der ICF war bei Patienten mit Diabetes mellitus signifikant erhöht. Die Blutzuckerspiegel und HbA_{1c}-Werte standen in klarem Zusammenhang mit der extrahierbaren Gesamtkollagenmenge und der intrinsischen AGE-Fluoreszenz der ICF. Zudem zeigte sich in einer Multivarianzanalyse, dass die am meisten modifizierte Kollagenfraktion aus dem rechten Vorhofohr, die ICF, prädiktiv für den postoperativen Verlauf der Patienten ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gelungen ist, modifizierte Kollagenfraktionen im Herzen nachzuweisen und der Grad der AGE-Modifikationen mit dem Alter der Patienten (Abb. 6), der Inzidenz von Diabetes mellitus (Abb. 7), der Höhe der Blutzuckerspiegel und HbA_{1c}-Werte in Zusammenhang stand. Außerdem ist es gelungen in einer multiplen logistischen Regressionsanalyse zu zeigen, dass die am stärksten AGE-modifizierte kardiale Kollagenfraktion einen prädiktiven Wert für die postoperative Morbidität der Patienten hat (Tab. 2).

Tabelle 2: Multiple logistische Regression mit Bezug zur postoperativen Morbidität

| Variable | Odds ratio | 95% CI | p-Wert |
|-----------------------|------------|----------------|--------------|
| FL360_PDCF (a.u.) | 1,005 | 0,993 - 1,017 | 0,399 |
| FL360_CDCF (a.u.) | 0,998 | 0,996 - 0,999 | 0,036 |
| FL360_ICF (a.u.) | 3,604 | 1,293 - 10,041 | 0,014 |
| Alter (Jahre) | 1,131 | 0,998 - 1,281 | 0,054 |
| HbA _{1c} (%) | 1,030 | 0,741 - 1,432 | 0,860 |
| Blutzucker (mmol/l) | 0,674 | 0,364 - 1,247 | 0,209 |
| Kreatinin (µmol/l) | 1,056 | 1,009 - 1,105 | 0,018 |

Nutzung der kombinierten postoperativen Morbidität (nach STS-Score) als abhängige Variable, FL360, intrinsische AGE-Fluoreszenz bei 360 nm Anregung und 440 nm Emission; PDCF, Pepsin-verdauliche Kollagenfraktion; CDCF, Kollagenase-verdauliche Kollagenfraktion; ICF, unlösliche Kollagenfraktion. (Hofmann, Jacobs; unveröffentlicht).

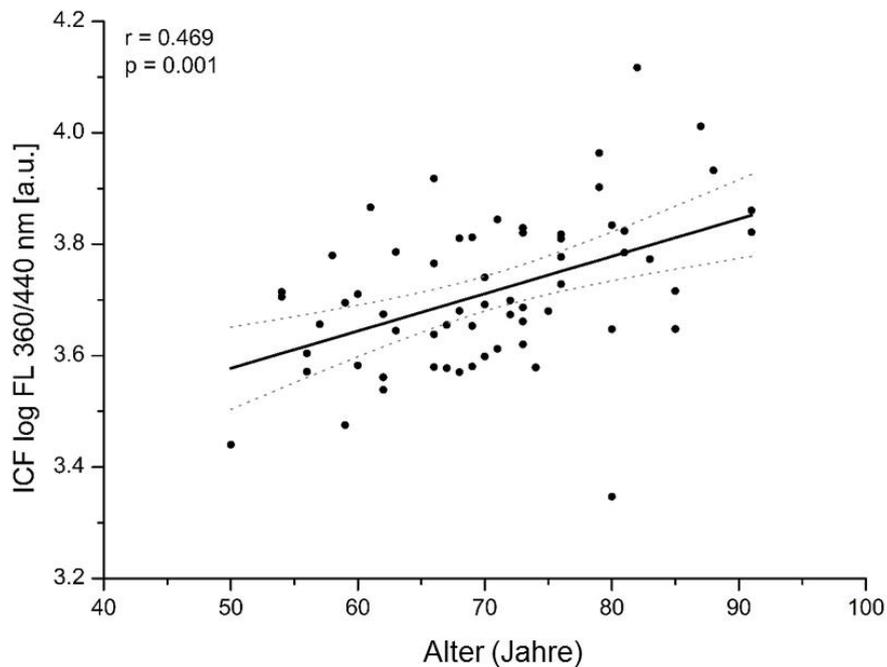


Abbildung 6: Darstellung der intrinsischen AGE-Fluoreszenz in Korrelation zum Alter

ICF, unlösliche Kollagenfraktion aus kardialem Gewebe von KHK Patienten. Intrinsische AGE-Fluoreszenz; Anregung bei 360 nm und Emission bei 440 nm. Aus Hofmann et al., 2014 (8.4)

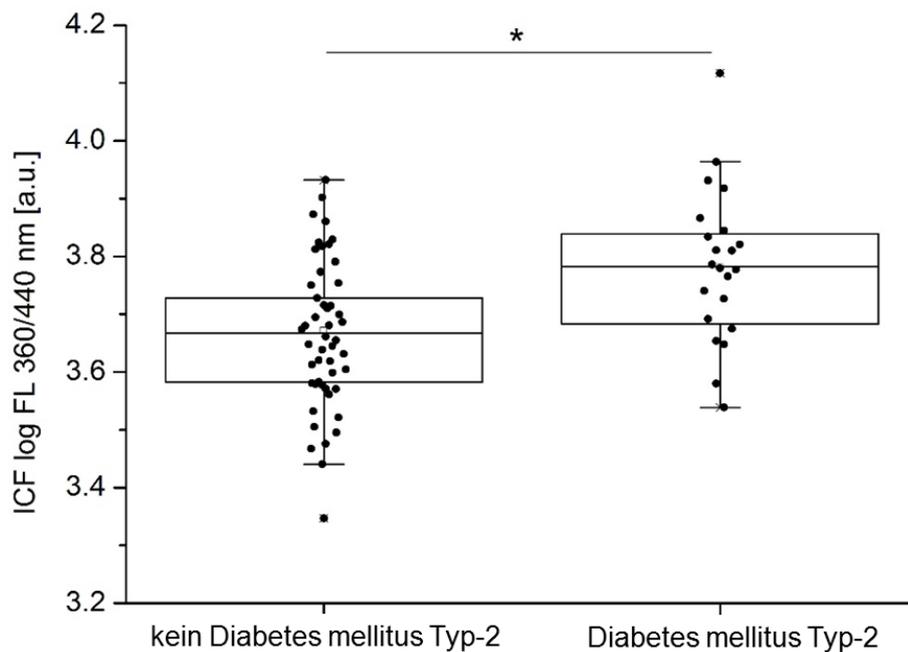


Abbildung 7: Darstellung der intrinsischen AGE-Fluoreszenz in Korrelation zu Diabetes

ICF, unlösliche Kollagenfraktion aus kardialem Gewebe von KHK Patienten bei Nicht-Diabetikern und Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus, * $p < 0,01$. Intrinsische AGE-Fluoreszenz; Anregung bei 360 nm und Emission bei 440 nm. Aus Hofmann et al., 2014 (8.4)

Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert in dem Manuskript:

Hofmann B, Jacobs K, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014). Relationship between cardiac tissue glycation and skin autofluorescence in coronary artery disease patients. *Diabetes Metab.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2014.12.001>.

5.4. Zusammenhang von AGE-Modifikationen der vaskulären und kardialen Matrix mit nicht-invasiven Parametern

5.4.1. Mit der zentralen Pulswellengeschwindigkeit

Die zentrale oder carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit (cfPWV), als Marker der aortalen Gefäßelastizität, stellt heute den „Goldstandard“ der nicht-invasiven Untersuchung der Gefäßsteifigkeit dar⁶⁹. Da die fortgeschrittene Glykierung der Kollagenmatrix zu einer zunehmenden Versteifung der Gefäße beitragen soll, haben wir die cfPWV als nicht-invasiven Marker gewählt, um zu überprüfen, ob die experimentell aus vaskulärem Gewebe isolierten AGE-modifizierten Kollagenfraktionen mit dem Grad der Gefäßversteifung korrelieren. Wir konnten zeigen, dass die stärker modifizierte Kollagenase-verdauliche

Kollagenfraktion (CDCF) sehr gut mit der Zunahme der zentralen Pulswellengeschwindigkeit und damit mit der Zunahme der vaskulären Steifigkeit korreliert (Abb. 8).

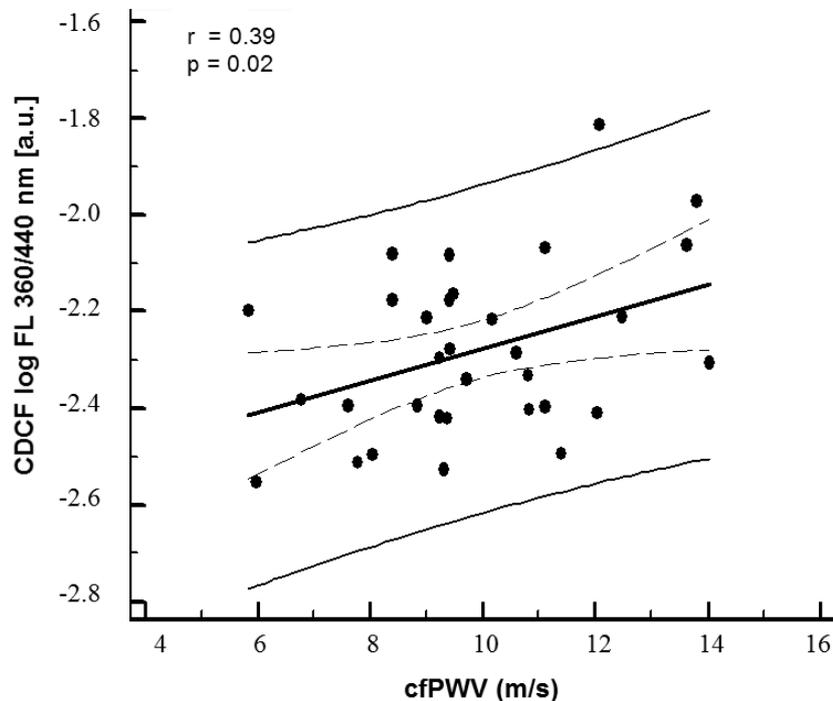


Abbildung 8: Darstellung der intrinsischen AGE-Fluoreszenz in Korrelation zur cfPWV

CDCF, Kollagenase-verdauliche Kollagenfraktion aus vaskulärem Gewebe; cfPWV, carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit. Intrinsische AGE-Fluoreszenz; Anregung bei 360 nm und Emission bei 440 nm. Aus Hofmann et al., 2013 (8.2)

Des Weiteren war es möglich die Relevanz dieses einfach zu messenden, nicht-invasiven Parameters, der eigentlich seit der "*Framingham Heart Study*"⁷⁵ weitestgehend etabliert sein sollte, in Bezug auf klinische Fragestellungen zu untersuchen. In die klinische Studie wurden 155 Patienten einbezogen, 47 davon waren Frauen, das Alter der Patienten lag zwischen 44 und 87 Jahren (MW \pm SD = 67,2 \pm 9,1 Jahre). Es konnte gezeigt werden, dass die carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit (cfPWV) mit dem Grad der koronaren Herzerkrankung sehr gut korreliert (Abb. 9) und bei KHK Patienten ab dem 60. Lebensjahr deutlich ansteigt (Abb. 10). Das Alter der Patienten, das Geschlecht, der systolische Blutdruck und der mittlere arterielle Druck waren unabhängige prädiktive Parameter für den nicht-invasiven Marker cfPWV.

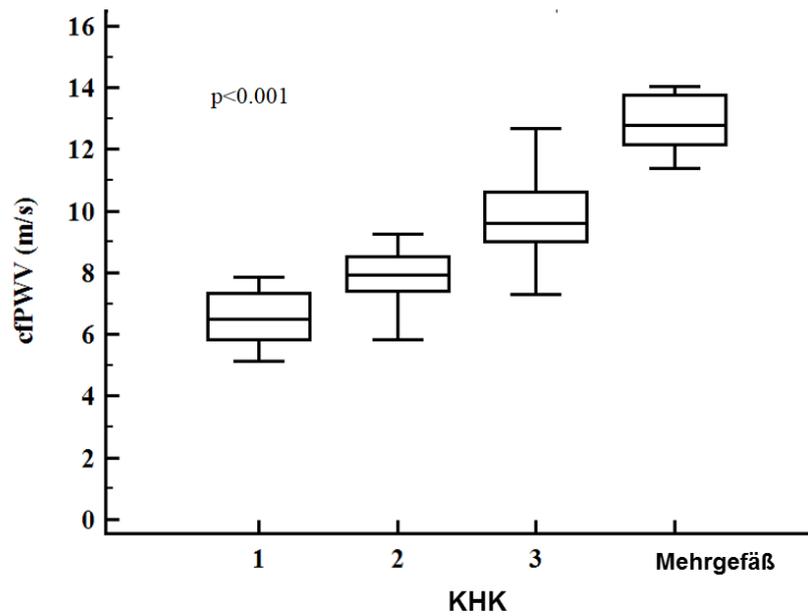


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen cfPWV und dem Grad der KHK

cfPWV, carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit; KHK, koronare Herzkrankheit. Aus Hofmann et al., 2014 (8.3)

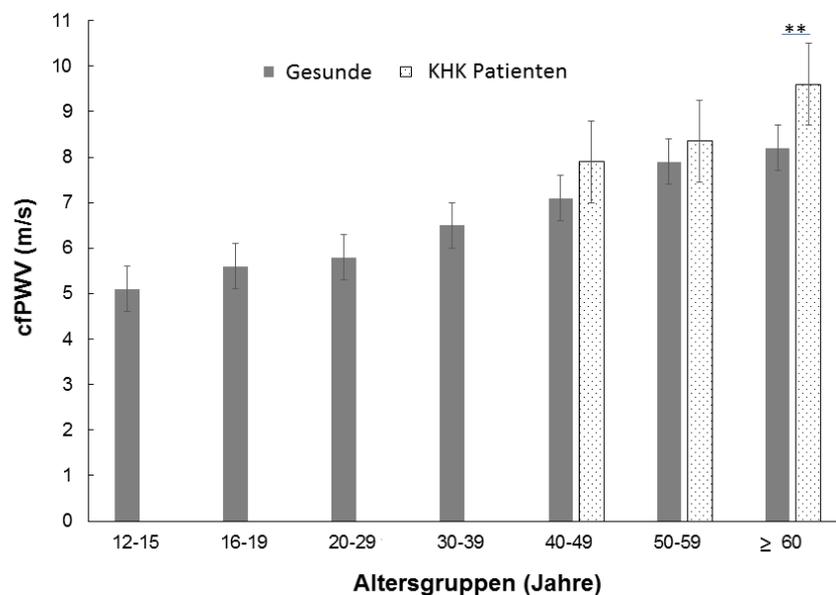


Abbildung 10: Darstellung der cfPWV bei Gesunden und Patienten mit KHK

cfPWV, carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit; KHK, koronare Herzkrankheit. Ab dem 60. Lebensjahr ist bei KHK Patienten im Vergleich zu Gesunden ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen, $**p < 0.001$. Aus Hofmann et al., 2014 (8.3)

Zusammenfassend war es mit Hilfe der Analysen des vaskulären Materials und der klinischen Daten möglich nachzuweisen, dass AGE-modifiziertes Kollagen in der *Vena saphena magna* vorhanden ist und der Grad der Modifizierung mit der nicht-invasiven Messung der carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit (cfPWV) korreliert, obwohl es sich um venöses Graft Material handelt. Die Modifizierungen sind aber offensichtlich beispielhaft für die im Organismus auftretenden Veränderungen durch fortgeschrittene Glykierungsendprodukte. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Veränderungen im Bereich der großen arteriellen Gefäße einen wesentlichen Einfluss auf die Schwere der Ausprägung der koronaren Herzerkrankung haben. Verschiedene Studien haben eine enge Beziehung zwischen der zunehmenden Versteifung großer arterieller Gefäße und mikrovaskulären Schädigungen des Gehirns, der Retina, der Niere und des Herzens gezeigt^{75, 108}. Zu diesen Veränderungen führt ein *Circulus vitiosus*. Der Elastizitätsverlust der Gefäße resultiert in einer höheren Pulswellengeschwindigkeit, so dass die reflektierte Welle bereits in der Systole einfällt und damit den systolischen Blutdruck erhöht. Eine höhere pulsatile Energie wird in die kleinen Arterien und die Mikrozirkulation weitergeleitet, was dort ein pulsatile Barotrauma hervorruft und schließlich in endothelialen und vaskulären Schädigungen, arteriosklerotischer Plaque Bildung und Remodeling mündet¹⁰⁹. Die meisten der altersassoziierten Erkrankungen wie KHK, Morbus Alzheimer und Nierenfunktionsverlust haben mikrovaskuläre Veränderungen als pathophysiologische Ursachen. Erhöhte cfPWV Werte sind ein Risikofaktor für all diese Erkrankungen, was einen engen Zusammenhang zwischen erhöhter Steifigkeit der großen Arterien und mikrovaskulären Veränderungen widerspiegelt. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte Ikonomidis et al.¹¹⁰ zeigen, dass die arterielle Gefäßsteifigkeit, quantifiziert durch die Messung der Pulswellengeschwindigkeit, ein valider Marker der Arteriosklerose ist und zu einer Reduktion der koronaren Flussreserve führt.

Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert in den Manuskripten:

Hofmann B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Navarrete Santos A (2013). Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function? *Exp Gerontol.* 48(1):38-44.

Hofmann B, Riemer M, Erbs C, Plehn A, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014). Carotid to femoral pulse wave velocity reflects the extent of coronary artery disease. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 16:629–633.

5.4.2. Mit der Hautautofluoreszenz

Als eine einfache, nicht-invasive Methode zur Messung von gewebsgebundenen AGEs hat sich die Messung der Hautautofluoreszenz (Skin autofluorescence, sAF) etabliert^{91, 92}. Bisher gab es zahlreiche Studien, die einen guten Zusammenhang zwischen der Hautautofluoreszenz und biochemischen Analysen fortgeschrittener Glykierungsendprodukte in Hautbiopsien zeigen konnten^{91, 99, 100}. Im letzten Jahr wurde eine Studie von den Dekker et al.¹¹¹ publiziert, welche einen engen Zusammenhang zwischen sAF Werten und dem Grad der Arteriosklerose nachweist. Die Autoren empfehlen die Nutzung der Hautautofluoreszenz als Methode zur klinischen Risikoabschätzung im Rahmen der Primärprävention der Arteriosklerose¹¹¹. Allerdings lagen bisher keine Daten zur Korrelation zwischen Hautautofluoreszenz und biochemischen Analysen von AGEs im vaskulären und kardialen System vor. Auch wurde der Zusammenhang von fortgeschrittener Glykierung und zunehmender Gefäßversteifung, quantifiziert durch die Messung der aortalen Pulswellengeschwindigkeit, wissenschaftlich noch nicht untersucht. Wir haben diese Untersuchungen durchgeführt. Unsere Analysen identifizierten einen klaren Zusammenhang zwischen Hautautofluoreszenz und den Modifikationen durch fortgeschrittene Glykierung in vaskulärem (Abb. 11) und kardialem (Abb. 12) Gewebe.

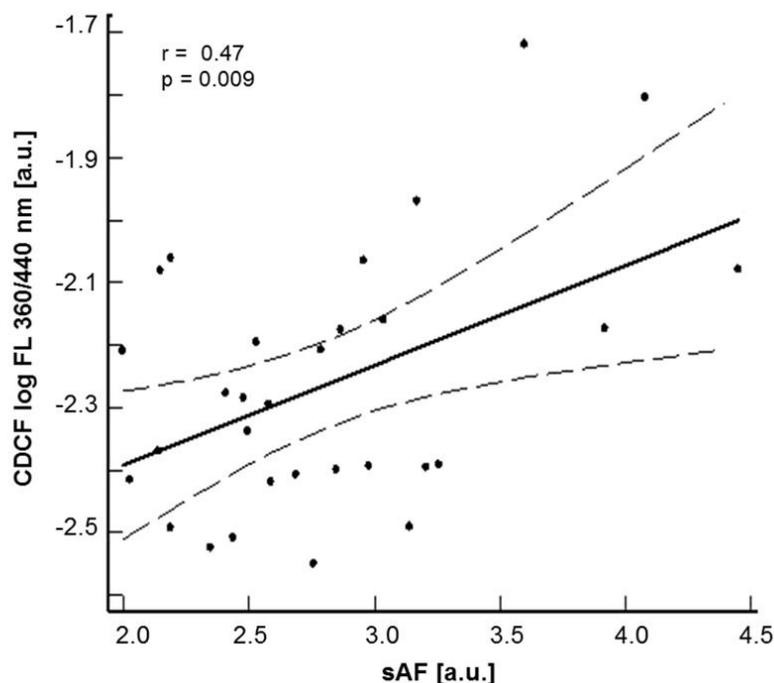


Abbildung 11: Darstellung der intrinsischen AGE-Fluoreszenz und der sAF

CDCF, Kollagenase-verdauliche Kollagenfraktion aus vaskulärem Gewebe; sAF, Hautautofluoreszenz. Intrinsische AGE-Fluoreszenz; Anregung bei 360 nm und Emission bei 440 nm. Aus Hofmann et al., 2013 (8.2)

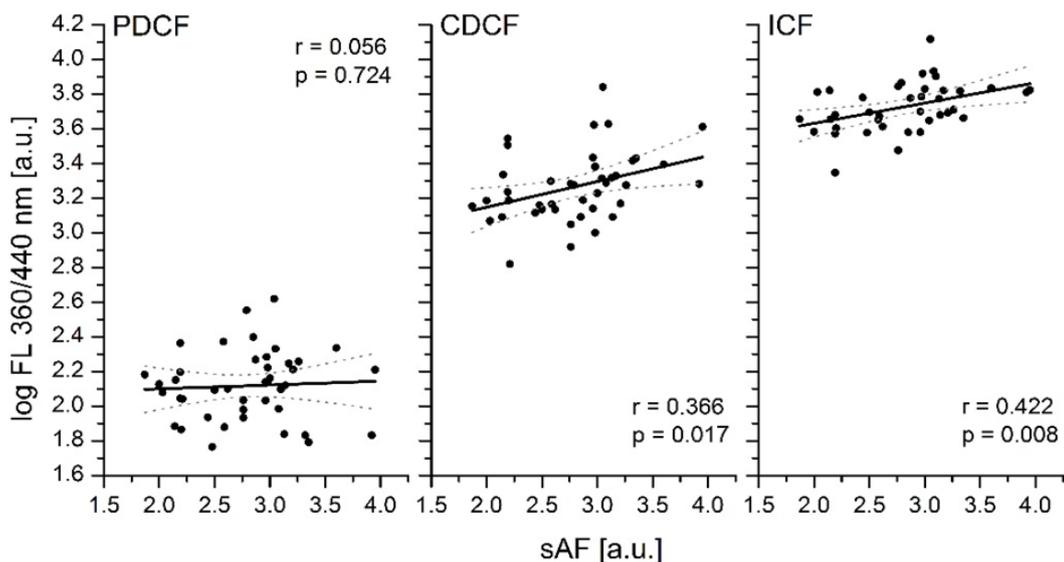


Abbildung 12: AGE-Fluoreszenz kardialer Kollagenfraktionen in Korrelation zur sAF

Die am geringsten modifizierte Pepsin-verdauliche Kollagenfraktion (PDCF) zeigt keine Korrelation zur Hautautofluoreszenz (sAF), während die stärker modifizierte Kollagenase-verdauliche (CDCF) und die am stärksten modifizierte unlösliche Kollagenfraktion (ICF) eine gute Korrelation zur sAF zeigen. Intrinsische AGE-Fluoreszenz; Anregung bei 360 nm und Emission bei 440 nm. Aus Hofmann et al., 2014 (8.4)

Jeweils die am stärksten AGE-modifizierten Kollagenfraktionen zeigten eine gute Korrelation zu den in der sAF Messung erhobenen Werten für kutane AGE Ablagerungen. Zudem konnten wir eine gute Korrelation zwischen der Hautautofluoreszenz und der carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit nachweisen (Abb. 13). Des Weiteren ist es uns gelungen zu zeigen, dass gewebsgebundene fortgeschrittene Glykierungsendprodukte, gemessen als sAF, mit der postoperativen Morbidität von KHK Patienten korrelieren (Tab. 3). Außerdem konnten wir die Korrelation zwischen Hautautofluoreszenz und dem Alter von Probanden und KHK Patienten dokumentieren, wobei die sAF Werte der KHK Patienten im Durchschnitt um 0,5 a.u. höher waren, als die der Probanden (Abb. 14). Diese Daten unterstreichen die klinische Relevanz des einfach zu erhebenden, nicht-invasiven Parameters Hautautofluoreszenz als Spiegel für das Ausmaß von AGE-Modifikationen in Geweben und Organen mit einem hohen Anteil an langlebigen Proteinen, wie Kollagen, die besonders von Quervernetzungen durch fortgeschrittene Glykierungsendprodukte betroffen sind. Dies

betrifft insbesondere das kardiovaskuläre System, was unsere experimentellen Analysen von kardialem und vaskulärem humanen Gewebe bestätigen.

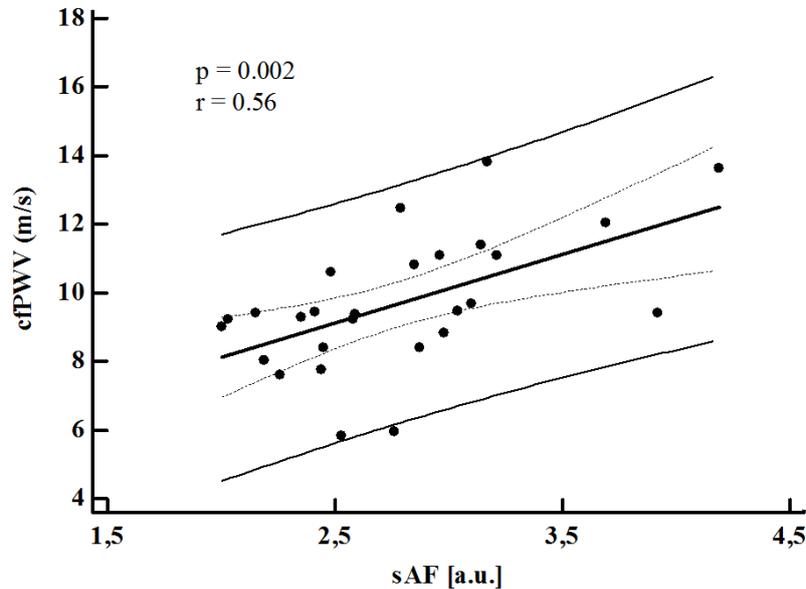


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen cfPWV und sAF bei KHK Patienten

cfPWV, carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit; sAF, Hautautofluoreszenz; KHK, koronare Herzkrankheit. Aus Hofmann et al., 2013 (8.2)

Tabelle 3: Multiple logistische Regression mit Bezug zur postoperativen Morbidität

| Variable | Odds ratio | 95% CI | p |
|--------------------------|------------|---------------|---------------|
| Alter (Jahre) | 1,050 | 0,998 - 1,105 | 0,058 |
| BMI (kg/m ²) | 1,011 | 0,945 - 1,082 | 0,747 |
| Diabetes mellitus | 0,797 | 0,504 - 1,262 | 0,334 |
| GFR (ml/min) | 1,000 | 0,987 - 1,013 | 0,998 |
| LVEF (%) | 0,962 | 0,937 - 0,988 | 0,005 |
| Euro Score additiv | 1,208 | 1,056 - 1,381 | 0,006 |
| Euro Score II | 1,097 | 0,924 - 1,303 | 0,289 |
| STS Mortalitätsrisiko | 0,781 | 0,389 - 1,569 | 0,488 |
| STS Morbiditätsrisiko | 1,074 | 0,931 - 1,239 | 0,328 |
| sAF (a.u.) | 2,876 | 1,599 - 5,171 | 0,0004 |

Nutzung der kombinierten postoperativen Morbidität (nach STS-Score) als abhängige Variable, GFR, Glomeruläre Filtrationsrate nach Cockcroft-Gault-Formel; LVEF, linksventrikuläre Ejektionsfraktion; sAF, Hautautofluoreszenz. (Hofmann, Simm; unveröffentlicht).

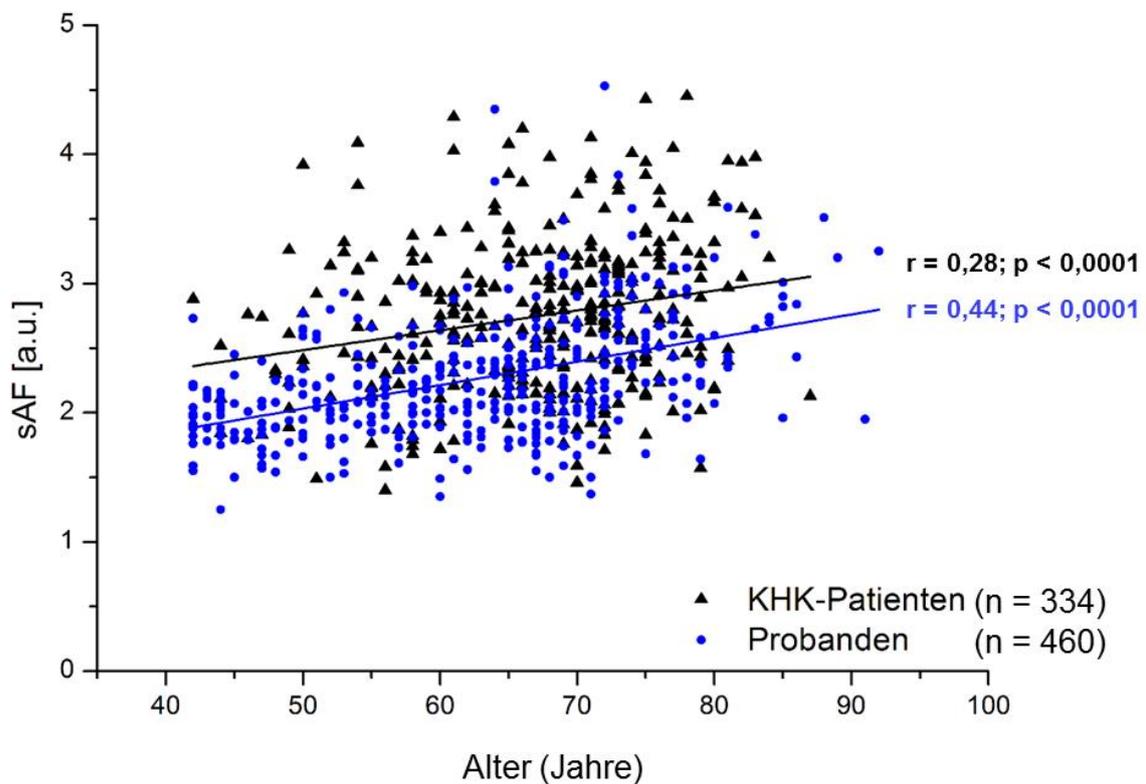


Abbildung 14: SAF von Probanden und KHK Patienten im Bezug zum Lebensalter

sAF, Hautautofluoreszenz; KHK, koronare Herzkrankheit. (Hofmann, Jacobs, Simm; unveröffentlicht)

Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert in den Manuskripten:

Hofmann B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Navarrete Santos A (2013). Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function? *Exp Gerontol.* 48(1):38-44.

Hofmann B, Jacobs K, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014). Relationship between cardiac tissue glycation and skin autofluorescence in coronary artery disease patients. *Diabetes Metab.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2014.12.001>.

5.5. Einfluss des Rezeptors für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte - RAGE - auf die Entstehung von kardialen und valvulären Veränderungen

Zunehmendes Übergewicht und daraus resultierende Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus und Arteriosklerose, stellen schwerwiegende Probleme unserer modernen Gesellschaft dar¹¹²⁻¹¹⁴. Ursächlich für die steigende Anzahl übergewichtiger Personen ist offensichtlich unser westlicher Lebensstil mit einem Mangel an Bewegung, einer sehr fetten sowie protein- und zuckerreichen Ernährung, und dem Genuss von Nikotin und Alkohol^{115, 116}. Fortgeschrittene Glykierungsendprodukte werden über die Nahrung bei dieser Art von Ernährung in verhältnismäßig großen Mengen aufgenommen. Welchen Anteil die aufgenommenen im Vergleich zu den endogen gebildeten AGEs an den AGE-assoziierten pathophysiologischen Prozessen haben, ist noch nicht hinreichend geklärt. Die vermehrte Aufnahme von Fetten im Rahmen einer fettreichen Ernährung führt allerdings auch zu einer erhöhten endogenen AGE-Bildung¹¹⁷. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass sich bei Diabetikern und Patienten mit Nierenerkrankungen eine fettreiche Ernährung zusätzlich negativ auswirkt¹¹⁸⁻¹²⁰. Das RAGE bei der Entstehung der Arteriosklerose eine Rolle spielt wird durch zahlreiche Studiendaten^{121, 122} belegt, u.a. wurde RAGE in arteriosklerotischen Plaques von Diabetikern gefunden^{123, 124} und in einem Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass RAGE Knockout Tiere geringere Schädigungen nach myokardialer Ischämie aufweisen¹²⁵. Die Aortenklappenstenose wurde bisher weitestgehend als eine altersassoziierte degenerative Erkrankung gesehen, die durch den jahrelangen hohen Fluss, turbulente Strömungen und Scherkräfte an den Klappentaschen bedingt ist. Allerdings gibt es zunehmende Hinweise, dass es sich auch hier, ähnlich wie bei der Arteriosklerose, um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Rauchen, Diabetes mellitus und erhöhte Serumlipide, sowie inflammatorische Prozesse, wie sie auch durch RAGE vermittelt werden¹²⁶, bedingen auch an der Aortenklappe einen Umbau der extrazellulären Matrix mit Fibrosierung und Verkalkung. Li et al. demonstrierten in einem Kaninchenmodell, dass eine verminderte RAGE Expression die Progression der Aortenklappenverkalkung abschwächt, indem Entzündungsprozesse und ROS reduziert werden¹²⁷. Matsumoto und Kollegen berichteten, dass regelmäßiges Bewegungstraining die Entstehung einer Aortenklappenstenose bei Mäusen über eine Reihe von Mechanismen, u.a. durch die verminderte Einwanderung von Entzündungszellen und die Reduktion von oxidativem Stress, verhindert¹²⁸. Bezüglich einer fettreichen Ernährung haben verschiedene Forschergruppen bereits gezeigt, dass diese sich bei Diabetikern und Patienten mit

Niereninsuffizienz auf Grund der vermehrten AGE Akkumulation zusätzlich negativ auswirken kann¹¹⁸⁻¹²⁰. Ob im gesunden Organismus eine Hochfetterernährung zur Akkumulation von AGEs führt, dies wiederum Veränderungen im Herz- und Kreislaufsystem induziert, und die Entstehung von Erkrankungen, wie z.B. der Aortenklappenstenose forcieren kann, wurde bisher kaum untersucht. Ziel unserer experimentellen Arbeit war es, die Effekte einer Hochfetterernährung auf das Herz und die Aortenklappe eines gesunden Organismus zu untersuchen. Ob mögliche Wirkungen der AGEs in Abhängigkeit von RAGE, dem Rezeptor für AGEs, ablaufen, sollte anhand der Verwendung einer RAGE Knockout Mauslinie geklärt werden. Die Versuchstiere waren sechs Wochen alte männliche Wildtypmäuse (WT, n=14) und sechs Wochen alte männliche RAGE Knockout Mäuse (RAGE KO, n=14). Die Tiere wurden zufällig in je zwei Gruppen eingeteilt, die jeweils eine Normaldiät (ND) oder eine Hochfett-diät (HFD) erhielten. Im Verlauf wurde die wöchentliche Gewichtszunahme registriert und echokardiographische Untersuchungen der Aortenklappen mit dem CW-Doppler nach 2, 4 und 7 Monaten durchgeführt. Am Ende des Experiments wurden Blutproben zur Untersuchung des Lipidstoffwechsels und die Herzen zur morphologischen, histologischen und immunohistochemischen Untersuchung gewonnen. Nach sieben Monaten Hochfettfütterung konnte eine signifikante Gewichtszunahme und linksventrikuläre Hypertrophie vor allem der Wildtypmäuse beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Daten von Tian et al.¹²⁹, die in einem Rattenmodell unter Hochfetterernährung über einen vergleichbaren Zeitraum eine Verminderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und des Herz Index fanden. Diese Studie und unsere Daten zeigten eine linksventrikuläre myokardiale Hypertrophie als Zeichen des linksventrikulären Remodeling induziert durch die Hochfettfütterung. Ein weiteres Ergebnis ist, dass WT Mäuse nach sieben Monaten Hochfetterernährung deutliche Veränderungen der Aortenklappe im Sinne einer Aortenklappenstenose entwickelten. Hingegen waren die RAGE Knockout Tiere mit derselben Fütterung davor geschützt. Die durchgeführten echokardiographischen Untersuchungen zeigten, dass bei Wildtypmäusen im Verlauf des Experiments die systolische transvalvuläre Geschwindigkeit deutlich zunahm und gegenüber der Vergleichsgruppe mit Normaldiät im Durchschnitt um 1/3 höher war. In den morphologischen Untersuchungen der Herzen und Aortenklappen waren bei WT Tieren unter HFD die linksventrikuläre Fläche, die Aortenklappen-Öffnungsfläche und der Aortenklappen-Flächen-Index deutlich reduziert. Die histologischen und immunohistochemischen Untersuchungen der Aortenklappen Präparate von diesen Tieren zeigten

vermehrte Kalkablagerungen (von Kossa Färbung), eine vermehrte AGE Anreicherung und eine stärkere RAGE Expression an den Klappentaschen. Die RAGE Knockout Tiere entwickelten unter Hochfetterernährung auch eine Adipositas. Allerdings fanden sich keine relevanten echokardiographischen Veränderungen und die Herzen und Aortenklappen der RAGE KO Mäuse wiesen nur geringe morphologische und immunohistochemische Veränderungen auf. Eine Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass RAGE Knockout Mäuse ein besseres HDL/LDL Verhältnis hatten. Bei den WT Mäusen könnte das übermäßige LDL im Plasma oxidiert worden sein. Das so entstandene oxLDL hat eine Reihe pro-arteriosklerotischer Effekte, dies könnte die Entstehung der Aortenklappen-Veränderungen bei diesen Tieren forciert haben. In diesem Zusammenhang berichteten Sun et al.¹³⁰, dass RAGE die oxLDL induzierte Produktion von ROS und die Proliferation von Makrophagen vermittelt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass im gesunden Organismus eine Hochfetterernährung zur Entstehung von Aortenklappen-Veränderungen im Sinne einer Aortenklappenstenose führt. Hierbei scheint die Interaktion von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten mit dem Rezeptor RAGE sowie die Interaktion von RAGE mit anderen Liganden offensichtlich eine Rolle zu spielen.

Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert in dem Manuskript:

Hofmann B, Yakobus Y, Indrasari M, Nass N, Navarrete Santos A, Kraus FB, Silber RE, Simm A (2014) RAGE influences the development of aortic valve stenosis in mice on a high fat diet. *Exp Gerontol.* 59:13-20.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Zielstellung diese Arbeit war es, die Auswirkungen fortgeschrittener Glykierungsendprodukte im kardiovaskulären System herauszuarbeiten. Dazu sollten vaskuläre und kardiale Kollagenmodifikationen und deren Einfluss auf die Zellmigration, die Gefäßversteifung und die kardiale Funktion genauer analysiert und charakterisiert werden. Des Weiteren wurden nicht-invasive Marker der Gefäßfunktion und der fortgeschrittenen Glykierung als Prädiktoren für die kardiovaskuläre Situation und den postoperativen Verlauf evaluiert. Da die Wirkung von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten im kardiovaskulärem System nicht nur über Kollagenmodifikationen erfolgt, sondern auch rezeptorvermittelt sein kann, fokussierte die Arbeit ferner auf den Einfluss des AGE-Rezeptors RAGE.

Experimentelle Studien

Die Arbeit konnte zeigen, dass AGE-modifizierte Proteine die Zellmigration offensichtlich nicht direkt über Rezeptor vermittelte Reaktionen hemmen, vielmehr trägt die modifizierte extrazelluläre Matrix zu Veränderungen des „normalen Mikromilieus“ der Zellen bei. Dies beeinflusst die Adhäsion, Aktinpolymerisation und damit die gerichtete Zellwanderung negativ und führt so zu Veränderungen der Zell- und Gewebefunktionen. Mit zunehmender AGE-Modifikation des Kollagens kommt es zur Reduktion sowohl der Chemotaxis wie auch der Migration von Zellen. Während viele Arbeitsgruppen sich auf die zellvermittelten Effekte der löslichen fortgeschrittenen Glykierungsendprodukte konzentrieren, weisen unsere Daten darauf hin, dass die Veränderungen der extrazellulären Matrix möglicherweise entscheidender sind. In weiteren Experimenten konnte eine gute Korrelation der analysierten vaskulären modifizierten Kollagenfraktionen mit dem Alter der Patienten und mit der Inzidenz von Typ-2 Diabetes dargestellt werden. Des Weiteren ist es gelungen modifizierte Kollagenfraktionen in kardialem Gewebe nachzuweisen, wobei der Grad der Modifikationen durch fortgeschrittene Glykierung wiederum mit dem Alter der KHK Patienten, der Inzidenz von Diabetes mellitus, sowie der Höhe der Blutzuckerspiegel und der HbA_{1c}-Werte in Zusammenhang stand. Eine Multivarianzanalyse bestätigte, dass die am stärksten AGE-modifizierte kardiale Kollagenfraktion einen prädiktiven Wert für den postoperativen Verlauf der Patienten hat und somit auch eine klinische Relevanz existiert. Ebenfalls wurde die rezeptorvermittelte Wirkung fortgeschrittener Glykierungsendprodukte untersucht. Diese Experimente zeigten, dass im gesunden Organismus eine fettreiche Ernährung ein

linksventrikuläres Remodeling induziert und zu Aortenklappen-Veränderungen im Sinne einer Aortenklappenstenose führt. Hierfür könnte die Interaktion von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten mit dem Zelloberflächenrezeptor RAGE entscheidend sein, aber auch die induzierte Hyperlipidämie scheint eine wesentliche Rolle zu spielen.

Translationale Studien

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass vaskuläre Modifikationen durch fortgeschrittene Glykierung mit dem nicht-invasiven Parameter der Gefäßsteifigkeit, der carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit, korrelieren und die Veränderungen im Bereich der großen arteriellen Gefäße einen wesentlichen Einfluss auf die Schwere der Ausprägung der koronaren Herzerkrankung haben. Weiterhin besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem nicht-invasiven Parameter Hautautofluoreszenz und den Modifikationen durch AGEs in vaskulärem und kardialen Gewebe. Jeweils die am stärksten glykierten Kollagenfraktionen korrelieren signifikant mit den Hautautofluoreszenzwerten. Auch konnte eine Verbindung zwischen den beiden nicht-invasiven Parametern sAF und cfPWV nachgewiesen werden. Eine Multivarianzanalyse ergab, dass die sAF prädiktiv für die postoperative Morbidität von KHK Patienten ist (Hofmann, Simm; unveröffentlicht). Die hier präsentierten Daten unterstreichen die klinische Relevanz der evaluierten nicht-invasiven Parameter. Die Messung der Pulswellengeschwindigkeit ist weitestgehend etabliert. Allerdings sollte der nicht-invasive Parameter Hautautofluoreszenz als Spiegel für das Ausmaß von AGE-Modifikationen im kardiovaskulären System auf Grund der vorliegenden Daten und der aktuellen Publikationen^{37, 111} stärker in die Prävention und präoperative Diagnostik eingebunden werden. Offensichtlich sind die Alterationen durch fortgeschrittene Glykierung bis zu einem gewissen Grad noch reversibel, so dass sie einer therapeutischen Intervention zugänglich wären. Mit AGE-Inhibitoren, AGE-Crosslink Breakers^{131, 132} und durch eine Optimierung von Ernährung und Bewegung¹³³ könnte die Konzentration von AGEs gesenkt und eine Verbesserung der kardiovaskulären Funktion erreicht werden¹³⁴⁻¹³⁶. Für Patienten mit erhöhten präoperativen sAF Werten und damit einem prädiktierten höheren postoperativen Morbiditätsrisiko wäre möglicherweise durch entsprechende Therapien oder die Zuführung zu minimalinvasiven Verfahren eine Verbesserung des Outcome erreichbar.

Zusammenfassend dargestellt hat diese Arbeit unterstrichen, dass fortgeschrittene Glykierungsendprodukte eine Vielzahl von Veränderungen im kardiovaskulären System

durch Kollagenmodifikationen und ihre rezeptorvermittelte Wirkung bedingen. Dies ist in Abbildung 15 noch einmal dargestellt.

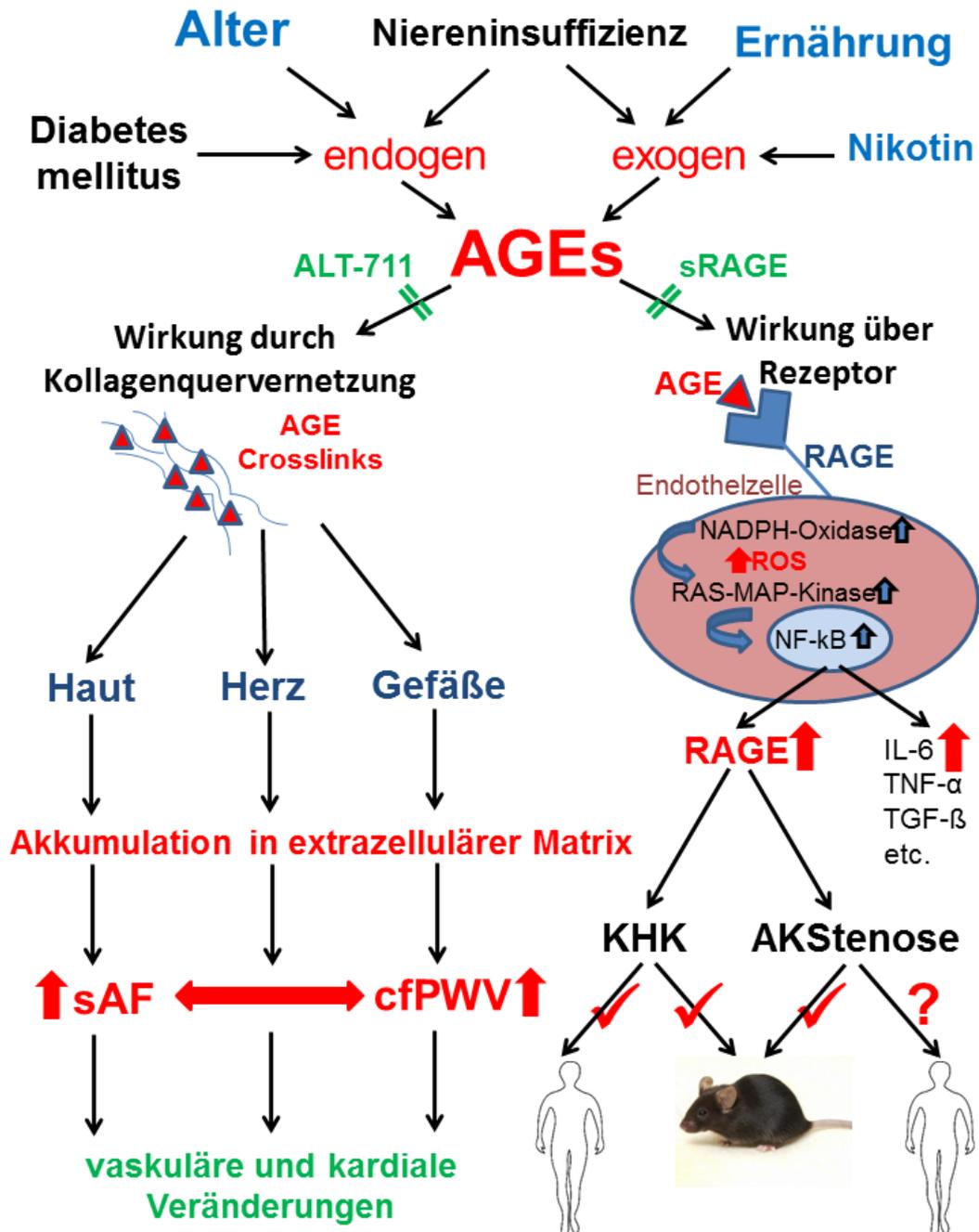


Abbildung 15: Schema der Wirkung von AGEs im kardiovaskulären System

Unter Einbezug der Ergebnisse dieser Habilitationsarbeit, (Hofmann; unveröffentlicht)

7. Literaturverzeichnis

1. Vaupel JW, Kistowski KG [The remarkable rise in life expectancy and how it will affect medicine]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2005;48:586-592
2. Hou L, Huang J, Green CD, Boyd-Kirkup J, Zhang W, Yu X, Gong W, Zhou B, Han JD. Systems biology in aging: Linking the old and the young. *Curr Genomics*. 2012;13:558-565
3. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, Hayflick L, Butler RN, Allison DB, Ludwig DS. A potential decline in life expectancy in the united states in the 21st century. *N Engl J Med*. 2005;352:1138-1145
4. Bundesamt S. Gesundheit - todesursachen in deutschland. *Fachserie 12*. 2013:4
5. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappab. *Diabetes*. 2001;50:2792-2808
6. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*. 1994;269:9889-9897
7. Maillard L. Action des acides amines sur les sucres: Formation des melanoides par voie methodique. *CR Acad Sci Ser*. 1912;154:66-88
8. Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA, Zumbach M, Wahl P, Ziegler R. [non-enzymatic glycation and oxidative stress in chronic illnesses and diabetes mellitus]. *Med Klin (Munich)*. 1999;94:29-38
9. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:1-21
10. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin a1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1976;295:417-420
11. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411-429
12. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia*. 2001;44:129-146
13. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, Scheubel RJ, Borgermann J, Silber RE, Simm A. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol Geriatr*. 2007;40:349-356
14. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*. 1999;344 Pt 1:109-116
15. Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: Molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol*. 2002;1:1
16. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008;196:9-21
17. Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. Protein modification by methylglyoxal: Chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch Biochem Biophys*. 1997;344:29-36
18. Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot P, Kohn RR. Relation between complications of type i diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med*. 1986;314:403-408
19. Schmitt A, Schmitt J, Munch G, Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: Side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal Biochem*. 2005;338:201-215
20. Onorato JM, Thorpe SR, Baynes JW. Immunohistochemical and elisa assays for biomarkers of oxidative stress in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;854:277-290

21. Uribarri J, Cai W, Peppas M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, Vlassara H. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: Two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007;62:427-433
22. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 2004;104:1287-1291
23. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002;251:87-101
24. Henle T. Ages in foods: Do they play a role in uremia? *Kidney Int Suppl.* 2003:S145-147
25. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:6474-6479
26. Lin YK, Liu DC. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry* 2006;99(2):244-251
27. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55:1531-1546
28. Turk Z, Misur I, Turk N, Benko B. Rat tissue collagen modified by advanced glycation: Correlation with duration of diabetes and glycemic control. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37:813-820
29. Simm A, Navarrete-Santos A, Hofmann B, Bushnaq H, Nass N. [Protein glycation as a pathological mechanism in diabetes]. *Z Gerontol Geriatr.* 2012;45:95-99
30. Gazoti Debessa CR, Mesiano Maifrino LB, Rodrigues de Souza R. Age related changes of the collagen network of the human heart. *Mech Ageing Dev.* 2001;122:1049-1058
31. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. *J Pathol.* 2007;211:157-172
32. Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: Is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension.* 2005;46:454-462
33. Tessier FJ. The maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol (Paris).* 2010;58:214-219
34. Simm A. Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. *J Proteomics.* 2013;92:248-59.
35. Badenhorst D, Maseko M, Tsoetsi OJ, Naidoo A, Brooksbank R, Norton GR, Woodiwiss AJ. Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats. *Cardiovasc Res.* 2003;57:632-641
36. Willemsen S, Hartog JW, Hummel YM, van Ruijven MH, van der Horst IC, van Veldhuisen DJ, Voors AA. Tissue advanced glycation end products are associated with diastolic function and aerobic exercise capacity in diabetic heart failure patients. *Eur J Heart Fail.* 2011;13:76-82
37. Raposeiras-Roubin S, Rodino-Janeiro BK, Paradelo-Dobarro B, Grigorian-Shamagian L, Garcia-Acuna JM, Aguiar-Souto P, Jacquet-Hervet M, Reino-Maceiras MV, Alvarez E, Gonzalez-Juanatey JR. Predictive value of advanced glycation end products for the development of post-infarction heart failure: A preliminary report. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:102
38. Campbell DJ, Somaratne JB, Jenkins AJ, Prior DL, Yui M, Kenny JF, Newcomb AE, Schalkwijk CG, Black MJ, Kelly DJ. Impact of type 2 diabetes and the metabolic syndrome on myocardial structure and microvasculature of men with coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;10:80
39. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:F645-659
40. Mohar DS, Barseghian A, Haider N, Domanski M, Narula J. Atherosclerosis in chronic kidney disease: Lessons learned from glycation in diabetes. *Med Clin North Am.* 2012;96:57-65
41. Nishizawa Y, Koyama H, Inaba M. Ages and cardiovascular diseases in patients with end-stage renal diseases. *J Ren Nutr.* 2012;22:128-133

42. Sakata N, Meng J, Jimi S, Takebayashi S. Nonenzymatic glycation and extractability of collagen in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 1995;116:63-75
43. Avery NC, Bailey AJ. The effects of the maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol Biol (Paris)*. 2006;54:387-395
44. Pant R, Marok R, Klein LW. Pathophysiology of coronary vascular remodeling: Relationship with traditional risk factors for coronary artery disease. *Cardiol Rev*. 2014;22:13-16
45. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Idelson GL, Koteliansky VE, Rukosuev VS. Relative distribution of fibronectin and type i, iii, iv, v collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis*. 1987;67:9-16
46. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Muzykantov VR, Idelson GL, Rukosuev VS. Distribution of type-i, type-3, type-4 and type-5 collagen in normal and atherosclerotic human arterial-wall - immunomorphological characteristics. *Collagen Rel Res*. 1985;5:355-368
47. Stirban A, Gawlowski T, Roden M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Mol Metab*. 2014;3:94-108
48. Ueno H, Koyama H, Fukumoto S, Tanaka S, Shoji T, Emoto M, Tahara H, Inaba M, Kakiya R, Tabata T, Miyata T, Nishizawa Y. Advanced glycation end products, carotid atherosclerosis, and circulating endothelial progenitor cells in patients with end-stage renal disease. *Metabolism*. 2011;60:453-459
49. Yoon SJ, Park S, Shim CY, Park CM, Ko YG, Choi D, Park HY, Oh B, Kim H, Jang Y, Chung N. Association of rage gene polymorphisms with coronary artery disease in the korean population. *Coron Artery Dis*. 2007;18:1-8
50. Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, Ohno H, Iida J, Makita K, Hata Y. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type i lung alveolar cells. *Genes Cells*. 2004;9:165-174
51. Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1996;97:238-243
52. Zhou Z, Wang K, Penn MS, Marso SP, Lauer MA, Forudi F, Zhou X, Qu W, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM, Lincoff AM, Topol EJ. Receptor for age (rage) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation*. 2003;107:2238-2243
53. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of nadph oxidase by age links oxidant stress to altered gene expression via rage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:E685-694
54. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (rage)-mediated neurite outgrowth and activation of nf-kappab require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem*. 1999;274:19919-19924
55. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding rage, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83:876-886
56. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Muller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP. Advanced glycation end product-induced activation of nf-kappab is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1997;46:1481-1490
57. Wei Q, Ren X, Jiang Y, Jin H, Liu N, Li J. Advanced glycation end products accelerate rat vascular calcification through rage/oxidative stress. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013;13:13
58. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP. The pattern recognition receptor (rage) is a counterreceptor for leukocyte integrins: A novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med*. 2003;198:1507-1515

59. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J.* 2003;370:1097-1109
60. Sterenczak KA, Willenbrock S, Barann M, Klemke M, Soller JT, Eberle N, Nolte I, Bullerdiek J, Murua Escobar H. Cloning, characterisation, and comparative quantitative expression analyses of receptor for advanced glycation end products (rage) transcript forms. *Gene.* 2009;434:35-42
61. Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, Geroldi D. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1032-1037
62. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM. Rage blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein e-null mice. *Circulation.* 2002;106:2827-2835
63. Simm A, Philipp C, Friedrich I, Scheubel RJ, Hofmann HS, Meibodi KH, Sablotzki A, Silber RE, Borgermann J. Intraoperative srage kinetics : A new age-related outcome predictor of cardiac surgery. *Z Gerontol Geriatr.* 2013; DOI:10.1007/s00391-013-0523-7
64. Cameron JS, Hicks J. Frederick akbar mahomed and his role in the description of hypertension at guy's hospital. *Kidney Int.* 1996;49:1488-1506
65. Riva-Rocci S. Un nuovo sfigmomanometro. *Gaz Med Torino.* 1896;47:981-996
66. Shevchenko YL, Tsitlik JE. 90th anniversary of the development by nikolai s. Korotkoff of the auscultatory method of measuring blood pressure. *Circulation.* 1996;94:116-118
67. Bramwell J, Hill A. Velocity of transmission of the pulse wave and elasticity of arteries. *Lancet.* 1922;1:891-892
68. O'Rourke MF, Pauca A, Jiang XJ. Pulse wave analysis. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;51:507-522
69. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: Methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J.* 2006;27:2588-2605
70. Belz GG. Elastic properties and windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1995;9:73-83
71. Nuernberger J, Kribben A, Philipp T, Erbel R. [Arterial compliance (stiffness) as a marker of subclinical atherosclerosis]. *Herz.* 2007;32:379-386
72. Nurnberger J, Opazo Saez A, Dammer S, Mitchell A, Wenzel RR, Philipp T, Schafers RF. Left ventricular ejection time: A potential determinant of pulse wave velocity in young, healthy males. *J Hypertens.* 2003;21:2125-2132
73. Hlimonenko I, Meigas K, Viigimaa M, Temitski K. Assessment of pulse wave velocity and augmentation index in different arteries in patients with severe coronary heart disease. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference.* 2007;2007:1703-1706
74. Mattace-Raso FUS, van der Cammen TJM, Hofman A, van Popele NM, Bos ML, Schalekamp MADH, Asmar R, Reneman RS, Hoeks APG, Breteler MMB, Witteman JCM. Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: The rotterdam study. *Circulation.* 2006;113:657-663
75. Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ. Arterial stiffness and cardiovascular events: The framingham heart study. *Circulation.* 2010;121:505-511
76. Hickson SS, Butlin M, Broad J, Avolio AP, Wilkinson IB, McEniery CM. Validity and repeatability of the vicorder apparatus: A comparison with the sphygmocor device. *Hypertens Res.* 2009;32:1079-1085

77. Butlin M, Qasem A, Battista F, Bozec E, McEniery CM, Millet-Amaury E, Pucci G, Wilkinson IB, Schillaci G, Boutouyrie P, Avolio AP. Carotid-femoral pulse wave velocity assessment using novel cuff-based techniques: Comparison with tonometric measurement. *J Hypertens*. 2013;31:2237-2243; discussion 2243
78. Magometschnigg D. [Blood pressure and arterial stiffness. A comparison of two devices for measuring augmentationindex and pulse wave velocity]. *Wien Med Wochenschr*. 2005;155:404-410
79. Fischer DC, Schreiver C, Heimhalt M, Noerenberg A, Haffner D. Pediatric reference values of carotid-femoral pulse wave velocity determined with an oscillometric device. *J Hypertens*. 2012;30:2159-2167
80. Kracht D, Shroff R, Baig S, Doyon A, Jacobi C, Zeller R, Querfeld U, Schaefer F, Wuhl E, Schmidt BM, Melk A. Validating a new oscillometric device for aortic pulse wave velocity measurements in children and adolescents. *Am J Hypertens*. 2011;24:1294-1299
81. McGreevy C, Barry M, Bennett K, Williams D. Repeatability of the measurement of aortic pulse wave velocity (apwv) in the clinical assessment of arterial stiffness in community-dwelling older patients using the vicorder device. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013;73:269-273
82. McIntyre NJ, Fluck RJ, McIntyre CW, Fakis A, Taal MW. Determinants of arterial stiffness in chronic kidney disease stage 3. *PLoS One*. 2013;8:e55444
83. Muller J, Oberhoffer R, Barta C, Hulpke-Wette M, Hager A. Oscillometric carotid to femoral pulse wave velocity estimated with the vicorder device. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2013;15:176-179
84. Pucci G, Cheriyan J, Hubsch A, Hickson SS, Gajendragadkar PR, Watson T, O'Sullivan M, Woodcock-Smith J, Schillaci G, Wilkinson IB, McEniery CM. Evaluation of the vicorder, a novel cuff-based device for the noninvasive estimation of central blood pressure. *J Hypertens*. 2013;31:77-85
85. Stone IS, John L, Petersen SE, Barnes NC. Reproducibility of arterial stiffness and wave reflections in chronic obstructive pulmonary disease: The contribution of lung hyperinflation and a comparison of techniques. *Respir Med*. 2013;107:1700-1708
86. Shahin Y, Barakat H, Barnes R, Chetter I. The vicorder device compared with sphygmocor in the assessment of carotid-femoral pulse wave velocity in patients with peripheral arterial disease. *Hypertens Res*. 2013;36:208-212
87. Stirban A, Negrean M, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Gotting C, Kleesiek K, Mueller-Roesel M, Koschinsky T, Uribarri J, Vlassara H, Tschoepe D. Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:2064-2071
88. Lyons TJ, Bailie KE, Dyer DG, Dunn JA, Baynes JW. Decrease in skin collagen glycation with improved glycemic control in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1991;87:1910-1915
89. Lyons TJ, Silvestri G, Dunn JA, Dyer DG, Baynes JW. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes*. 1991;40:1010-1015
90. Monnier VM, Bautista O, Kenny D, Sell DR, Fogarty J, Dahms W, Cleary PA, Lachin J, Genuth S. Skin collagen glycation, glycooxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: Relevance of glycated collagen products versus hba1c as markers of diabetic complications. Dcct skin collagen ancillary study group. Diabetes control and complications trial. *Diabetes*. 1999;48:870-880
91. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW, Gans RO, Smit AJ. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia*. 2004;47:1324-1330
92. Meerwaldt R, Lutgers HL, Links TP, Graaff R, Baynes JW, Gans RO, Smit AJ. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:107-112

93. Lutgers HL, Graaff R, Links TP, Ubink-Veltmaat LJ, Bilo HJ, Gans RO, Smit AJ. Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:2654-2659
94. Na R, Stender IM, Ma L, Wulf HC. Autofluorescence spectrum of skin: Component bands and body site variations. *Skin Res Technol*. 2000;6:112-117
95. Sell DR, Nemet I, Monnier VM. Partial characterization of the molecular nature of collagen-linked fluorescence: Role of diabetes and end-stage renal disease. *Arch Biochem Biophys*. 2010;493:192-206
96. Smit AJ, Gerrits EG. Skin autofluorescence as a measure of advanced glycation endproduct deposition: A novel risk marker in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19:527-533
97. Hofmann B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Santos AN. Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: A mirror of vascular function? *Exp Gerontol*. 2013;48:38-44
98. Meerwaldt R, Links T, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Hartog J, Gans R, Smit A. Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:290-298
99. den Hollander NC, Mulder DJ, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Smit GP, Smit AJ. Advanced glycation end products and the absence of premature atherosclerosis in glycogen storage disease ia. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30:916-923
100. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, Thorpe SR, Baynes JW, Navis G, Gans RO, Smit AJ. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:3687-3693
101. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther*. 2010;12:399-403
102. Voermans C, Anthony EC, Mul E, van der Schoot E, Hordijk P. Sdf-1-induced actin polymerization and migration in human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2001;29:1456-1464
103. Schnider SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glycosylation of human skin collagen. *J Clin Invest*. 1981;67:1630-1635
104. Lin YK, Kuan CY. Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. *Food chemistry*, 119, 1271-1277. *Food Chemistry*. 2010;28:1271-1277
105. Canham PB, Finlay HM, Boughner DR. Contrasting structure of the saphenous vein and internal mammary artery used as coronary bypass vessels. *Cardiovasc Res*. 1997;34:557-567
106. Wahab PJ, Rijnsburger AW, Oolbekkink M, Heine RJ. Venous versus arterIALIZED venous blood for assessment of blood glucose levels during glucose clamping: Comparison in healthy men. *Horm Metab Res*. 1992;24:576-579
107. Kitamura S. Physiological and metabolic effects of grafts in coronary artery bypass surgery. *Circ J*. 2011;75:766-772
108. Laurent S, Alivon M, Beaussier H, Boutouyrie P. Aortic stiffness as a tissue biomarker for predicting future cardiovascular events in asymptomatic hypertensive subjects. *Ann Med*. 2012;44 Suppl 1:S93-97
109. Mitchell GF. Arterial stiffness and wave reflection: Biomarkers of cardiovascular risk. *Artery Res*. 2009;3:56-64
110. Ikonomidis I, Kadoglou NN, Tritakis V, Paraskevaidis I, Dimas K, Trivilou P, Papadakis I, Tzortzis S, Triantafyllidi H, Parissis J, Anastasiou-Nana M, Lekakis J. Association of I_p-pla₂ with digital reactive hyperemia, coronary flow reserve, carotid atherosclerosis and arterial stiffness in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2014;234:34-41
111. den Dekker MA, Zwiers M, van den Heuvel ER, de Vos LC, Smit AJ, Zeebregts CJ, Oudkerk M, Vliegthart R, Lefrandt JD, Mulder DJ. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for

- age accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One*. 2013;8:e83084
112. Hare MJ, Magliano DJ, Zimmet PZ, Soderberg S, Joonas N, Pauvaday V, Larhubarbe J, Tuomilehto J, Kowlessur S, Alberti KG, Shaw JE. Glucose-independent ethnic differences in hba1c in people without known diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36:1534-1540
 113. Nyamdorj R, Qiao Q, Soderberg S, Pitkaniemi JM, Zimmet PZ, Shaw JE, Alberti KG, Pauvaday VK, Chitson P, Kowlessur S, Tuomilehto J. Bmi compared with central obesity indicators as a predictor of diabetes incidence in mauritius. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17:342-348
 114. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047-1053
 115. Li D, Siriamornpun S, Wahlqvist ML, Mann NJ, Sinclair AJ. Lean meat and heart health. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2005;14:113-119
 116. Mann N. Dietary lean red meat and human evolution. *Eur J Nutr*. 2000;39:71-79
 117. Li SY, Liu Y, Sigmon VK, McCort A, Ren J. High-fat diet enhances visceral advanced glycation end products, nuclear o-glc-nac modification, p38 mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis. *Diabetes Obes Metab*. 2005;7:448-454
 118. Yndestad A, Landro L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE, Espevik T, Froland SS, Husberg C, Christensen G, Dickstein K, Kjekshus J, Oie E, Gullestad L, Aukrust P. Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J*. 2009;30:1229-1236
 119. Cai W, Uribarri J, Zhu L, Chen X, Swamy S, Zhao Z, Grosjean F, Simonaro C, Kuchel GA, Schnaider-Beeri M, Woodward M, Striker GE, Vlassara H. Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:4940-4945
 120. Vlassara H, Striker GE. Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013;42:697-719
 121. Lee D, Lee KH, Park H, Kim SH, Jin T, Cho S, Chung JH, Lim S, Park S. The effect of soluble rage on inhibition of angiotensin ii-mediated atherosclerosis in apolipoprotein e deficient mice. *PLoS One*. 2013;8:e69669
 122. Tikellis C, Pickering RJ, Tsorotes D, Huet O, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K, Thomas MC. Dicarbonyl stress in the absence of hyperglycemia increases endothelial inflammation and atherogenesis similar to that observed in diabetes. *Diabetes*. 2014;63:3915-3925
 123. Cipollone F, Iezzi A, Fazia M, Zucchelli M, Pini B, Cuccurullo C, De Cesare D, De Blasis G, Muraro R, Bei R, Chiarelli F, Schmidt AM, Cuccurullo F, Mezzetti A. The receptor rage as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: Role of glycemic control. *Circulation*. 2003;108:1070-1077
 124. Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, Fowler DR, Weber DK, Varghese PJ, Farb A, Virmani R. Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: A postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1266-1271
 125. Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, Song F, Bakr S, Szabolcs M, D'Agati V, Liu R, Homma S, Schmidt AM, Yan SF, Ramasamy R. Rage modulates myocardial injury consequent to lad infarction via impact on jnk and stat signaling in a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H1823-1832
 126. Braach N, Frommhold D, Buschmann K, Pflaum J, Koch L, Hudalla H, Staudacher K, Wang H, Isermann B, Nawroth P, Poeschl J. Rage controls activation and anti-inflammatory signalling of protein c. *PLoS One*. 2014;9:e89422
 127. Li F, Cai Z, Chen F, Shi X, Zhang Q, Chen S, Shi J, Wang DW, Dong N. Pioglitazone attenuates progression of aortic valve calcification via down-regulating receptor for advanced glycation end products. *Basic Res Cardiol*. 2012;107:306

128. Matsumoto Y, Adams V, Jacob S, Mangner N, Schuler G, Linke A. Regular exercise training prevents aortic valve disease in low-density lipoprotein-receptor-deficient mice. *Circulation*. 2010;121:759-767
129. Tian YQ, Li SS, Su XD, Zhang GZ, Zhao JJ, Li GW, Wang L. Effects of pioglitazone on high-fat-diet-induced ventricular remodeling and dysfunction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2012;17:223-228
130. Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kojima Y, Honjo T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ishibashi S, Hirata K, Hayashi Y. RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 2009;82:371-381
131. Kranstuber AL, Del Rio C, Biesiadecki BJ, Hamlin RL, Ottobre J, Gyorke S, Lacombe VA. Advanced glycation end product cross-link breaker attenuates diabetes-induced cardiac dysfunction by improving sarcoplasmic reticulum calcium handling. *Front Physiol*. 2012;3:292
132. Lee JY, Oh JG, Kim JS, Lee KW. Effects of chebulic acid on advanced glycation endproducts-induced collagen cross-links. *Biol Pharm Bull*. 2014;37:1162-1167
133. Steppan J, Tran H, Benjo AM, Pellakuru L, Barodka V, Ryoo S, Nyhan SM, Lussman C, Gupta G, White AR, Daher JP, Shoukas AA, Levine BD, Berkowitz DE. Alagebrium in combination with exercise ameliorates age-associated ventricular and vascular stiffness. *Exp Gerontol*. 2012;47:565-572
134. Fujimoto N, Hastings JL, Carrick-Ranson G, Shafer KM, Shibata S, Bhella PS, Abdullah SM, Barkley KW, Adams-Huet B, Boyd KN, Livingston SA, Palmer D, Levine BD. Cardiovascular effects of 1 year of alagebrium and endurance exercise training in healthy older individuals. *Circ Heart Fail*. 2013;6:1155-1164
135. Oudegeest-Sander MH, Olde Rikkert MG, Smits P, Thijssen DH, van Dijk AP, Levine BD, Hopman MT. The effect of an advanced glycation end-product crosslink breaker and exercise training on vascular function in older individuals: A randomized factorial design trial. *Exp Gerontol*. 2013;48:1509-1517
136. Wright KJ, Thomas MM, Betik AC, Belke D, Hepple RT. Exercise training initiated in late middle age attenuates cardiac fibrosis and advanced glycation end-product accumulation in senescent rats. *Exp Gerontol*. 2014;50:9-18

8. Eigene veröffentlichte Originalarbeiten zur Habilitationsschrift ^a

- 8.1. *Glycation of extracellular matrix proteins impairs migration of immune cells.*
Haucke E, Navarrete-Santos A, Simm A, Silber RE, Hofmann B (2014). *Wound Repair Regen.* 22(2):239-245.
- 8.2. *Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function?*
Hofmann B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Navarrete Santos A (2013). *Exp Gerontol.* 48(1):38-44.
- 8.3. *Carotid to femoral pulse wave velocity reflects the extent of coronary artery disease.*
Hofmann B, Riemer M, Erbs C, Plehn A, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014). *J Clin Hypertens (Greenwich).* 16:629–633.
- 8.4. *Relationship between cardiac tissue glycation and skin autofluorescence in coronary artery disease patients.*
Hofmann B, Jacobs K, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014). *Diabetes Metab.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2014.12.001>.
- 8.5. *RAGE influences the development of aortic valve stenosis in mice on a high fat diet.*
Hofmann B, Yakobus Y, Indrasari M, Nass N, Navarrete Santos A, Kraus FB, Silber RE, Simm A (2014). *Exp Gerontol.* 59:13-20.

^a Aus urheberrechtlichen Gründen sind die Arbeiten in der veröffentlichten Version der Habilitationsschrift nicht enthalten. Die Manuskripte werden durch die Herausgeber online publiziert. Sie sind unter den im Anhang angegebenen DOI-Links erreichbar.

9. Thesen

1. Unsere mittlere Lebenserwartung hat sich in den letzten 160 Jahren nahezu verdoppelt und es wird erwartet, dass sie bis zum Jahr 2050 auf das Alter von über 90 Jahren steigt. Allerdings ist Altern mit einem Nachlassen von physiologischen und biochemischen Funktionen von Geweben und Organen verbunden, was zum vermehrten Auftreten von degenerativen Erkrankungen führt.
2. Die kardiovaskulären Erkrankungen zeigen eine stetig steigende Inzidenz und stellen die häufigste Todesursache bei Frauen und Männern in Deutschland dar. Die Entstehung von kardiovaskulären Veränderungen ist ein multifaktorieller Vorgang, der durch die steigende Lebenserwartung und unseren westlichen Lebensstil mit einer Zunahme von sogenannten Zivilisationskrankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2 und essentieller arterieller Hypertonie entscheidend mitbeeinflusst wird.
3. Die Akkumulation von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten, den sogenannten *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs), wird für die Veränderungen im kardiovaskulären System mitverantwortlich gemacht. Neben der Wirkung von AGEs über die Quervernetzung von Proteinen, das sogenannte *Crosslinking*, können diese auch rezeptorvermittelt über den Zelloberflächenrezeptor RAGE Einfluss nehmen.
4. AGE-modifizierte Proteine hemmen die Zellmigration offensichtlich nicht direkt über Rezeptor vermittelte Reaktionen, vielmehr trägt die modifizierte extrazelluläre Matrix zu Veränderungen des „normalen Mikromilieus“ der Zellen bei. Dies beeinflusst die Adhäsion, Aktinpolymerisation und damit die gerichtete Zellwanderung negativ und führt so zu Veränderungen der Zell- und Gewebefunktionen. Mit zunehmender AGE-Modifikation des Kollagens kommt es zur Reduktion sowohl der Chemotaxis wie auch der Migration von Zellen.
5. AGE-modifiziertes Kollagen kann in vaskulärem und kardialem Gewebe nachgewiesen werden. Der Grad der Modifizierung durch fortgeschrittene Glykierung steht in engem Zusammenhang mit dem Alter, der Inzidenz von Diabetes mellitus und dem postoperativen Verlauf der untersuchten Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

6. Die nicht-invasiven Parameter carotideo-femorale Pulswellengeschwindigkeit (cfPWV) und Hautautofluoreszenz (sAF) spiegeln die vaskulären und kardialen AGE-assoziierten Gewebsmodifikationen wieder.
7. Die cfPWV korreliert mit dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung und steigt bei KHK Patienten ab dem 60. Lebensjahr deutlich an. Das Alter der Patienten, das Geschlecht, der systolische Blutdruck und der mittlere arterielle Druck sind unabhängige prädiktive Parameter für den nicht-invasiven Marker cfPWV.
8. Die gemessenen sAF Werte von KHK Patienten liegen im Durchschnitt um eine Maßeinheit höher als die von Probanden und korrelieren mit dem Alter, der cfPWV und den stark modifizierten Kollagenfraktionen aus humanem vaskulären und kardialen Gewebe.
9. Die Hautautofluoreszenz ist ein prädiktiver Parameter für die postoperative Morbidität der untersuchten KHK Patienten.
10. Im gesunden Organismus induziert eine fettreiche Ernährung ein linksventrikuläres *Remodeling* und führt zu Aortenklappen-Veränderungen im Sinne einer Aortenklappenstenose. Hierfür könnte die Interaktion von fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten mit dem Zelloberflächenrezeptor RAGE entscheidend sein. Allerdings scheint auch die durch die Ernährung induzierte Hyperlipidämie, möglicherweise über oxidiertes Low Density Lipoprotein (LDL), einen Einfluss zu haben.
11. Bei kardiovaskulären Erkrankungen führen fortgeschrittene Glykierungsendprodukte sowohl über die Quervernetzung der Kollagenmatrix (*Crosslinking*) wie auch über ihren Rezeptor RAGE zu Alterationen, die von klinischer Relevanz sind.
12. Die Veränderungen durch fortgeschrittene Glykierung sind mit nicht-invasiven Parametern erfassbar, bis zu einem gewissen Grad möglicherweise noch reversibel und somit therapeutisch beeinflussbar.

Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Halle sowie allen Mitarbeitern unseres Forschungslabors, die mich bei der Anfertigung dieser Habilitationsschrift unterstützten.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Klinikdirektor Herrn Professor Rolf-Edgar Silber bedanken, der die nötigen finanziellen Räume zur Durchführung dieser Arbeiten schaffte und für alle meine Ideen ein offenes Ohr hatte.

Mein herzliches Dankeschön gilt dem Forschungsleiter der Klinik Professor Andreas Simm, der seine wissenschaftliche Begeisterung zu diesem Thema auf mich übertrug und mir immer mit neuen Ideen und guten Ratschlägen zur Seite stand.

Für die Arbeiten zur direkten Umsetzung der einzelnen Schwerpunkte möchte ich mich vor allem bei „meiner Roux-Arbeitsgruppe“ mit Kathleen Jacobs, Elisa Haucke und insbesondere Alexander Navarrete Santos für die große Begeisterung, die hervorragende Kompetenz und das außergewöhnliche Engagement bedanken.

Außerdem möchte ich den Doktoranden Marcus Riemer, Christian Erbs und Yuliana Yakobus für die geleistete Forschungsarbeit danken. Mein Dank gilt auch Norbert Nass, Samiya Al-Robaiy und Babett Bartling sowie allen weiteren und ehemaligen Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie.

Andreas Wienke vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik möchte ich besonders für die anregenden Diskussionen und Hilfestellungen danken.

Ich möchte mich außerdem bei Markus Stiller und Thomas Neitzel sowie Beatrice Ludwig-Kraus, Frank Bernhard Kraus, Christoph Raspè und Asen Petrov für ihre besondere Unterstützung bedanken.

Meinen chirurgischen Kollegen Manfred Herrmann, Katharina Krohe, Nagi El Shouki, Hasan Bushnaq, Dietrich Metz und Gerold Rodenbäck danke ich für ihre bereitwillige Unterstützung im klinischen Bereich.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten danke ich der Medizinischen Fakultät und dem Wilhelm-Roux-Programm.

Last but not least gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie und Freunden, die mich mit ihrem immerwährenden, liebevollen Verständnis durch die letzten Jahre begleitet haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Habilitationsschrift selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ein Habilitationsverfahren wurde an keiner anderen Universität eröffnet oder beantragt. Frühere Habilitationsversuche sind nicht unternommen worden.

Halle (Saale), den 28.07.2014

gez. Dr.med. Britt Hofmann

Lebenslauf

| | |
|---------------------|---|
| Name, Vorname | Dr. med. Hofmann, Britt |
| Geburtsdatum | 24.07.1968 |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Dienststellung | Oberärztin Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie |

Schulbildung und Studium

| | |
|-------------|---|
| 1975 - 1985 | Oberschule Halle-Neustadt |
| 1985 - 1987 | Erweiterte Oberschule „Thomas Müntzer“ Halle; Abschluss: Abitur |
| 1987 - 1988 | Krankenpflegepraktikum in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 1988 - 1994 | Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 01.04.1996 | Approbation als Ärztin |

Berufliche Tätigkeit

| | |
|-----------------------|--|
| 01.10.1994-31.03.1996 | Ärztin im Praktikum; Abteilung für Allgemein- und Gefäß- chirurgie, St. Elisabeth-Krankenhaus Halle |
| 19.08.1996-23.10.1997 | Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg |
| 15.11.1997-15.05.2001 | Assistenzärztin am Herz- und Kreislaufzentrum der Universität Dresden |
| 15.05.2001 | Facharztanerkennung für Herzchirurgie |
| 16.05.2001-31.12.2001 | Fachärztin für Herzchirurgie am Herzzentrum der Universitätsklinik in Dresden |
| 15.01.2002-31.12.2002 | Senior Transplant Fellow, Cardiothoracic transplant unit, Freeman Hospital, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK |
| 05.01.2003-30.04.2004 | Research Fellow, Hospital for Sick Children, Research Lab. Prof. Dr. L.J. West, Toronto, Kanada |

15.05.2004-30.04.2005 Fachärztin für Herzchirurgie am Westdeutschen
Herzzentrum, Universitätsklinik Essen

01.05.2005-31.03.2007 Funktionsoberärztin in der Klinik für Herz- und Thorax-
chirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit 01.04.2007 Oberärztin in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie,
Universitätsklinikum Halle (Saale)

05.03.2013 Erlangung der Zusatzbezeichnung chirurgische Intensiv-
medizin

Dissertation 1998, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Thema: “Epidemiologie der osteoporotischen proximalen
Femurfraktur in der ehemaligen DDR – Auswirkungen einer
langjährigen Trinkwasserfluoridexposition auf die
Frakturhäufigkeit”

Master of Science 2006, University of Toronto, Kanada

Thema: “Characterization of regulatory T cells in neonatally induced
cardiac allograft acceptance”

**Die folgenden Manuskripte werden durch die Herausgeber online publiziert.
Sie sind unter den angegebenen DOI-Links erreichbar.**

8.1. Glycation of extracellular matrix proteins impairs migration of immune cells.

Haucke E, Navarrete-Santos A, Simm A, Silber RE, Hofmann B (2014).

Wound Repair Regen. 22(2):239-245.

DOI: 10.1111/wrr.12144

<http://dx.doi.org/10.1111/wrr.12144>

Abstract

The immune response during aging and diabetes is disturbed and this may be due to the altered migration of immune cells in an aged tissue. Our study should prove the hypothesis that age and diabetes-related advanced glycation end products (AGEs) have an impact on the migration and adhesion of human T-cells.

To achieve our purpose, we used in vitro AGE-modified proteins (soluble albumin and fibronectin [FN]), as well as human collagen obtained from bypass graft. A Boyden chamber was used to study cell migration. Migrated Jurkat T-cells were analyzed by flow cytometry and cell adhesion by crystal violet staining. Actin polymerization was determined by phalloidin-Alexa-fluor 488-labeled antibody and fluorescence microscopy.

We found that significantly fewer cells (50%, $p = 0.003$) migrated through methylglyoxal modified FN. The attachment to FN in the presence of AGE-bovine serum albumin (BSA) was also reduced ($p < 0.05$). In ex vivo experiments, isolated collagen from human vein graft material negatively affected the migration of the cells depending on the grade of AGE modification of the collagen. Collagen with a low AGE level reduced the cell migration by 30%, and collagen with a high AGE level by 60%.

Interaction of the cells with an AGE-modified matrix, but not with soluble AGEs like BSA-AGE per se, was responsible for a disturbed migration. The reduced migration was accompanied by an impaired actin polymerization. We conclude that AGEs-modified matrix protein inhibits cell migration and adhesion of Jurkat T-cells.

8.2. Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function?

Hofmann B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Navarrete Santos A (2013).

Exp Gerontol. 48(1):38-44.

DOI: 10.1016/j.exger.2012.04.011

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2012.04.011>

Abstract

Advanced glycation end products (AGEs) seem to be involved in aging as well as in the development of cardiovascular diseases. During aging, AGEs accumulate in extracellular matrix proteins like collagen and contribute to vessel stiffness. Whether non-invasive measurement of AGE accumulation in the skin may reflect vessel function and vessel protein modification is unknown. Herein we set out to analyze the AGE-modifications in the collagens extracted from residual bypass graft material, the skin autofluorescence reflecting the accumulation of AGEs in the body as well as the pulse wave velocity reflecting vessel stiffness.

Collagen types I and III (pepsin digestible collagen fraction) were isolated from the veins of 52 patients by proteolysis. The residual collagen fraction was further extracted by collagenase digestion. Collagen was quantified by hydroxyproline assay and AGEs by the AGE intrinsic fluorescence. Skin autofluorescence was measured with an autofluorescence reader; pulse wave velocity with the VICORDER.

The collagen AGE autofluorescence in patient vein graft material increased with patient age. The pepsin digestible collagen fraction was significantly less modified in comparison to the collagenase digestible fraction. Decreasing amounts of extracted collagenase digestible collagen correspond with increasing AGE autofluorescence. Skin autofluorescence and vessel stiffness were significantly linked to the AGE autofluorescence of the collagenase digestible collagen fraction from graft material.

In conclusion we have found that skin autofluorescence and pulse wave velocity as non-invasive parameters significantly correlate with the AGE contained in graft material and therefore are strong predictors of vessel AGE modifications in patients with coronary heart disease. Whether the analysis of the skin autofluorescence leads to an improvement of the risk stratification in patients suffering from cardiovascular disease has to be further tested.

8.3. Carotid to femoral pulse wave velocity reflects the extent of coronary artery disease.

Hofmann B, Riemer M, Erbs C, Plehn A, Navarrete Santos A, Wienke A,

Silber RE, Simm A (2014).

J Clin Hypertens (Greenwich).16:629–633.

DOI: 10.1111/jch.12382

<http://dx.doi.org/10.1111/jch.12382>

Abstract

Arterial stiffness is a well-established risk factor for cardiovascular disease and mortality. Carotid to femoral pulse wave velocity (cfPWV) as a measure of arterial stiffness was obtained in 155 (47 women; 67.2 ± 9.1 years, range 44-87 years) patients with detected coronary artery disease (CAD) scheduled for coronary artery bypass surgery.

The authors set out to analyze how cfPWV in CAD patients correlates with reference values for healthy, normotensive volunteers and whether cfPWV values reflect the extent of CAD. cfPWV was measured with an oscillometric device.

Mean cfPWV value of CAD patients was 9.3 ± 1.9 m/s vs 7.7 ± 1.1 m/s in healthy volunteers ($P < .0001$). In a multiple regression model, age ($P < .0001$), sex ($P = .006$), systolic arterial pressure ($P = .04$), mean arterial pressure ($P = .04$), and severity of CAD ($P < .001$) emerged as independent predictive markers for cfPWV in CAD patients.

This study established reference values for cfPWV in CAD patients measured with an oscillometric device and confirmed the strong association between arterial stiffness and severity of CAD.

8.4. Relationship between cardiac tissue glycation and skin autofluorescence in coronary artery disease patients.

Hofmann B, Jacobs K, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2014).

Diabetes Metab. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2014.12.001>.

DOI: 10.1016/j.diabet.2014.12.001

<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2014.12.001>

Abstract

During ageing, advanced glycation end-products (AGEs) accumulate in extracellular matrix proteins like collagen and contribute to a decline in organ function. As skin autofluorescence (sAF) can assess subcutaneous accumulation of fluorescent AGEs, this study aimed to investigate the relationship between AGE-modified cardiac tissue collagen and AGE-related sAF in coronary artery bypass graft (CABG) surgery patients.

Between January 2011 and January 2012, data from 72 consecutive male patients undergoing isolated CABG were prospectively recorded. Collagen fractions were isolated from the right atrial appendages of these patients by proteolysis and collagenase digestion. Collagen was quantified by hydroxyproline assay, and AGEs by AGE-related intrinsic fluorescence; sAF was measured using an autofluorescence reader.

Biochemical analysis showed that the insoluble cardiac collagen fraction contained the highest amounts of accumulated AGEs; the AGE-related intrinsic fluorescence of this fraction increased with age ($P = 0.0001$), blood glucose ($P = 0.002$), HbA1c ($P = 0.01$) and sAF ($P = 0.008$).

This study demonstrated for the first time a relationship between cardiac tissue glycation and AGE-related sAF. In addition, cardiac tissue glycation was associated with age, blood glucose and long-term glucose values in patients with coronary artery disease.

8.5. RAGE influences the development of aortic valve stenosis in mice on a high fat diet.

Hofmann B, Yakobus Y, Indrasari M, Nass N, Navarrete Santos A, Kraus FB, Silber RE, Simm A (2014).

Exp Gerontol. 59:13-20.

DOI: 10.1016/j.exger.2014.05.001

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2014.05.001>

Abstract

Advanced glycation end product (AGE) accumulations as well as a high fat diet are associated with cardiovascular diseases. AGEs are recognized by several receptor molecules of which the receptor of AGEs (RAGE) is currently the most intensively studied. Activation of RAGE causes an unfavorable pro-inflammatory state. The hypothesis of this study was that metabolic stress due to a high fat diet results in the development of aortic valve stenosis and that knockout of RAGE should be protective.

Six week old male C57BL/6N and C57BL/6N RAGE^{-/-} mice (n=28) were randomly assigned to 4 groups and fed with normal or high fat diet for 32 weeks. Weight gain was determined weekly. At the start of the experiment and after 2, 4 and 7 months, echocardiographic assessments of the aortic valve were made. At the end of the experiment, plasma lipid levels and histological changes of the valves were determined.

The high fat diet resulted in accelerated weight gain. However, after 7 month, only C57BL/6 mice developed increased trans-aortic-valve velocities, leaflet thickness and reduced valve area index (p<0.0001). Immunohistochemistry of the aortic valves revealed in C57BL/6N mice on a high fat diet more calcification, AGE accumulation and RAGE expression when compared to normal fed control. Hearts and aortic valves of RAGE^{-/-} mice showed less morphometric changes, calcification and AGE accumulation. After 7months of high fat feeding C57BL/6 mice (p<0.0001) as well as RAGE^{-/-} mice (p=0.007) had significantly increased cholesterol levels compared to normal fed control, however RAGE^{-/-} mice were probably protected due to a better HDL/LDL ratio when compared to wild type animals (p=0.003).

These data suggest that AGEs and RAGE are involved in the development of obesity, hypercholesterolemia and aortic valve changes due to metabolic stress from high fat intake.