

Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Entwicklung eines Ratten-Futtermodells
der akzelerierten kardiovaskulären Degeneration
zur Evaluation von Herzklappen- und Gefäßprothesen

Dissertation

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

vorgelegt von
Kai Zwirnmann
(2017)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Kai Zwirnmann
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg
Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen in Fachzeitschriften:

Alexander Assmann, Kai Zwirnmann, Friederike Heidelberg, Franziska Schiffer, Kim Horstkötter, Hiroshi Munakata, Felix Gremse, Mareike Barth, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari; *The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model; Biomaterials* August 2014 (Volume 35, Issue 26); 7416–7428

Vorträge:

Alexander Assmann, Kai Zwirnmann, Hiroshi Munakata, Christofer Delfs, Kim Horstkötter, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari. *A Small Animal Model of Accelerated Cardiovascular Calcification to Evaluate Biological versus Tissue-Engineered Heart Valve Prostheses; 4th Annual Joint Scientific Meeting of the Heart Valve Society of America and Society for Heart Valve Disease*, New York City, USA, 12.-14. April 2012

Poster-Präsentationen:

Alexander Assmann, Kai Zwirnmann, Hiroshi Munakata, Christofer Delfs, Kim Horstkötter, Bhawana Poudel-Bochmann, Hiroyuki Kamiya, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari; *Developing a Rat Model of Cardiovascular Calcification to Evaluate Tissue-Engineered Heart Valve Prostheses; 5th Biennial meeting on Heart Valve Biology and Tissue Engineering*, Mykonos, Griechenland, 18.-20. Mai 2012.

Alexander Assmann, Kai Zwirnmann, Hiroshi Munakata, Franziska Schiffer, Friederike Heidelberg, Marc Struß, Felix Gremse, Mareike Barth, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari. *Development of a rodent model of accelerated cardiovascular calcification to examine the degeneration of heart valve and vessel implants. Termis EU 2014 Congress, Genua, Italien, 10.-13. Juni 2014.*

Zusammenfassung

Es bleibt ein wichtiger Gegenstand der Forschung, die Haltbarkeit von Herzklappen-Bioprothesen zu verlängern und neue Ansätze bei der Entwicklung von Aortenklappenimplantaten zu erforschen. Um Implantate *in vivo* im systemischen Kreislauf standardisiert vergleichen und beurteilen zu können, ist es notwendig, sie in Kleintiermodellen zu testen. Um dies in kurzen Beobachtungszeiträumen zu ermöglichen, sind alimentäre Modelle der akzelerierten kardiovaskulären Degeneration hilfreich. Da die Mehrheit der Futterstudien an kleinen Nagern, welche für Implantationsstudien mit großen Fallzahlen die erste Wahl wären, sich bisher auf die kalzifizierende Degeneration der Aorta fokussierte und die alimentäre Induktion einer kalzifizierenden Degeneration der Aortenklappen bisher nicht Gegenstand tiefgehender, umfassender Nachforschungen war, ist es nötig, ein solches Modell zu entwickeln.

Es wurden 102 Wistar-Ratten in 6 Futtergruppen unterteilt. Neben einer Kontrollgruppe mit Normalfutter wurden 5 Futtergruppen *ad libitum* mit prokalzifizierenden, atherogenen Futterzusätzen aus verschiedenen Zusammensetzungen von Vitamin D₃, Cholesterin und Dikalziumphosphat gefüttert. Wöchentlich wurde das Gewicht der Tiere gemessen und die gefressene Futtermenge bestimmt. Der Beobachtungszeitraum entsprach 12 Wochen. Je 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn der Fütterung wurden jeweils 5 Tiere pro Futtergruppe echokardiographisch untersucht, die Tiere euthanasiert und ihre Organe explantiert sowie Serumproben entnommen. Die *Aorta ascendens* sowie die Aortenklappenregion der Tiere wurden hinsichtlich der Kalzifizierung und der Degeneration im kardiovaskulären System histologisch, immunhistologisch und molekularbiologisch ausgewertet. Darüber hinaus wurden insgesamt 12 Aortenexplantate nach 4 und 12 Wochen Fütterung einer μ CT-Untersuchung unterzogen.

Eine Futterkombination aus hohen Dosen Vitamin D₃ (300.000 IE/kg), Dikalziumphosphat (1,5 %) und Cholesterin (2 %) führte zu erhöhten Serumkalzium- und Cholesterinwerten, sowie einem erhöhten Verhältnis von LDL/HDL. Sie induzierte eine Erhöhte MMP-Aktivität, was mittels einer *in situ* Zymographie sichtbar gemacht werden konnte und bedingte eine signifikante Kalzifizierung sowohl der Aortenklappenregion, als auch der Aortenwand, was mittels Histologie und μ CT quantifiziert wurde. Die Immunhistologie und die quantitative RT-PCR deckten eine osteochondrogene Transformation, Lipidablagerungen, nitrosativen Stress und leichtgradige Entzündungsprozesse in den Bereichen verstärkter Kalzifizierung auf. Allerdings führte diese Futterkombination nach 8-12 Wochen auch zu physischen Einschränkungen der Versuchstiere. Eine Futterkombination aus den gleichen Futterzusätzen mit reduzierter Dosierung (150.000 IE/kg Vitamin D₃, 0,75 % Dikalziumphosphat und 1 % Cholesterin) zeigte eine langsamer progrediente Mikrokalzifizierung der Aortenklappenregion und der großen Gefäße, funktionelle Einschränkungen und einen niedrigstufigen entzündlichen Gewebsumbau.

Das entwickelte Futtermodell mit der vollen Dosis der prokalzifizierenden Futterzusätze für kurze Beobachtungszeiträume und der reduzierten Dosis für längere Beobachtungszeiträume über mehr als 12 Wochen stellt ein wirksames und nützliches Werkzeug in der Erforschung degenerativer Prozesse *in vivo* dar. Die extremen prodegenerativen Bedingungen des Modells sind eine gute Grundlage für die Bewertung kardiovaskulärer Implantate im Kleintiermodell innerhalb kurzer Beobachtungszeiträume. Dieser ausbalancierte diätische Trigger kommt zudem ohne die genetische Veränderung von Versuchstieren aus.

Abkürzungen

°C	Grad Celcius
*	p < 0,05
**	p < 0,01
***	p < 0,001
3D	Dreidimensional
α-Gal	Galaktose-α-1,3-galaktose
αSMA	<i>α-smooth-muscle-actin</i>
Δ	Delta
μ-	mikro-
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
Apo, apo	Apolipoprotein
Aqua dest	<i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
bit	<i>binary digit</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
c-	centi-
CaCl ₂	Kalziumchlorid
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
(c)DNA	<i>(complementary) desoxyribonucleic acid</i> ([komplementäre] Desoxyribonukleinsäure)
C _t	<i>cycle of threshold</i>
CT	Computertomographie
Ctrl	Kontrollgruppe (<i>control</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DCP	Dikalziumphosphat, CaHPO ₄
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
dist.	<i>Distal</i>
FS	<i>fractional shortening</i> (Verkürzung des linken Ventrikels während der Systole)
g	Gramm
GAGs	Glykosaminoglykane
h	<i>hour, hours</i> (Stunden)
H	Halbdosis-Härtefutter-Gruppe
HDL	<i>high density lipoprotein</i> (Lipoprotein hoher Dichte)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF1α/a	<i>hypoxia-inducible factor-1-alpha</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10</i>
IE	Internationale Einheit(en)
IFNγ	<i>Interferon gamma</i>
Ig	<i>Immunglobulin, Antikörper</i>
k-	kilo-
KO	<i>Knockout</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niederer Dichte)
l	Liter

LVEF, EF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVIDd, LVDD	linksventrikulärer innerer Durchmesser diastolisch
LVIDs, LVDS	linksventrikulärer innerer Durchmesser systolisch
m	Meter
m-	mili-
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMPs	Matrix-Metallo-Proteinase(n)
mol, Mol	Mol(ar)
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
n-	nano-
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NIR	<i>near infrared</i>
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
OCN	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
p	Signifikanzwert (<i>propability value</i>)
p-	pico-
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PG	<i>pressure gradient</i> (Druckgradient über der Aortenklappe)
Pkt.	Punkte
prox.	<i>proximal</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i> (Rezeptor für glykierte Endprodukte)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase- <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RUNX2	<i>runt-related transcription factor-2</i>
s	Sekunden
sc.	<i>subcutan</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
TGFβ	<i>transforming growth factor</i> (Transformierender Wachstumsfaktor) <i>beta</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor <i>alpha</i>
TRIs-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Chlorwasserstoff
V	Volldosis-Härtefutter-Gruppe
VD	Vitamin D ₍₃₎ , Dihydroxycholecalciferol
W	Watt
r	Korrelationskoeffizient (nach Pearson)
ROI	<i>region of interest</i>
VIC	valvuläre interstitielle Zellen
vs.	<i>versus</i> (gegenüber)

Inhalt

Zusammenfassung	I
Abkürzungen	II
Inhalt	IV
1. Einleitung	1
1.1. Herzklappenprothesen	2
1.1.1. Prothesenarten und begrenzende Faktoren	2
1.1.2. <i>Tissue Engineering</i> als Alternative	4
1.1.3. Notwendigkeit von Studien am Versuchstier	5
1.2. Degenerative Prozesse	6
1.2.1. Native kardiovaskuläre Degeneration: Atherosklerose und Aortenklappensklerose	6
1.2.2. Strukturelle Degeneration von Bioprothesen	12
1.3. Experimentelle Akzeleration der kardiovaskulären Kalzifizierung	13
1.3.1. Nicht-alimentäre Arten der Beeinflussung kardiovaskulärer Kalzifizierung	13
1.3.2. Alimentäre Möglichkeiten der Beeinflussung kardiovaskulärer Kalzifizierung	14
1.3.3. Alimentäre Beeinflussung der kardiovaskulären Kalzifizierung im Tierexperiment	15
2. Ziele der Arbeit	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Studienaufbau	19
3.2. Tierhaltung	19
3.2.1. Haltungsbedingungen	19
3.2.2. <i>In vivo</i> erhobene Daten	20
3.3. Explantation	20
3.3.1. Narkose, Vorbereitung	20
3.3.2. Echokardiographie	20
3.3.3. Eröffnung, Blutentnahme	20
3.3.4. Organexplantation und Einbettung	21
3.4. Klassische Histologie	22
3.4.1. Kryotomie	22
3.4.2. Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbung	23
3.4.3. Von Kossa Versilberung	23
3.4.4. Von-Kossa-Score	23
3.4.5. Objektivierung des Von-Kossa-Scores mit ImageJ	24
3.4.6. Movat Pentachrom Färbung	26

3.4.7.	Oil Red O Färbung.....	27
3.5.	Immunfluoreszenzen.....	27
3.6.	<i>In situ</i> Zymographie.....	28
3.6.1.	Methode.....	28
3.6.2.	Quantifizierung mit ImageJ.....	28
3.7.	PCR.....	29
3.7.1.	RNA-Isolation.....	29
3.7.2.	Reverse Transkription.....	30
3.7.3.	Real-Time PCR.....	30
3.7.4.	$\Delta\Delta C_t$ -Methode.....	31
3.8.	Radiologische Diagnostik: μ CT.....	31
3.8.1.	Explantation und Einbettung.....	31
3.8.2.	μ CT.....	32
3.9.	Statistische Angaben.....	33
3.10.	Eigenanteil der durchgeführten Methodik sowie geleistete Etablierungsarbeit.....	34
3.11.	Verwendete Materialien.....	35
3.11.1.	Materialliste.....	35
3.11.2.	Antikörper.....	38
3.11.3.	Software.....	38
3.11.4.	Geräteliste.....	39
3.12.	Berechtigungsnaehweise.....	40
3.12.1.	Aktenzeichen.....	40
3.12.2.	Tierversuchsgenehmigung.....	41
3.12.3.	Erklärung über die Teilnahme an der Versuchstierkunde.....	42
4.	Ergebnisse.....	43
4.1.	<i>In vivo</i> erhobene Daten.....	43
4.1.1.	Gewichtsverlauf.....	43
4.1.2.	Gefressene Futtermengen.....	44
4.1.3.	Kardiale Masse (<i>ex vivo</i>).....	45
4.1.4.	Echodaten vor der Explantation.....	45
4.1.5.	Serumwerte zum Zeitpunkt der Explantation.....	46
4.2.	Histologie.....	48
4.2.1.	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	48
4.2.2.	Von-Kossa Färbung.....	48
4.2.3.	Von-Kossa-Score.....	50

4.2.4.	Movat Pentachrom Färbung, Neointimale Hyperplasie.....	53
4.2.5.	Oil Red O Färbung, Lipidvakuolen.....	55
4.3.	Immunfluoreszenzen.....	56
4.3.1.	CD3/CD68.....	56
4.3.2.	α -Smooth-muscle-actin.....	57
4.3.3.	Desmin.....	58
4.3.4.	Syndecan-3.....	59
4.3.5.	3-Nitrotyrosin.....	59
4.4.	<i>In situ</i> Zymographie.....	60
4.5.	PCR.....	62
4.6.	Radiologische Diagnostik.....	64
5.	Diskussion und Schlussfolgerungen.....	66
5.1.	Alimentäre Induktion der vaskulären Degeneration.....	66
5.1.1.	Kalzifizierung.....	66
5.1.2.	<i>Remodeling</i>	67
5.1.3.	Osteochondrogene Transformation.....	68
5.1.4.	Inflammation.....	69
5.2.	Alimentäre Induktion der Aortenklappendegeneration.....	69
5.2.1.	Kalzifizierung.....	69
5.2.2.	<i>Remodeling</i>	70
5.2.3.	Lipidmetabolismus und -ablagerungen.....	71
5.2.4.	Osteochondrogene Transformation.....	71
5.2.5.	Inflammation und Zelluntergang.....	72
5.2.6.	Funktionelle Einschränkung.....	73
5.3.	Vergleich der Futterzusätze.....	73
5.3.1.	Vitamin D.....	73
5.3.2.	Cholesterin.....	75
5.3.3.	Dikalziumphosphat.....	77
5.3.4.	Auswahl der passenden Futtergruppe.....	77
5.3.5.	Ausblick.....	78
5.4.	Limitationen.....	80
5.5.	Schlussfolgerungen.....	80
6.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	82
7.	Danksagungen.....	94
8.	Eidesstattliche Versicherung.....	95

1. Einleitung

Im Jahr 2013 starben in Deutschland insgesamt 354.493 Menschen an Erkrankungen des Herzkreislaufsystems. Mit 39,7 % stellten diese damit den größten Anteil der Todesursachen in der Bundesrepublik dar. Bei beiden Geschlechtern starben laut aktuellen Angaben des Statistischen Bundesamtes mehr Menschen an einer Krankheit dieses Formenkreises als an der Folge von Malignomen [1]. Einen zunehmend relevanten Anteil davon stellen kalzifizierende Erkrankungen der Herzklappen, insbesondere der Aortenklappe, dar. Sie haben ein sehr ähnliches Risikofaktorenprofil [2] und zeigen häufig Komorbiditäten [3] mit der atherosklerotischen Herzkrankheit, die den führenden Platz der Todesursachenstatistik in Deutschland einnimmt. Nach Eingriffen an den Koronargefäßen sind operative Eingriffe an den Herzklappen in Deutschland der zweithäufigste Grund für eine Operation in der Herzchirurgie [4].

Das linke Herz ist aufgrund der zunehmenden Schädigungen durch die höheren Druckverhältnisse im systemischen Kreislauf häufiger betroffen. Die Aortenklappenstenose nimmt mit bis zu 43,1 % aller Einzelklappenerkrankungen den größten Teil dieser Erkrankungen in Europa ein. Sie ist deutlich mit einem höheren Lebensalter assoziiert und stellt in Europa und Amerika nach der arteriellen Hypertonie und der koronaren Herzerkrankung die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung dar. An zweiter Stelle der Herzklappenerkrankungen steht die Mitralklappeninsuffizienz ohne einen so deutlichen Zusammenhang mit dem Alter des Patienten [3], [5].

In der Unterscheidung der Herzklappenfehler in angeborene und erworbene Vitien dominieren letztere. Die Degeneration hat dabei im Laufe der letzten Jahre in den Industrienationen die Infektion als häufigste auslösende Ursache eines erworbenen Vitiums abgelöst. Dies ist vor allem durch den höheren Altersdurchschnitt und die bessere Behandlung des rheumatischen Fiebers zu erklären. In Ländern, in denen rheumatische Herzerkrankungen weiterhin endemisch vorkommen, ist die Mitralklappenstenose noch immer der häufigste Grund für eine Herzklappenerkrankung [3], [6], [7]. Degenerative Veränderungen der Aortenklappe stellen heute eine typische Erkrankung des älteren Patienten dar. In einigen Industrienationen wurde in großen, multizentrischen Studien gezeigt, dass eine mäßiggradige bis schwere Klappenerkrankung im Alter über 75 Jahren eine Prävalenz von 13,3 % aufweist [8], beziehungsweise bei bis zu 37-57 % aller Patienten in diesem Alter eine mindestens leichtgradige Aortenklappensklerose, eine Vorstufe der kalzifizierenden Aortenklappenstenose, nachweisbar ist. Ein Anteil von 2,6-2,9 % der Bevölkerung zeigen in diesem Alter bereits eine schwergradige Aortenklappenstenose [2], [5]. Die degenerative Aortenklappenerkrankung weist außer einem hohen Alter weitere der Atherosklerose und koronaren Herzkrankheit gleichende Risikofaktoren auf, wie eine arterielle Hypertension, Nikotinkonsum, eine Hyperlipidämie beziehungsweise ein ungünstiges Lipoproteinprofil oder das männliche Geschlecht, und entsteht wahrscheinlich durch ähnliche Schädigungsmechanismen [2].

Bereits 1993 wurde die Aortenklappenstenose als signifikantes Gesundheitsproblem des älteren Menschen hervorgehoben [5]. Aufgrund des immer höheren zu erwartenden Lebensalters [9] und der Häufigkeit des Auftretens der oben genannten Risikofaktoren in der Bevölkerung der westlichen Industrienationen werden die degenerativen Klappenerkrankungen auch weiterhin eine relevante Herausforderung in der Medizin bleiben.

1.1. Herzklappenprothesen

Im Rahmen verschiedener angeborener und erworbener Herzklappenervitien, so auch der Aortenklappenstenose, ist der Krankheitsprogression mittels konservativer Therapie kein dauerhafter Einhalt zu gebieten. Hier erzwingen die entsprechende Klinik oder Einschränkung der ventrikulären Funktion nach Ausschöpfung der konservativen Therapie eine interventionelle Maßnahme oder eine operative Therapie [10], [11]. Rekonstruktive Operationsverfahren, bei denen das eigene Klappengewebe des Patienten erhalten wird, kommen insbesondere bei Erkrankungen der Mitralklappe in Frage. Sie bieten den Vorteil, dass die Risiken, die ein Klappenersatz mit sich bringt, wie zum Beispiel Endokarditis, Thrombembolie oder ein erhöhtes Blutungsrisiko unter Antikoagulation, weitestgehend minimiert werden [12]. Bei nicht korrigierbaren Erkrankungen der Herzklappen ist der Ersatz durch eine Prothese aber häufig unumgänglich, wie aus den Evidenz-basierten Leitlinien zu Klappenerkrankungen im Erwachsenenalter der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V. und den Leitlinien der gemeinsamen Arbeitsgruppe der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie und der Europäischen Gesellschaft für Herz-Thorax-Chirurgie zum Management von Herzklappenerkrankungen hervorgeht. Herzklappenprothesen stellen aktuell den Goldstandard in der Behandlung diverser Herzklappenerkrankungen dar, wie zum Beispiel der symptomatischen Aortenklappenstenose oder –insuffizienz mit Einschränkung der linksventrikulären Funktion. Sie ermöglichen beim operablen Patienten mit symptomatischer Aortenklappenstenose eine deutliche Besserung der Symptomatik und eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion [13], [14].

Ob der operative Zugangsweg dabei konventionell offen über eine Sternotomie, eine Thorakotomie oder katheterbasiert gewählt wird, ist hauptsächlich abhängig vom individuellen Operationsrisiko des Patienten und dessen Komorbiditäten, wobei der katheterbasierte Zugang bisher den Hochrisikopatienten vorbehalten ist [11], [15], [16]. In den letzten 10 Jahren stellt der offene Zugang über eine Sternotomie bei weitestgehend unveränderten Fallzahlen den häufigsten Zugangsweg dar, wobei die Fallzahlen des transapikalen und transfemorale Zugangs einen deutlichen Aufwärtstrend zeigen [4].

1.1.1. Prothesenarten und begrenzende Faktoren

Es stehen verschiedene Arten der Herzklappenprothesen zur Verfügung. Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Prothesentypen: Mechanische Herzklappenprothesen und Bioprothesen. Wie jede andere Prothese auch sind alle Herzklappenprothesen im Vergleich zum gesunden Nativorgan funktionell minderwertig. Jeder dieser Typen bietet jeweils einige Vorteile, bringt aber auch entscheidende Limitationen mit sich.

Mechanische Herzklappen werden aus Metall oder Kunststoff hergestellt und sind als Kippscheiben- oder Doppelflügelmodell auf dem Markt. Sie bieten eine lange Haltbarkeit und eine gute, allerdings auch unphysiologische postoperative Hämodynamik. Die mechanischen Herzklappen bringen durch das körperfremde, künstliche Material und die grundsätzlich veränderte Hämodynamik eine hohe Thrombogenität mit sich, was eine lebenslange Antikoagulation für den Patienten unumgänglich macht [17]. Sowohl das Blutungsrisiko als auch das Risiko für einen zerebralen Insult sind somit langfristig erhöht. Dies stellt die entscheidende Einschränkung dieser Prothesenarten dar [18], [19]. Ein weiterer Aspekt ist ein beim

Klappenschluss entstehendes Geräusch mechanischer Klappenersätze, das die Lebensqualität des Patienten beeinträchtigen kann [20].

Bioprothesen stehen als Transplantat vom menschlichen Spender, sogenannte Homo- oder Allografts, oder als tierisches Explantat, sogenannte Xenografts, zur Verfügung. Beide Alternativen stellen nach entsprechender Fixierung des Transplantates mittels chemischer und physikalischer Verfahren keine Indikation für eine lebenslange Antikoagulation des Empfängers dar. Die Möglichkeit einer katheterbasierten, transarteriellen Implantation besteht nur mit Bioprothesen, da keine entsprechend komprimierbare mechanische Prothese existiert.

Porzine, bovine oder equine, speziell zur Transplantation aufbereitete Bioprothesen bieten gute hämodynamische Eigenschaften. Sie besitzen allerdings eine begrenzte Haltbarkeit und sind deutlich kurzlebiger als ein mechanischer Klappenersatz. Die Zeitspanne bis zur Notwendigkeit einer Rezidivoperation schwankt je nach Bioprothesenart und Alter des Patienten bei Implantation zwischen 5 und 20 Jahren. Langfristige Daten zeigen, dass bei Bioprothesen das Endokarditisrisiko und durch die begrenzte Haltbarkeit vor allem das Risiko einer Zweitoperation im Vergleich zu mechanischen Klappenersätzen deutlich erhöht sind, wobei die Vergleichbarkeit langfristiger Ergebnisse durch die ständige Weiterentwicklung von Bioprothesen erschwert ist. Fünfzehn Jahre nach Implantation benötigten etwa 40 % der Patienten bereits eine Reoperation mit erneutem Klappenersatz [17]–[19], [21]. Andere Daten weisen darauf hin, dass das Endokarditisrisiko bei Bioprothesen niedriger ist [22]. Der wesentliche begrenzende Faktor für die Lebenserwartung einer Bioprothese sind degenerative, kalzifizierende Prozesse, verstärkt durch die Unfähigkeit des avitalen Gewebes zur Regeneration. Eine fortschreitende strukturelle Degeneration führt zum Versagen aller aktuell verfügbaren Prothesen, was bei entsprechender Lebensdauer des Patienten eine Zweitoperation mit allen dazugehörigen Risiken erforderlich macht [23]. Auf die genauere bisher bekannte Pathophysiologie dieser Vorgänge wird im Abschnitt „1.2.2 Strukturelle Degeneration von Bioprothesen“ näher eingegangen. Aufgrund der Avitalität des Gewebes haben Bioprothesen genau so wenig Potential zum Wachstum wie mechanische Klappen, was unter anderem die Einsatzmöglichkeit bei Kindern stark beschränkt. Bei Kindern ist die Haltbarkeit von Bioprothesen infolge einer intensiveren Immunantwort des Empfängers gegen das Implantat sogar noch eingeschränkter als bei Erwachsenen [24], [25]. Bioprothesen existieren als Implantat innerhalb eines Stents oder ohne Stent. Langzeitergebnisse zu den stentlosen Implantaten stehen noch aus und sind daher noch nicht abschließend zu beurteilen [26].

Transplantate von menschlichen Spendern werden aufgrund der geringeren Verfügbarkeit und der schwierigen standardisierten Aufbereitung und Zuordnung menschlicher Explantate zum passenden Spender deutlich seltener verwendet [27]. Sie scheinen den Xenografts nicht überlegen [28], [29] und bieten durch die anhängende Aortenwurzel hauptsächlich eine abzuwägende Alternative bei einer akuten infektiösen Endokarditis mit ausgeprägter Zerstörung des Klappenapparates und der umliegenden anatomischen Strukturen [30]. Ein autologer Ersatz der Aortenklappe durch die Pulmonalklappe des Patienten und ein konsekutiver Ersatz der Pulmonalklappe durch ein Homograft, die sogenannte Ross-Prozedur, bietet zwar vor allem bei Kindern den Vorteil der Fähigkeit des Wachstums des Aortenklappenimplantates, bleibt aber aufgrund der Notwendigkeit von Zweitoperationen speziellen Indikationen vorbehalten [11], [31]. Damit beschränkt sich die Wahl bei den meisten Patienten auf einen mechanischen Klappenersatz oder ein im Stent implantiertes Xenograft.

Aktuelle Zahlen aus dem Jahr 2013 zeigen die Häufigkeitsverteilung zwischen der Implantation biologischer und künstlicher Klappen auf: In Deutschland führen heute Xenografts sowohl bei isolierten Aortenklappenersätzen als auch bei isolierten Mitralklappenersätzen mit 10.049 Aortenklappen und 1.432 Mitralklappen vor mechanischen Klappenersätzen mit 1.506 beziehungsweise 486 Implantationen. Allografts wurden mit Abstand am seltensten implantiert. Katheterbasierte Implantationen sind von diesen Zahlen ausgeschlossen [4].

Die Abwägung zwischen einem mechanischen Herzklappenersatz und einem Xenograft wird jeweils individuell beim einzelnen Patienten getroffen und ist durch die zuvor dargestellten Limitationen der jeweiligen Prothesen geprägt. Vor allem ist es notwendig, das Risiko einer Blutungskomplikation unter Antikoagulation bei einer mechanischen Prothese mit dem Risiko einer Zweitoperation bei Versagen einer Bioprothese durch strukturelle Degeneration gegeneinander abzuwägen. Dabei sind selbstverständlich auch die Berücksichtigung des Patientenwillens, der zu ermöglichenden Lebensqualität und der Lebenserwartung des Patienten entscheidende Faktoren [32]. Aktuell werden Bioprothesen vor allem Patienten mit einem erhöhten Blutungsrisiko und Patienten, deren Lebenserwartung nicht deutlich über der voraussichtlichen Lebensdauer einer Bioprothese liegt, empfohlen, insbesondere wenn Komorbiditäten weitere Eingriffe mit erhöhtem Blutungsrisiko wahrscheinlich machen. Bioprothesen werden ebenfalls bei chronischem Nierenversagen oder einem Herzklappenersatz vor einer möglichen Schwangerschaft bevorzugt [11].

Bioprothesen bieten eine vielversprechende Möglichkeit, auch bei jüngeren Patienten über 60 Jahren weniger prothesenbezogene Komplikationen (Blutungskomplikationen und Zweitoperationen eingeschlossen) zu erleiden. Dies ist vor allem dadurch begründet, dass eine Bioprothese keine Indikation für eine lebenslange Antikoagulation darstellt [33]. Zudem bietet auch die katheterbasierte transarterielle Implantation eine vielversprechende Therapieoption mit einer Bioprothese. Es bleibt daher ein wichtiger Gegenstand der Forschung, die Haltbarkeit von Bioprothesen zu verlängern, um das Risiko einer Zweitoperation senken zu können.

1.1.2. Tissue Engineering als Alternative

Die Hauptprobleme der begrenzten Haltbarkeit von Bioprothesen durch die kalzifizierende strukturelle Degeneration sind zum einen die Unfähigkeit zur Regeneration und Erneuerung des avitalen Gewebes der herkömmlichen Bioprothesen und zum anderen eine Immunantwort des Empfängerorganismus gegen Oberflächenantigene der Spenderzellen eines Implantates [23]. Auf die genaueren Umstände wird im Abschnitt „1.2.2 Strukturelle Degeneration von Bioprothesen“ eingegangen. Ein in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückter Ansatz zur Problemlösung ist das *Tissue Engineering*. Der Begriff des *Tissue Engineering* wurde in den späten 1980er Jahren eingeführt. Eine aktuellere, auf die Anwendung an Herzklappen bezogene Definition des Begriffs ist „die Manipulation von biologischen Molekülen und Zellen mit der Absicht, neue Strukturen mit der Befähigung zur metabolischen Aktivität zu erschaffen“ [34].

Die geforderten Eigenschaften des so hergestellten Materials beinhalten unter anderem, dass es als Implantat keine Antikoagulation erfordert, idealerweise lebenslang haltbar ist und neben einer hohen Biokompatibilität auch die Fähigkeit zur Regeneration beziehungsweise zum *Remodeling* und sogar zum Wachstum besitzt, sowie nicht immunogen ist [35]. Dabei werden verschiedene Ansätze verfolgt: Das klassische *Tissue Engineering* verwendet Grundgerüste, die *in vitro* mit autologen Zellen besiedelt werden und sich zum Beispiel unter Einfluss eines Bioreaktors zu

komplexen Geweben oder Organstrukturen entwickeln. Bei der *Guided Tissue Regeneration* dagegen wird ein azelluläres Grundgerüst implantiert, das dann *in vivo* mit autologen Zellen besiedelt wird. Ein weiterer Ansatz ist der selektive Zelltransfer, bei dem Zellen zur Erhöhung der Konzentration des jeweiligen Zelltyps lokal oder systemisch injiziert werden [34]–[36]. Keiner der verschiedenen Ansätze ist bisher vollkommen ausgereift, und es steht noch aus zu zeigen, welche Modelle sich in der klinischen Routine bewähren können. *Tissue-engineerte* Herzklappenimplantate sind eine neue Alternative zu den bisher eingesetzten Bioprothesen und könnten ihnen in Zukunft überlegen sein [36].

Am Beispiel der Herzklappen existiert bisher eine Vielzahl an experimentellen und präklinischen Arbeiten, die diese Überlegungen stützen. Es herrscht dabei allerdings noch keine Einigkeit darüber, welche Ansätze sich in Zukunft durchsetzen werden. Die Fragestellungen hier beinhalten zum Beispiel, ob synthetische [37]–[39] oder dezellularisierte xenogene oder allogene biologische Grundgerüste [40]–[42] mehr Potential bieten und ob eine Rebesiedlung *in vitro* [42]–[45] oder *in vivo* [40], [41] zu bevorzugen ist. Auch die Fragen der Zellwahl im Rahmen einer *in vitro* Rebesiedlung [46]–[48] oder einer möglichen zusätzlichen Oberflächenbeschichtung der Strukturgerüste [49] sind noch nicht abschließend beantwortet. Vielversprechende kurz- und mittelfristige klinische Ergebnisse einiger Studien zeigen aber schon das Potential dieser neuen Techniken auf [50]–[53].

Es besteht noch ein deutlicher Bedarf zu weiterer Forschung, ehe diese Techniken in der klinischen Anwendung voll etabliert sind. Dazu sind vor allem der Vergleich neuer Modelle und konventioneller Prothesen sowie der Vergleich mit nativen degenerativen Prozessen notwendig, um eine objektive Beurteilung dieser neuen Prothesenalternativen zu ermöglichen.

1.1.3. Notwendigkeit von Studien am Versuchstier

Es gibt einen Bedarf für Tierversuche, um Implantate auch unter *in vivo* Bedingungen aussagekräftig beurteilen zu können. Es ist vor allem erforderlich, neue Ansätze im Tierversuch ausreichend zu testen, um Zwischenfälle nach der Implantation im Menschen, wie sie bereits vorgekommen sind [58], zu vermeiden. Kleintiermodelle ermöglichen vergleichende Studien mit einer größeren Anzahl an Versuchstieren. Es existiert eine größere Bandbreite an molekularbiologischer Methodik, sowie mehr Erfahrung und mehr standardisierte Methodik in präklinischen Studien im Vergleich zu Großtiermodellen. Um die Degeneration von tissue-engineerten Implantaten und die dazu führenden Prozesse untersuchen und potentielle Verbesserungen der Implantate oder protektive Maßnahmen präklinisch testen zu können, wird ein Kleintiermodell benötigt, in dem die Kalzifizierung eines Implantates in kurzen Beobachtungszeiträumen beschleunigt werden kann.

Es wurde bereits in vorangegangenen Studien ein Implantationsmodell an Ratten entwickelt und optimiert, um biologische und tissue-engineerte Aortenimplantate im systemischen Kreislauf standardisiert vergleichen und beurteilen zu können [59], [60]. Um dieses Modell modular um akzelerierte kardiovaskuläre Kalzifizierung erweitern zu können, und somit die Degeneration verschiedener implantierter Prothesentypen innerhalb kurzer Zeiträume vergleichend untersuchen zu können, bietet sich eine Futter-Supplementierung mit pro-degenerativen Faktoren an (Vitamin D₃, Dikalziumphosphat und Cholesterin). Um die hiermit zu provozierende akzelerierte kardiovaskuläre Kalzifizierung besser zu verstehen und zu kontrollieren und das

Modell dadurch weiter zu optimieren, ist es notwendig, die Prozesse, die man provoziert, an Tieren ohne Implantat genauer zu quantifizieren und zu bewerten.

Die Komorbiditäten und patienteneigenen Risikofaktoren haben einen großen Einfluss auf die Lebensdauer einer Herzklappenprothese. Zum Beispiel gelten die Niereninsuffizienz oder auch verschiedene Lipidstörungen als unabhängige Risikofaktoren für die Lebensdauer von Implantaten und fördern eine kardiovaskuläre Kalzifizierung [54]–[56]. Es gibt zahlreiche Bemühungen, diese Risikofaktoren im Tierversuch darzustellen und zu beurteilen [57]. Ein Modell, das in der Lage wäre, verschiedene Risikofaktoren mit einander zu kombinieren und nach Bedarf die verschiedenen Risikofaktoren unterschiedlich zu gewichten, wäre eine interessante Erweiterung.

1.2. Degenerative Prozesse

Wie bereits zuvor erwähnt sind der wesentliche begrenzende Faktor für die Lebenserwartung einer Bioprothese strukturell degenerative, kalzifizierende Prozesse, verstärkt durch die Unfähigkeit des avitalen Gewebes zur Regeneration. Um neue Ansätze am Kleintier testen zu können und die kardiovaskuläre Kalzifizierung akzeleriert imitieren zu können, ist es für die Modellentwicklung am nativen Tier zunächst nötig, die Pathogenese dieser Prozesse ausführlicher zu betrachten. Hierbei gibt es einige Überschneidungen mit degenerativen Prozessen im kardiovaskulären System, die auch ohne Implantation einer Prothese auftreten, beispielsweise der Atherosklerose oder der Aortenklappensklerose. Da es deswegen sinnvoll ist, ein Modell auch mit diesen Prozessen zu vergleichen, werden auch diese im Folgenden kurz dargestellt.

1.2.1. Native kardiovaskuläre Degeneration: Atherosklerose und Aortenklappensklerose

Atherosklerose

Die Atherosklerose stellt die häufigste vaskuläre Erkrankung der mittleren und großen Arterien dar. Ursächlich für die Entstehung einer atherosklerotischen Plaque sind Mikroläsionen des Endothels und darauf folgende subendotheliale LDL-Akkumulationen. Über die Vermittlung endothelialer Adhäsionsmoleküle und Chemokine sind eine Infiltration von Leukozyten und die Phagozytose der Lipoproteine durch Monozyten möglich. Die so entstehende Schaumzelle, ein mit Lipiden überladener Makrophage, exprimiert Wachstumsfaktoren, die eine Proliferation glatter Muskelzellen und die Produktion von Matrixproteoglykanen, elastischen Fasern und Kollagen fördert, sowie Zytokine, die zusammen mit reaktiven Sauerstoffspezies eine chronische Entzündungsreaktion unterhalten [61].

Zusätzlich kommt es innerhalb der Plaques zu einer Kalzifizierung. Die durch Zytokine stimulierten Makrophagen produzieren auch proteolytische Enzyme. Gleichzeitig wird die Synthese neuer Matrixbestandteile durch den Entzündungsfaktor Interferon γ (IFN γ) gehemmt, was insgesamt zu einer Bildung instabiler Plaques führt [62].

Es kommt zu einer zentralen Nekrose, Endotheluntergang und einer Infiltration durch T-Lymphozyten. Die Plaque kann zu einer Einengung des Gefäßlumens bis hin zum Verschluss, zur Ulzeration mit anschließender Thrombosierung des Gefäßes führen. Eine weitere gefürchtete, aber leider typische Komplikation ist die Ruptur einer instabilen Plaque [61].

Klappensklerose

Auch die Aortenklappensklerose als mildere Form der Aortenklappenkalzifizierung ist eine häufige Erkrankung des älteren Patienten. Die ausgeprägtere Form dieser degenerativen Aortenklappenerkrankung wird makroskopisch sichtbar als eine Verdickung der Klappensegel mit einer Versteifung und Kalzifizierung der Segel, was zu einer Verringerung der Klappenöffnungsfläche mit einer Erhöhung des Druckgradienten über der Aortenklappe während der Systole, also einer Aortenklappenstenose, führt. Ursächlich für diese Entwicklung scheinen mehrere Faktoren zu sein. Zum einen führt die mechanische Abscherbelastung am Klappenapparat zu einer kalzifizierenden Verletzung des Endothels. Zum anderen bedingen autoimmune Phänomene eine Degeneration. Des Weiteren lösen auch unabhängige kardiovaskuläre Risikofaktoren eine schädliche Antwort auf die eine Endothelläsion aus, den Prozessen der Atherosklerose stark ähnelt. Dass die Atherosklerose und die Aortenklappenstenose gemeinsame Risikofaktoren haben, wurde bereits zuvor erläutert. Auch neben dieser epidemiologischen Betrachtung wird heute in der Pathophysiologie der Aortenklappensklerose ein aktiver Entzündungsprozess mit gemeinsamer zellulärer Basis mit der degenerativen Gefäßerkrankung als sehr wahrscheinlich angenommen [63]. Im Rahmen beider Prozesse kommt es zu einer typischen Gewebsantwort als Folge einer Verletzung („*Response to Injury*“-Hypothese). Die vaskulären kontraktile glatten Muskelzellen und die valvulären interstitiellen Zellen (VIC) werden zur Proliferation, Sekretion von Matrix, Migration und einem Gewebsumbau („*Remodeling*“) mit Lipideinlagerungen angeregt. Es kommt in beiden Fällen zu einer abnormalen Reparatur des Gewebes und zur Kalzifizierung. Letztere fällt in den Herzklappen allerdings ausgeprägter aus, wohingegen es bei diesen nicht zu ausgeprägten Nekrosen kommt, wie bei der fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaque [64]. Die Methode der Wahl zur Diagnostik der Aortenklappensklerose und zur Bestimmung des Ausmaßes einer Stenose und des Druckgradienten über der Aortenklappe ist die Doppler-Echokardiographie [65].

Histologische, strukturelle und biologische Prozesse kardiovaskulärer Degeneration

Endothel

Eine systemische endotheliale Dysfunktion gilt als eine frühe Veränderung im Prozess der Atherosklerose. Auch eine Aortenklappenstenose geht mit einer solchen endothelialen Dysfunktion einher [66]. Dies führt zu einer verminderten Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), das hauptsächlich von Endothelzellen und in kleinerer Menge durch die valvulären interstitiellen Zellen produziert wird. NO gilt als wichtiger funktioneller Antagonist von reaktiven Sauerstoffspezies. In der Entwicklung einer Aortenklappenstenose werden reduktivem und oxidativem, sowie nitrosativem Stress und der Apoptose, die von reaktiven Nitrogen- und Sauerstoffspezies induziert wird, eine wichtige Rolle zugeschrieben. Dementsprechend zeigen NO-Donatoren einen inhibitorischen Effekt auf die Kalzifizierung [67]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch unabhängige Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hypertension, Diabetes oder eine Niereninsuffizienz über eine Induktion oxidativen Stresses ihre kalzifizierenden Effekte entfalten [68]. Eine verminderte Gewebsantwort beziehungsweise erhöhte Resistenz auf die Wirkung von NO ist mit einer Progression der Aortenklappensklerose assoziiert [69], [70].

Eine Reaktion des Gewebes auf eine endotheliale Verletzung, wie bei fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose, ist unter anderem ein Gewebsumbau in Form einer Hyperplasie der Intima an den entsprechenden Stellen durch die Proliferation α SMA-(α -*smooth-muscle-actin*)positiver Zellen [71]. Es wurde außerdem an Ratten und Kaninchen gezeigt, dass die Zellen dieser

Neointima nicht nur das kontraktile Mikrofilament α SMA, sondern auch teilweise Myosin und die mesenchymalen Intermediärfilamente Desmin und Vimentin exprimieren. Die Zellen der Neointima unterscheiden sich in diesen Punkten also nicht von glatten Muskelzellen der Media eines verletzten Gefäßes [72]. Eine endotheliale Verletzung und die Expression von Adhäsionsmolekülen gelten auch als Ursache und Eintrittspforte für zirkulierende Lymphozyten, Monozyten und Mastzellen [73].

Inflammation

Bereits frühe Stadien der Aortenklappenläsion im Rahmen einer Degeneration enthalten ein entzündliches Infiltrat aus Makrophagen, Schaumzellen, stellenweise T-Lymphozyten und kontraktile α -SMA-positiven Proteinen aus glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten [74]. Sowohl im Rahmen der Aortenklappenkalzifizierung, als auch bei atherosklerotischen Plaques wird angenommen, dass die Aktivierung von Makrophagen und Mastzellen nicht nur kolokalisiert mit kalzifizierten Arealen auftritt, sondern eine wichtige Rolle in der Pathogenese einer Kalzifizierung spielt [75]–[77]. Auch wenn ein entzündliches Infiltrat nicht in allen Geweben einer Aortenklappensklerose vorkommt, scheint sein Ausmaß mit dem Gewebsumbau und den hämodynamischen Veränderungen einer Aortenklappensklerose zu korrelieren. Es wurde daher Biomarker für die Krankheitsaktivität vorgeschlagen [78]. Im Rahmen der Mineralisation der VIC gibt es Hinweise darauf, dass das von Makrophagen im Rahmen einer Entzündung sezernierte proinflammatorische Zytokin TNF α auch ein wichtiger Mediator für die Progression der Kalzifizierung ist [79], [80]. Ein in der Diagnostik etabliertes Antigen der gesamten Monozyten-Makrophagen-Zellreihe ist der Oberflächenmarker CD68 [81]. Die Phagozytose und eine intrazelluläre Lipidakkumulation kann in glatten Gefäßmuskelzellen allerdings die Expression dieses Oberflächenantigens induzieren, was dazu führte, dass dieser auch als Biomarker für die generelle Krankheitsaktivität der Atherosklerose vorgeschlagen wurde, was bei der Untersuchung der Inflammation als Bias beachtet werden sollte [82]. Weitere interessante Biomarker, die in der letzten Zeit in den Fokus der Forschung gerückt sind und wichtige regulatorische Proteine sowohl im Rahmen der Inflammation als auch im Rahmen der kardiovaskulären Kalzifizierung darstellen, sind die Oberflächenproteine CD39 und CD73. Diese Ektonukleotidasen, die auf Endothelzellen oder Immunzellen vermehrt exprimiert werden können, bauen unter anderem ATP zu Adenosin ab und sind damit ein wichtiges Element in der Regulation einer Immunregulation [83]–[85].

Lipidablagerungen

Eine Akkumulation der Apolipoproteine apoB, apo(a) und apoE wird vor allem mit der Pathogenese der Atherosklerose und dem atherogenen Serum-Lipoprotein LDL in Verbindung gebracht [86]. LDL wird nativ in größeren Mengen mittels Pinozytose durch Makrophagen aufgenommen. In diesen akkumuliert es, wodurch sie sich zu Schaumzellen entwickeln [87]. Eine Akkumulation der Apolipoproteine wurde aber auch in frühen und fortgeschrittenen Stadien der Aortenklappenläsion, vor allem in Bereichen hoher mechanischer Belastung und niedrigen Abscherstresses an der zur Aorta hingewandten Seite des Klappensegelansatzes beobachtet, in denen Endothelverletzungen zu einer Infiltration von Plasmalipoproteinen führen können. Zusätzlich konnte eine Kolokalisation mit sezernierten Matrix-Proteoglykanen und Kalziumablagerungen, sowie eine assoziierte Infiltration von Makrophagen und T-Lymphozyten nachgewiesen werden [88].

Auch in weit fortgeschrittenen Stadien der degenerativen Aortenklappenstenose wurden diese Ergebnisse bestätigt. Es wurden auch hier Lipideinlagerungen zusammen mit einer noch weiter

fortgeschrittenen Kalzifizierung beobachtet. Außerdem konnte eine Oxidation der Lipoproteine im extrazellulären Gewebe nachgewiesen werden, die durch reaktive Sauerstoffspezies oder – radikale gefördert wird, was die Aktivierung von Makrophagen und deren Umwandlung zu Schaumzellen anregt und so zu einer weiteren TNF α -Ausschüttung führt [89]. Oxidiertes LDL regt zudem unter Einfluss von Zytokinen wie TNF α die Produktion von Prostaglandinen und der Cyclooxygenase-2, die im Entzündungsprozess essentielle Vermittler darstellen, und weiterer an der Entzündung beteiligter Enzyme an [90]. Insbesondere oxidiertem LDL in den stenosierenden Aortenklappen wird eine Assoziation mit einem ausgeprägteren entzündlichen Gewebsumbau zugeschrieben [91].

Auch erhöhte Plasma-Lipoproteinlevel, vor allem des oxidierten LDL, korrelieren mit einem höheren Risiko für einen kalzifizierenden Gewebsumbau in degenerativ veränderten Aortenklappen [92], [93]. Die Antwort auf die Frage, ob dieses zirkulierende LDL nur mit einer verstärkten Degeneration assoziiert ist und damit nur einen Indikator für ein höheres Risiko der Degeneration darstellt, oder ob es als Molekül im Blutkreislauf aktiv an der Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappendegeneration teilnimmt, bleibt bisher Spekulation. Es gibt allerdings Hinweise aus experimentellen Versuchen darauf, dass eine Hypercholesterinämie eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Endothelfunktionsstörung, des Entzündungsprozesses und des Gewebsumbaus in Herzklappen spielt [94]. Auch die Beurteilung der Lipidakkumulationen atherosklerotischer Läsionen an sich ist bisher nicht eindeutig. Zellen, die physiologischerweise in der Arterienwand vorkommen, zeigen kein Potential für eine adipozytäre Differenzierung, was ein weiterer Hinweis für einen Ursprung der Lipidablagerungen aus dem zirkulierenden LDL ist [95]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sowohl die Lipidablagerungen als auch die Mineralisierung bis hin zu chondroosteogenen Differenzierung aktive Schlüsselrollen im Rahmen der kardiovaskulären Degeneration spielen [96].

Degeneration und Kalzifizierung

Kalziumapatit-Ablagerungen sind im Rahmen einer Klappensklerose nicht nur versprengt intrazellulär, sondern auch betont zwischen Kollagenfasern zu finden. Dies scheint ein Indiz dafür zu sein, dass degenerierte Kollagenfasern insbesondere in Folge jahrelanger Belastung durch Druck und Bewegung der Klappensegel einen Ausgangskern für die Kalzifizierung darstellen könnten [97].

Auch im Rahmen der Atherosklerose wird angenommen, dass es im Rahmen der Degeneration elastischer Fasern erst zu einer Ablagerung von Cholesterin kommt und dann, getriggert durch den Entzündungsprozess, Kalziumapatit auf diesen vorher existierenden Nestern und extrazellulären Vesikeln akkumuliert, was schlussendlich in einer Zerstörung der elastischen Fasern endet. In Arterienregionen mit einer hyperplastischen Intima werden die Kalziumkonglomerate hauptsächlich in der tiefen muskuloelastischen Schicht der Intima gefunden [98]. Ähnlich den Lipidakkumulationen zeigen sich auch die kalzifizierten Areale sowohl bei der vaskulären als auch bei der valvulären Degeneration betont in Bereichen hoher Flussturbulenzen und niedrigen Abscherstressses [99], [100].

Eine zentrale Rolle im Kalzifizierungsprozess spielen die interstitiellen Zellen in der Matrix der Herzklappen (VIC). Es wurde eine VIC-Subpopulation mit Osteoblasten-ähnlichen Eigenschaften identifiziert, die *in vitro* in der Lage ist, spontan kalzifizierende Knötchen zu formen [101]. Die VIC stellen eine heterogene Zellgruppe dar und kommen in verschiedenen Phänotyp-Ausprägungen

vor. Embryologisch stammen sie von Endokardzellen ab, die sich mesenchymal differenzieren. Sie spielen eine wichtige regulatorische Rolle in der Immunantwort und in der Produktion von Extrazellulärmatrix. So sind einige von ihnen in der Lage, Matrixbestandteile wie Kollagen, Elastin, Proteoglykane und Fibronectin oder Wachstumsfaktoren und Zytokine zu produzieren. Teilweise sind die VIC auch befähigt zur Kontraktion. Sie enthalten kontraktile Proteine aus Herz- und Skelettmuskulatur. Die VIC selbst sind im Gegensatz zu den Endokardzellen nicht immunogen. Deswegen wurden sie für die Forschung im *Tissue Engineering* interessant [102]. Entsprechend einer Charakterisierung als aktivierte Myofibroblasten exprimieren die VIC degenerativ veränderter Herzklappen sowohl die mesenchymalen Intermediärfilamente Vimentin und Desmin als auch das kontraktile Filament α SMA, das typischerweise in glatter Gefäßmuskulatur vorkommt. In degenerativ veränderten Aortenklappen wurde zusätzlich die Expression größerer Mengen kataboler Enzyme, wie zum Beispiel Matrix Metalloproteinasen (MMPs), durch die VIC beobachtet. Unter anderem deshalb wird den VIC eine wichtige regulatorische Rolle im Matrixremodeling im Rahmen der Degeneration zugeschrieben [103]. Zu den Substraten der MMP zählen unter anderem Kollagentypen, Elastin und Fibronectin [104]. Im kalzifizierungsanfälligen Matrixprotein Elastin scheint die Kalzifizierung immer mit einer vermehrten Proteasenaktivität von MMP-2 und MMP-9 einherzugehen [105], [106]. Eine vermehrte Expression dieser beiden MMP wurde sogar als genereller Biomarker für einen pathologischen Gewebsumbau der Matrix, wie er in degenerativ veränderten Aortenklappen beobachtet wird, vorgeschlagen [107]. Die Proteinase nehmen also zentral am Umbau der Extrazellulärmatrix in der Entwicklung einer Aortenklappenstenose teil. Sie werden außer von den VIC auch von Makrophagen exprimiert und spielen auch eine mögliche Rolle in der Anregung zur Monozytenmigration [108]. Unter Einfluss von durch Makrophagen ausgeschüttete Zytokine wie TNF α scheinen vor allem oxidierte LDL-Lipoproteine die MMP-Produktion der Makrophagen anzuregen, wohingegen HDL einen gegenteiligen Effekt zeigt [90]. Auch eine größere Menge MMP-12-positiver Zellen wurde in der Aortenklappenstenose beobachtet. MMP-12 ist insbesondere für den Abbau elastischer Fasern verantwortlich, was, wie zuvor schon erwähnt, eine Kalziumdeposition fördert [109]. Auch in atherosklerotischen Plaques werden MMP-2 und MMP-9 vermehrt exprimiert. Durch ihre proteolytische Wirkung gelten sie insbesondere als eine Ursache für die Instabilität ausgeprägter Plaques. Sie scheinen grundlegend involviert in die Migration glatter Muskelzellen [110]–[112]. Einen Fokus zeigt die Verteilung der MMP-positiven Zellen in der Neointima [113].

Ferner wird einer durch die Plaquebildung und das *Remodeling* des Gewebes ausgelösten Hypoxie ein Beitrag in der Pathogenese der Atherosklerose zugeschrieben. Die Hypoxie kommt unter anderem durch die Hochregulation Hypoxie-induzierbarer Faktoren (HIF) innerhalb der Zellkerne von Makrophagen und glatten Muskelzellen in Grenzbereichen zum nekrotischen Areal einer atherosklerotischen Plaque zum Vorschein. Der Transkriptionsfaktor HIF1 α nimmt an der Pathogenese der Atherosklerose teil, indem er an der Regulation der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und des Lipidmetabolismus beteiligt ist. Des Weiteren sorgt eine Hochregulation von HIF1 α für eine vermehrte Expression angiogenetischer Faktoren [114].

Osteochondrogene Transformation

Es wird schon seit längerem beobachtet, dass die Pathogenese der Atherosklerose auch Gemeinsamkeiten mit der Osteogenese im Knochen aufweist. Chemische Analysen der Kalzifizierungskonglomerate, die aus atherosklerotischen Plaques isoliert wurden, deckten auf, dass sie zum Großteil aus anorganischen Kalziumsalzen (Hydroxylapatit) bestehen, welche auch

den wichtigsten Baustein der mineralisierten Knochenmatrix darstellen [115]. Atherosklerotische Läsionen weisen an Stellen fortgeschrittener Kalzifizierung eine morphologisch knochenähnliche Matrix auf. In diesen Läsionen wurde auch das Protein BMP-2 (*Bone morphogenic Protein Typ 2*) gefunden, welches physiologisch von Osteoblasten produziert und in der Knochenmatrix gespeichert wird. Es stellt einen wichtigen Faktor für die osteogene Differenzierung dar [116]. Kalzifizierende vaskuläre Zellen wurden identifiziert. Sie sind eine Subpopulation glatter Muskelzellen und weisen analog zu den VIC [101] unter Stimulation durch TGF β , das unter anderem von aktivierten Makrophagen im Rahmen eines Entzündungsprozesses synthetisiert wird, und 25-Hydroxycholesterol, das bekanntermaßen auch in atherosklerotischen Plaques zu finden ist, *in vitro* das Potential auf, kalzifizierende Knoten zu induzieren. Zudem zeigen sie ebenfalls eine osteogene Differenzierung mit einer Hochregulation osteochondrogener Gene wie Osteopontin (OPN) [117]. Auch in Herzklappen fallen phänotypisch osteoblastenartige Zelle auf [118]. Es konnte in Regionen hochgradiger dystropher Kalzifizierung ein aktiver Knochenumbau, der dem des Lamellenknochen gleicht, und teilweise eine enchondrale Ossifikation beobachtet werden. Es wurde nachgewiesen, dass BMP-2 und -4 in Regionen, in denen auch eine Lymphozyteninfiltration auffiel, von den VIC exprimiert wurde, die somit Eigenschaften sowohl von Myofibroblasten als auch von Präosteoblasten aufweisen [119].

Ein wichtiger Regulator der enchondralen Ossifikation ist das Protein Syndecan-3, das während der proliferativen Phase und der Reifung der Chondrozyten hochreguliert wird [120]. Auch der von glatten Muskelzellen exprimierte osteogene Transkriptionsfaktor RUNX2 reguliert eine vaskuläre Kalzifizierung und fördert die Makrophageninfiltration in die Gefäßläsionen sowie die Bildung osteoklastenartiger Zellen [121]. Zwei etablierte Biomarker für eine enchondrale Ossifikation sind die Knochenmatrixproteine Osteopontin und Osteocalcin (OCN). Das proosteochondrogene Osteopontin ist physiologisch in mineralisierten Geweben wie dem Knochen ein wichtiger Regulator der Mineralisation. Es inhibiert das Apatitkristallwachstums und induziert eine zelluläre Mineralresorption. Auch das von Osteoblasten synthetisierte Protein Osteocalcin, das im Knochen die Knochenbildung limitiert, ohne die Mineralisation oder die Resorption zu beeinflussen, stellt einen guten Biomarker für differenzierte Osteoblasten und wichtigen bestimmenden Faktor der Knochenbildung dar. Beide Faktoren werden nach Endothelverletzungen vermehrt in atherosklerotischen Plaques und kalzifizierten Aortenklappen exprimiert [118], [122]–[128]. Auch in Kaninchen, in denen alimentär eine vaskuläre Degeneration provoziert wurde, konnte eine vermehrte Osteopontinexpression der Neointima nachgewiesen werden. Dem Osteopontin wird eine regulierende Rolle in der Kalziumantwort unter Einfluss von oxidativem Stress zugeschrieben [129].

Es ist bisher nicht bekannt, ob die osteochondrogene Transformation ein unabhängiges Ereignis oder einen wichtigen Schlüsselvorgang in der kardiovaskulären Degeneration darstellt. Es wird weiterhin diskutiert, ob die Kalzifizierung einen Trigger für die Transformation der Zellen oder umgekehrt die transformierende Zelle ursächlich für eine Kalzifizierung ist. Man konnte nachweisen, dass die Arterienwandzellen ein pluripotentes Entwicklungspotential besitzen und sich unter anderem zu Knorpelzellen und glatten Muskelzellen differenzieren können [95]. Kürzlich bekräftigte eine weitere *in vitro* Studie die Hypothese, dass kalzifizierte Strukturproteine wie Elastin eine osteochondrogene Transformation glatter Gefäßmuskelzellen stimulieren [130].

1.2.2. Strukturelle Degeneration von Bioprothesen

Die Ähnlichkeiten zwischen der nativen Aortenklappensklerose und der vaskulären Atherosklerose wurde bereits zuvor angesprochen. Es existieren auch einige Ähnlichkeiten mit der Degeneration von Bioprothesen, die in einem Versagen des Implantates resultiert. Ein auffälliger Schlüsselvorgang in der strukturellen Degeneration von Bioprothesen ist deren ausgeprägtere Kalzifizierung, die zu unbeweglicheren Klappensegeln und einer resultierenden Stenose, sowie zu Einrissen des Gewebes und einer resultierenden Insuffizienz führt. Diese Kalzifizierung geht von den residuellen avitalen Zellen des Implantates aus. Sie wird begünstigt durch mechanisch verursachte Membranschäden, die zu einem vermehrtem Kalziumeinstrom in die Zellen, sowie einen mangelndem Kalziumausstrom führen. Der mangelnde Kalziumausstrom wird durch eine nicht mehr vorhandene Pumpfunktion der Zellen und Kristallbildung des überschüssigen Kalziums durch mangelnde inhibitorische Faktoren in dem avitalen Gewebe hervorgerufen. Die so resultierende Kalzifizierung tritt verstärkt bei bestimmten Fixierungsarten des Gewebes und vermehrtem mechanischen Stress auf [23]. Auch erhöhte Serumcholesterinlevel wurden als wichtiger klinischer Risikofaktor für eine beschleunigte Kalzifizierung von Bioprothesen und dadurch sehr frühe Notwendigkeit einer Reoperation identifiziert. Vor allem Rauchen, Diabetes mellitus, generell das metabolische Syndrom und das weibliche Geschlecht wurden in der Mehrheit der Fälle großer retrospektiver Studien als unabhängige Risikofaktoren für eine beschleunigte Degeneration von Bioprothesen mit Insuffizienz und Klappensegelverdickung identifiziert [55], [131]. Es existieren jedoch widersprüchliche Daten in Bezug auf das Geschlecht, das Rauchen und die Komorbiditäten Hypertension und Diabetes [132]. Vor allem bei Patienten, die zum Implantationszeitpunkt jünger sind, fallen ähnliche Risikofaktoren für eine Reoperation wie bei der Atherosklerose auf [131]. Auch ein Nierenversagen, bei dem die Regulation des Elektrolythaushaltes gestört ist, ist mit einem früheren Implantatversagen assoziiert [55].

Neben der Avitalität des Bioprothesengewebes und der mangelnden Fähigkeit zur Regeneration gilt eine sich anpassende Immunantwort gegen das Fremdgewebe als zentrale auslösende Ursache für das Versagen der Bioprothesen. Zwar kommt es nicht zu einer Abstoßungsreaktion im gleichen Ausmaß wie bei der Transplantation vitaler Organe, so dass eine Immunsuppression nötig wäre, aber in verschiedenen tierexperimentellen Studien weisen die histologischen Veränderungen innerhalb von Allografts auf eine Immunantwort hin, die als ursächlich für den Schaden des Allograftgewebes angenommen wird. In geschädigten Arealen zeigt sich eine vermehrte Ansammlung CD4- und CD8-positiver Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten. Diese Befunde gehen mit einer Antigenpräsentation über die MHC-Zelloberflächen-Rezeptoren der Klasse I oder II und Endothelzelluntergang in den entsprechenden Arealen einher [133]. Bei immundefizienten Tieren und syngener Transplantation fällt eine solche Reaktion im Vergleich dazu nicht auf. Es wurde zusätzlich eine Infiltration mit CD43- und CD3-positiven Zellen beobachtet, die mit einer Verdickung der Klappensegel und einer Zerstörung der Segel und damit dem strukturellen Versagen assoziiert ist [134]. Auch im Serum humaner Empfänger eines Allografts fallen IgG-Antikörper gegen Spender-spezifische humane Leukozytenantigene und eine empfängereigene T-Zell-Reaktion spezifisch gegen Spender-Lymphozyten auf [135].

Zudem wurden Antikörper gegen zellgebundene Oberflächenantigene in den Empfängern von Bioprothesen nachgewiesen. Im Fall von Allografts wenden sich diese Antikörper gegen die Spender-spezifische HLA (*human leukocyte antigen*) Klasse 1, die sich auf allen Zellen des Spenderorganismus befindet, und es wird eine breit gefächerte humorale Immunantwort

beobachtet. Hohe Antikörper-Titer und ein Zustand nach Zweitoperation mit der entsprechenden Sensitivierung zeigen ein besonders hohes Risiko dafür [136]. Im Fall von Xenografts stellt das α -Gal-Epitop (Galaktose- α -1,3-galaktose) das entsprechende Oberflächenantigen dar. Dieses wird verantwortlich gemacht für eine Immunreaktion des Empfängers gegen ein xenogenes Spenderorgan und kommt in allen Säugetieren, was das Schwein als Spender eines Xenografts einschließt, außer den Primaten, was den Menschen als Empfänger eines Xenografts einschließt, vor. Das immunogene α -Gal-Epitop wurde auf den avitalen Fibrozyten innerhalb von porcinen Bioprothesen nachgewiesen. Zusätzlich zeigt sich im entsprechenden Empfänger eine signifikante Erhöhung von Antikörpern der Klasse IgM und eine erhöhte Zytotoxizität gegen α -Gal, was einer Xenograft-spezifischen Immunantwort entspricht [137]. Es wurden auch α -Gal-spezifische IgG-Antikörper im Serum der Empfänger eines Xenografts 3 Monate nach Implantation gefunden, die eine spezifische humorale Immunantwort verstärken [138]. Die Anti- α -Gal-Antikörper scheinen im direkten Anschluss an die Implantation im Serum erniedrigt zu sein. Es folgt ein schneller, aber vorübergehender Anstieg der spezifischen IgM-Antikörper und ein längerer, aber langsamerer Anstieg spezifischer IgG-Antikörper [139].

Nicht mit der Kalzifizierung kolokalisierte Areale, in denen ein Untergang von Kollagenfasern nachweisbar ist, weisen zudem darauf hin, dass auch ein nichtkalzifizierender, am ehesten durch mechanische Belastung ausgelöster Strukturschaden ursächlich zum Implantatversagen beiträgt [140].

Histologisch fällt eine Auflösung der Kollagenfasern und eine Kolokalisation dieses Prozesses mit einer Makrophageninvasion in der Nähe von Rissen und Perforationen der Klappensegel auf, sowie auch eine extrazelluläre Kalziumkristallbildung zwischen den Kollagenfasern [141]. Es kommt nicht nur zu einer dystrophen Kalzifizierung und zu nicht-Kalzium-bedingten Rissen der Segel des Implantates, sondern auch zu Lipideinlagerungen, die auf einen lipidvermittelten Entzündungsprozess hindeuten, der zur Degeneration führt. Eine Betonung der Mineralisation mit punktförmiger Kalzifizierung fällt vor allem in den Kommissuren der Klappensegel auf. Der Großteil der Bioprothesen zeigt bei Explantation Akkumulationen von Lipidtröpfchen und lipidbeladene Makrophagen. Dies ähnelt dem Befund bei Atherosklerose und Aortenklappenstenose [142]. Auch in den Bioprothesen wird in den Klappensegeln ein bedeutender Anteil oxidierten LDLs an den Ablagerungen festgestellt, die kolokalisiert sind mit dichtem inflammatorischen Infiltrat, Schaumzellen und erhöhter MMP-9, die zur Matrixdegeneration, zur Degeneration von Kollagenfasern und darauf folgendem Riss der Klappensegel der Prothese beiträgt [143].

1.3. Experimentelle Akzeleration der kardiovaskulären Kalzifizierung

Zuvor wurde die Notwendigkeit eines Kleintiermodells zur akzelerierten kardiovaskulären Kalzifizierung erläutert und ausführlich auf die Pathogenese und die histologischen und biologischen Veränderungen der kardiovaskulären Degeneration eingegangen. Um eine solche akzelerierte, kalzifizierende Degeneration am Kleintier imitieren beziehungsweise beschleunigen zu können, ist es für die Modellentwicklung nötig, herauszustellen, welche Möglichkeiten der Beeinflussung es gibt und welche davon bisher bereits beschrieben wurden.

1.3.1. Nicht-alimentäre Arten der Beeinflussung kardiovaskulärer Kalzifizierung

Häufig verwendete nicht-alimentäre Tiermodelle der kardiovaskulären Degeneration beruhen auf der genetischen Manipulation der Versuchstiere. Insbesondere Tiermodelle der Atherosklerose

wurden in diesem Bereich in der näheren Vergangenheit erforscht, wobei jedes davon Limitationen aufweist und keines eine ideale Imitation der humanen Atherosklerose darstellt [144].

Dabei stellen das wahrscheinlich am weitesten verbreitete Modell zur Erforschung der Atherosklerose die Apolipoprotein-E (ApoE)-defiziente Maus dar. Bei diesen ApoE-Knockout (ApoE-KO)-Tieren wird durch die Deletion des ApoE-Gens durch Cholesterin-angereicherte Nahrung eine ausgeprägte Hypercholesterinämie erzielt, in deren Folge es zu einer spontanen Bildung atherosklerotischer Plaques kommt [145], [146]. Dieses Modell ermöglicht es, alle Stadien der humanen Atherosklerose zu imitieren. Die Prädilektionsstellen beinhalten die Aortenwurzel, den absteigenden Aortenbogen, die Hauptabgänge der Aorta inklusive der Aortenbifurkation, die Pulmonalarterien sowie die Karotiden [147]. Zudem wurde eine erhöhte Flussgeschwindigkeit über der Aorten- und der Mitralklappe bei ApoE-KO-Tieren beobachtet [148]. Diese Methode stellte sich also als ein äußerst hilfreiches Werkzeug in der Erforschung der Pathogenese der Atherosklerose dar. Es handelt sich jedoch auch hier um ein nicht ideales Abbild der Atherosklerose und um ein unvollständiges Modell der Degeneration in Betrachtung des kardiovaskulären Systems im Gesamten. Bei den ApoE-KO-Tieren werden pathologische Veränderungen der Herzkranzgefäße auch unter cholesterinreicher Diät nicht ausreichend dargestellt [147], [149]. Insbesondere die Aortenklappenkalzifizierung wird durch die gängigen KO-Modelle der Atherosklerose auch nicht gut abgebildet. So zeigen zum Beispiel ApoE-KO-Tiere in kurzen Beobachtungszeiträumen kaum eine Kalzifizierung der Klappentaschen, sondern nur der Ansätze [147] und erst senile Tiere entwickeln eine mit dem Menschen vergleichbare Sklerose [150].

Auch die Tiermodelle, welche die Aortenklappensklerose fokussieren und denen eine genetische Veränderung des Versuchstieres zu Grunde liegt, beruhen auf einer vermehrten Gewichtung der bekannten Risikofaktoren, da kein einzelnes für die Entstehung einer Klappensklerose verantwortliches Gen bekannt ist. Somit stellen auch diese kein ideales Abbild der menschlichen Pathologie dar [151]. Zudem ist eine Kombination verschiedener Krankheitsmodelle mittels eines KO-Systems zeitaufwändig und teuer, da erst die Züchtung von Doppel- oder Tripple-KO-Tieren nötig wäre.

Als weitere nicht-alimentäre Alternativen der Induktion einer kardiovaskulären Degeneration sind chirurgische Prozeduren [152], infektiöse Agenzien [153] oder eine pharmakologische Beeinflussung [154]–[156] von Versuchstieren denkbar. Keines dieser Modelle erscheint jedoch geeignet, eine Kalzifizierung des gesamten kardiovaskulären Systems, und dies ohne verzerrende Nebeneffekte, im Tiermodell optimal abzubilden. Von daher scheint es gerechtfertigt nach Alternativen zu suchen. Auch aus rein praktischen Überlegungen heraus bietet sich ein alimentäres Modell an, das nicht nur preisgünstiger ist als die aufgeführten Alternativen, sondern auch einfach eine Kombination verschiedener Krankheitsmodelle und sogar eine Regulation des Schweregrades der Kalzifizierung über die Futterdosis ermöglicht.

1.3.2. Alimentäre Möglichkeiten der Beeinflussung kardiovaskulärer Kalzifizierung

Die alimentäre Induktion und Akzeleration der kardiovaskulären Kalzifizierung beruht weitestgehend auf der vermehrten Exposition durch bekannte Risikofaktoren, insbesondere der Hyperkalzämie und der Hypercholesterinämie.

Durch ein gemeinsames Löslichkeitsprodukt sind die Kalzium- und Phosphatlevel im Serum eng miteinander verknüpft. Insbesondere erhöhte Serum-Phosphatlevel, wie sie zum Beispiel bei niereninsuffizienten Patienten beobachtet werden können, werden deshalb für vermehrte intra- und extrazelluläre Kalziumablagerungen mitverantwortlich gemacht [157]. Eine Hyperphosphatämie gilt als Stimulus für eine Mineralisation glatter Muskelzellen in Gefäßwänden bis hin zur osteochondrogenen Transformation [124] und wurde als Risikofaktor für die Kalzifizierung von Aortenklappensegeln, Aortenklappenansatzring und Mitralklappenansatzring identifiziert [158].

Eine Hauptrolle in der endokrinologischen Beeinflussung der Mineralisation, wie sie physiologischerweise im Skelett benötigt wird, aber wie oben dargestellt auch im kardiovaskulären System im Rahmen der Degeneration vorkommen kann, spielt das Vitamin D, welches über die Nahrung aufgenommen oder endogen unter Einfluss ultravioletter Strahlung in der Haut synthetisiert und in der Niere aktiviert wird. Es hebt über eine Förderung der Kalzium-Reabsorption der Nieren und der Kalzium- und Phosphatresorption im Darm sowohl die Serumkalzium-, als auch die Serumphosphatspiegel. Es wird angenommen, dass sehr hohe Vitamin D-Spiegel und die dadurch vermittelte Hyperphosphatämie und Hyperkalzämie zentral zur vaskulären Kalzifizierung beitragen, aber moderate Vitamin D-Dosen über eine Modulation der Immunantwort auch protektive Effekte haben können [159].

Dass auch ein gestörtes Lipoproteinprofil und das metabolische Syndrom Risikofaktoren für eine verstärkte kardiovaskuläre Kalzifizierung sind, wurde bereits zuvor erläutert. Auch diese Faktoren sind über alimentäre Veränderungen beeinflussbar.

1.3.3. Alimentäre Beeinflussung der kardiovaskulären Kalzifizierung im Tierexperiment

Genetisch nicht veränderte Mäuse zeigen keine Tendenz zu atherosklerotischen Veränderungen. Zudem ist die genetische Veränderung von Mäusen in der Forschung gut etabliert. Daher existieren keine aktuellen reinen Futterstudien an Mäusen zu dieser Thematik. Bestimmte Stämme erwiesen sich unter einer lipidreichen Diät als anfälliger für das Auftreten von Läsionen an der Aortenwurzel und den Aortenklappen [160], [161]. Diese Zusammenfassung soll sich aber auf Tiere konzentrieren, die nicht genetisch durch ein höheres Risiko vorbelastet sind.

Bereits seit Jahrzehnten wird eine Kombination aus Cholesterin und Vitamin D zur alimentären Induktion einer Atherosklerose im Tierversuch verwendet. Hass et al. provozierten bereits Anfang der 1960er Jahre in den Arterien von Kaninchen mit einem cholesterinhaltigen Futterzusatz und einem Provitamin des Vitamin D nicht nur eine Kalzifizierung der Media und Intima, sondern auch intimale Lipidablagerungen. Es wurden zudem phänotypisch hyalinoide Zellen, Schaumzellen, eine Veränderung der Struktur von Kollagen und elastischen Fasern sowie eine Proliferation von Fibroblasten und Endothel unter dieser Beeinflussung beobachtet [162]. Hekimian et al. zweifelten kürzlich an, dass Vitamin D und Cholesterin auch kalzifizierende Effekte auf die Aortenklappe haben, nachdem auch nach dreimonatiger Fütterung keine Aortenklappenkalzifizierung und keine funktionellen Einschränkungen, sondern nur eine Verdickung der Aortenklappensegel und eine Kalzifizierung der *Aorta ascendens* in Kaninchen beobachtet werden konnten [163]. Diesen Daten widersprechen jedoch andere aktuelle Studien von Drolet et al., denn hier zeigte sich eine Kombination aus Vitamin D und Cholesterin wirkungsvoll, sowohl im Vergleich zu einem reinen Cholesterin- als auch zu einem reinen Vitamin

D-Zusatz. Es konnten so nicht nur funktionelle Einschränkungen mittels Echokardiografie im Sinne einer Aortenklappenstenose mit einer Erhöhung des transvalvulären Druckgradienten und einer Herabsetzung der Öffnungsfläche der Aortenklappe, sondern auch histologisch die Induktion einer Aortenklappensklerose mit Kalziumablagerungen, T-Zell-Infiltrationen und α SMA-positiven Zellen, aber ohne eine Makrophageninvasion beobachtet werden [164], [165].

Ngo et al. zeigten auch eine ausschließliche Supplementation von Vitamin D in hohen Dosen als ausreichend, in Kaninchen Veränderungen zu induzieren, die denen der humanen Aortenklappenstenose gleichen. Histologisch und immunhistochemisch konnten hier eine Einschränkung der Endothelfunktion, Lipidablagerungen, eine Klappenkalzifizierung und auch eine Makrophageninfiltration nachgewiesen werden. Funktionell zeigte sich hier eine Erhöhung des transvalvulären Druckgradienten [166].

Ebenso scheint eine ausschließliche Hyperlipidämie ohne den Zusatz von Vitamin D in der Lage zu sein, eine Aufnahme der Lipide in das Gewebe von Kaninchenaortenklappen zu induzieren. Diese beobachteten Vasile et al. bereits vor über 20 Jahren in einem Tiermodell vorwiegend in den Klappenregionen, die sich als für Läsionen anfällig erwiesen [167]. Nievelstein-Post et al. untersuchten die endotheliale Lipidaufnahme in den Aortenklappen hypercholesterinämischer Kaninchen ebenfalls und beobachteten eine subendotheliale Ablagerung von Lipoproteinen in der extrazellulären Matrix der zur Aorta gewandten Seite der Aortenklappe, die mit den Kollagenfasern assoziiert war [168]. Die Hypercholesterinämie scheint zudem in der Lage, eine vermehrte Apoptoserate in den Aortenklappen der Tiere zu induzieren, wie Rajamannan et al. zeigten [169]. Durch dieselbe Forschungsgruppe wurden zudem erhöhte Entzündungswerte, Makrophageninfiltrate und eine vermehrte Expression von Knochenmatrixproteinen sowie Zellen mit einem osteoblastenähnlichen Phänotyp in den Aortenklappen hypercholesterinämischer Tiere und hochregulierte Genen des Knochenstoffwechsels beobachtet. Die Läsionen fielen hier, wie bei der nativen Aortenklappensklerose am Menschen, verstärkt an der Basis der Segel auf [94]. Auch Cimini et al. bestätigten diese Beobachtungen bei der Entwicklung eines Kaninchen-Aortenklappensklerosemodells, bei dem durch Cholesterinzusatz des Futters Veränderungen erzielt wurden, die denen der humanen Aortenklappensklerose ähneln. Es wurden hier nicht nur eine Aortenklappenverdickung, Lipidablagerungen, Makrophageninfiltrate, eine veränderte Kollagenstruktur und eine Hochregulation von Osteopontin induziert, sondern auch atherosklerotische Läsionen der Aorta provoziert [170]. Die Lipideinlagerungen in die Aortenklappe von Kaninchen nach einer cholesterinlastigen Diät wurden auch von Zeng et al. während ihrer Untersuchungen beobachtet [171]. Eine induzierte Kalzifizierung der Gewebe wird allerdings in keiner der Studien mit einem reinen Lipidzusatz des Futters erwähnt.

Wie Mäuse weisen auch native Ratten eine gewisse Resistenz gegenüber der Entwicklung einer Atherosklerose auf. Zudem ist ihr Lipidmetabolismus hauptsächlich auf HDL ausgerichtet im Gegensatz zum LDL beim Menschen, was zu dieser Resistenz beitragen könnte [172]. Aus diesen Gründen wurde hier in Futterstudien oft auf die zusätzliche Induktion von Nebenerkrankungen wie einer Hypothyreose oder einer Niereninsuffizienz [173], [174] zurückgegriffen. Die Mehrheit der Futterstudien an nativen Ratten hat sich bisher auf die kalzifizierende Degeneration der Aorta fokussiert, wohingegen eine alimentär induzierte Kalzifizierung der Aortenklappe von Ratten kaum beschrieben wurde, sondern am Kaninchen deutlich umfassender untersucht worden ist. In einer Studie, die die Aortenklappe von Ratten untersuchte, erfassten Roosens et al. Vitamin-D-

dosisabhängig eine Kalzifizierung der Aortenklappe, der Aorta ascendens und des Myokardiums sowie eine Verringerung der Klappenöffnungsfläche der Aortenklappe, wobei das Vitamin D hier nicht als Nahrungszusatz gegeben sondern subkutan injiziert wurde [175]. Shuvy et al. zeigten echokardiographisch und immunhistologisch, dass eine Hochdosis-Phosphat-Fütterung bei niereninsuffizienten Ratten mit einem sekundären Hyperparathyreodismus in der Lage ist, eine Aortenklappenkalzifizierung zu provozieren. Es wurden Osteopontin, einige Makrophagen und eine Hochregulation proosteogener Gene beobachtet [173]. Wu-Wong et al. postulierten im Rahmen eines weiteren Ratten-Niereninsuffizienz-Modells, dass eine Hyperphosphatämie alleine *in vivo* keine kalzifizierende Wirkung auf die Gefäße zeige, die Gabe eines Vitamin D-Analogons aber in einer Kalzifizierung der Aorta resultiere. *In vitro* zeigte sich der kalzifizierende Effekt des Vitamin D allerdings nur unter einer Zugabe von Phosphat reproduzierbar [174]. Die prokalzifizierende Wirkung von Vitamin D wurde durch Tang et al. auch in einem Rattenmodell insbesondere in Kombination mit einer hohen Dosis Cholesterin gezeigt. Mehr als ein alleiniger Zusatz von Vitamin D induzierte die Kombination Kalziumablagerungen in den Arterien der Tiere. Es wurden auch oxidiertes LDL und Superoxidanionen im Serum der Tiere nachgewiesen, was die Hypothese bekräftigt, dass oxidativer Stress in der Pathogenese eine Schlüsselrolle spielt [176].

Somit scheint eine Kombination aus atherogenen und kalzifizierenden Faktoren zur alimentären Induktion einer kalzifizierenden Aortenklappensklerose im Tiermodell notwendig zu sein. Der Effekt auf die kalzifizierende Degeneration von Aortenklappen nativer Ratten war bisher nicht Gegenstand tiefgehender, umfassender Nachforschungen.

2. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es ein Modell in der Ratte zu entwickeln, das mittels alimentärer Beeinflussung von Wildtyp-Tieren eine akzelerierte kardiovaskuläre Kalzifizierung erzielt. Dieses Modell soll dazu dienen, in der Folge neue Ansätze bei der Entwicklung von kardiovaskulären Prothesen *in vivo* vergleichen und bewerten zu können, aber auch die zur Kalzifizierung von Implantaten führenden Prozesse näher untersuchen und potenziell protektive Maßnahmen testen zu können.

Zur Entwicklung eines solchen Modells ist es nötig, verschiedene prokalzifizierende Futterzusammensetzungen im Hinblick auf Kalzifizierung im kardiovaskulären System zunächst am genetisch nicht veränderten Tier ohne Implantate zu bewerten. Eine Kombination aus atherogenen und kalzifizierenden Faktoren scheint zur alimentären Induktion einer kardiovaskulären Degeneration im Tiermodell notwendig. Es sollen daher die Auswirkungen verschiedener Kombinationen und Dosen von Vitamin D, Dikalziumphosphat und Cholesterin bewertet werden. Über die verschiedenen Futterkomponenten könnte sogar die Ausprägung verschiedener Aspekte der Degeneration „nach Bedarf“ beeinflusst werden.

Die so artifiziell durch Futterapplikation im Wildtyp-Tier induzierten Prozesse sollten der kalzifizierenden Degeneration von Herzklappen- und Gefäßimplantaten möglichst ähnlich sein, aber auch dem Vergleich mit Pathologien wie der Atherosklerose oder der Aortenklappensklerose standhalten. Die weiteren Anforderungen an das Modell sind:

- die Darstellung der Kalzifizierungsprozesse in relativ kurzen Zeiträumen.
- eine kontrollierte Kalzifizierung.
- reproduzierbare Ergebnisse.
- eine weitestmögliche Schonung des Versuchstieres. Eine übermäßige Kalzifizierung außerhalb des kardiovaskulären Systems, beispielsweise im Skelett, sollte vermieden werden

Aus all diesen Anforderungen ergeben sich die entsprechenden Fragestellungen, die sich bei der Findung der idealen Futtermischung für die genannten Zwecke stellen. Um deren Beantwortung umfassend zu gewährleisten, müssen die Effekte mittels histologischer, immunhistologischer und molekularbiologischer Methoden beurteilt werden.

Der Fokus dieser Arbeit liegt dabei auf der Kalzifizierung der Aortenklappe und der Aorta. Inwiefern die verschiedenen weiteren Aspekte der Degeneration, die zuvor bereits ausführlicher dargestellt wurden, insbesondere der Endothelveränderung, der Inflammationsprozesse, der Lipidablagerungen und der osteochondrogenen Transformation, genauer durch die einzelnen Futterkomponenten beeinflusst werden, muss herausgestellt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Studienaufbau

Eine Wistar-Ratten-Population von insgesamt 102 Tieren wurde randomisiert in 6 Futtergruppen eingeteilt. Bei einer dieser Gruppen handelte es sich um eine Kontrollgruppe, die mit herkömmlichem Standardfutter (Normalfutter) gefüttert wurde. Die übrigen 5 Gruppen bekamen unterschiedliche Futtermischungen, bei denen das Standardfutter der Normalfuttergruppe mit prokalfizierenden Zusätzen verschiedener Dosierungen versetzt wurde:

- Gruppe Ctrl (Normalfutter), n = 19
- Gruppe V (Volldosis-Härtefutter): Mit 300.000 IE/kg Vitamin D₃ (VD), 1,5 % Dikalziumphosphat (DCP, Ca₂HPO₄) und 2 % Cholesterin, n = 19
- Gruppe H (Halbdosis-Härtefutter): Mit 150.000 IE/kg VD, 0,75 % DCP und 1 % Cholesterin, n = 19
- Gruppe I: Mit 300.000 IE/kg VD und 1,5 % DCP (kein Cholesterin), n = 15
- Gruppe II: Mit 300.000 IE/kg VD und 2 % Cholesterin (kein DCP), n = 15
- Gruppe III: Mit 1,5 % DCP und 2 % Cholesterin (kein VD), n = 15

Je 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn der Futter-Applikation wurden jeweils 5 Tiere pro Futtergruppe euthanasiert und ihre Organe explantiert, um sie hinsichtlich der Kalzifizierung und Degeneration im kardiovaskulären System histologisch, immunhistologisch und molekularbiologisch auszuwerten. Darüber hinaus wurden nach 4 und 12 Wochen Artenexplantate aus je 2 Tieren der Futtergruppen Ctrl, V und H einer µCT-Untersuchung unterzogen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über den Studienaufbau.

Explantations- Zeitpunkt	Ctrl (Normal- futter)	V (Volle Dosis Härtefutter)	H (Halbe Dosis Härtefutter)	I (V ohne Cholesterin)	II (V ohne DCP)	III (V ohne VD)
4 Wochen	n=7	n=7	n=7	n=5	n=5	n=5
8 Wochen	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
12 Wochen	n=7	n=7	n=7	n=5	n=5	n=5

Tabelle 1: Übersicht über den Studienaufbau. Anzahl der Tiere pro Futtergruppe und Explantationszeitpunkt.

3.2. Tierhaltung

3.2.1. Haltungsbedingungen

Bei den Versuchstieren handelte es sich ausschließlich um männliche Wistar-Ratten. Das Gewicht der Ratten betrug zu Beginn der Fütterung 200-250 g. Sie wurden in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in konventioneller Tierhaltung gehalten und einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus mit 12 h-Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt. Die Temperatur betrug 22 ± 2 °C, die Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %. Pro Futtergruppe und Zeitpunkt wurden die Tiere in einem Käfig à 3 Tiere und 1-2 Käfigen à 2 Tiere gehalten. Die Käfige wurden täglich gereinigt. Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

3.2.2. In vivo erhobene Daten

Wöchentlich wurde bei 90 Ratten bis zum jeweiligen Explantationszeitpunkt das Gewicht bestimmt und bei jedem Käfig die gefressene Futtermenge durch Subtraktion der Futtergewichte zum Beginn und zum Ende der Woche ermittelt. Zum Explantationszeitpunkt wurde bei diesen Tieren vor der Tötung eine Echokardiographie durchgeführt und Blut zur Bestimmung der Serumwerte entnommen. Unmittelbar nach der Explantation wurde außerdem das Herzgewicht bestimmt.

3.3. Explantation

3.3.1. Narkose, Vorbereitung

Die Narkose wurde mittels eines mit Isofluran getränkten Wattetupfers in einer Glasglocke eingeleitet und über eine eigens angefertigte Inhalationsmaske mit 2,0-2,5 % Isofluran in O₂ aufrechterhalten. Zur systemischen Analgesie wurde 5 mg/kg Körpergewicht Carprofen intraperitoneal injiziert.

3.3.2. Echokardiographie

Der Thorax der Tiere wurde rasiert. Die Echokardiographie erfolgte bei allen Tieren durch denselben, in dieser Technik erfahrenen Untersucher. Folgende Parameter wurden erhoben: Linksventrikulärer innerer Durchmesser diastolisch und systolisch (LVIDd und LVIDs), die relative Verkürzung des linksventrikulären Durchmessers in der Systole im Vergleich zur Diastole (FS, *fractional shortening*), sowie die Flussgeschwindigkeit und der Druckgradient über der Aortenklappe (PG, *pressure gradient*). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) wurde im M-Mode nach Teichholz berechnet. Abbildung 1 stellt die Dokumentation dieser Messungen exemplarisch dar.

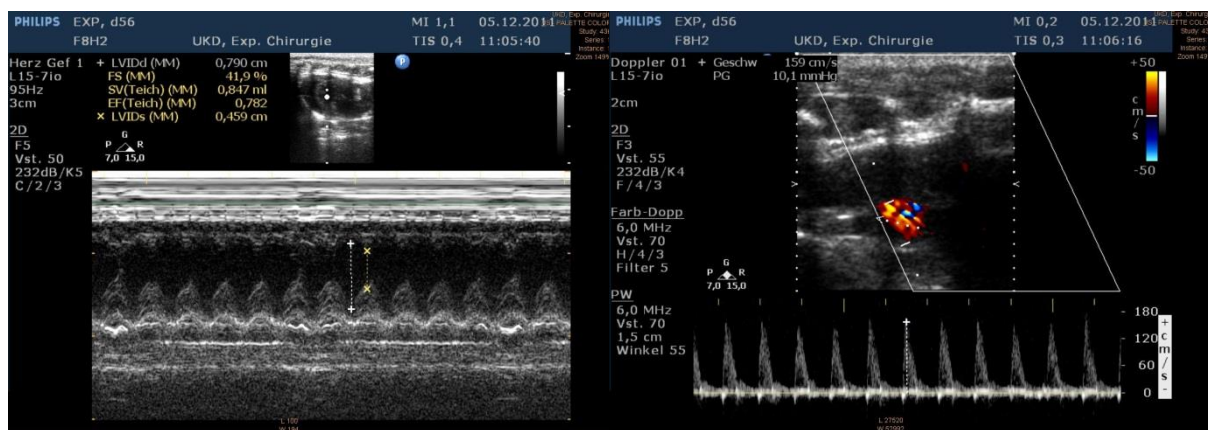


Abb. 1: Echokardiographie. Exemplarische Darstellung der Dokumentation anhand eines Halbdosis-Härtefutter-Tieres nach 8 Wochen Futterapplikation

3.3.3. Eröffnung, Blutentnahme

Es wurde eine Zwei-Höhlen-Eröffnung von thorakal beginnend durchgeführt. Durch eine linksventrikuläre Spritzen-Kanülierung wurden ca. 800 µl Blut entnommen und danach 1000 IE in 0,2 ml Heparin-Natrium injiziert. Diese Vorgänge werden in den Abbildungen 2 A und B dargestellt.

Um das Serum aus dem entnommenen Blut zu trennen, wurde das Blut 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Vorgang wurde mit dem Überstand wiederholt. Das so gewonnene Serum wurde bei -80 °C gelagert. Die Auswertung des Serums

erfolgte im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf nach den dort üblichen Standardprotokollen. Folgende Werte wurden bestimmt: Kalzium, anorganisches Phosphat, Kreatinin, Harnstoff, Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Triglyzeride, Glukose.

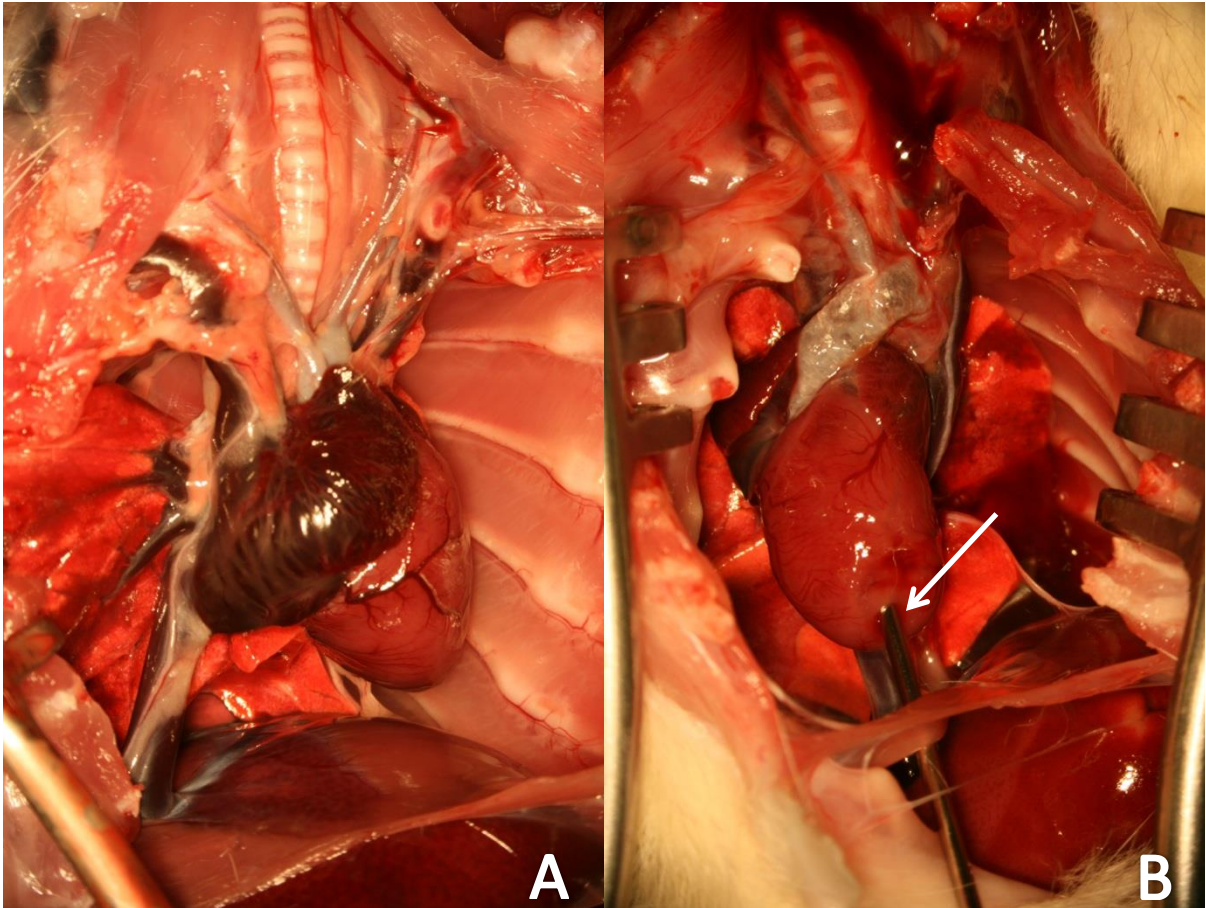


Abb. 2: Eröffneter Situs. Zwei-Höhlen-Öffnung (A) und kanülierter linker Ventrikel (B, Pfeil).

3.3.4. Organexplantation und Einbettung

Durch die bereits liegende linksventrikuläre Kanüle wurde das Gefäßsystem mit mind. 50 ml Infusionslösung (Jonosteril) vorsichtig gespült. Anschließend folgte eine rechtsatriale Inzision, sodass das Tier durch Blutentzug in Vollnarkose euthanasiert wurde. Unter größtmöglicher Gewebeschonung wurden der Aortenklappenring mit angrenzendem Myokard und die *Aorta ascendens* mit Aortenbogen bei 90 Tieren zur histologischen, immunhistologischen und enzymographischen Auswertung explantiert. Zusätzlich wurden die *Aorta descendens* und *abdominalis* für eine molekularbiologische Auswertung entnommen. Alle Präparate wurden möglichst schonend vom umliegenden Gewebe freipräpariert und vorsichtig mit NaCl gespült. Nach sorgfältiger Trocknung mittels Kompressen wurde das Myokardgewicht bestimmt.

Die Präparate zur histologischen Auswertung wurden zur Vorbereitung auf die Kryotomie mit Kryo-Einbettmedium eingedeckt. Diejenigen, die molekularbiologisch ausgewertet werden sollten, wurden in Mikroreaktionsgefäße gegeben.

Alle Präparate wurden mit Hilfe von Isopentan eingefroren. Das Isopentan wurde dazu zuvor durch flüssigen Stickstoff (N_2) gekühlt. Dabei wurde ein Gefäß mit Isopentan in ein größeres Gefäß mit Stickstoff getaucht, wie in Abbildung 3 dargestellt, bis es auf eine Temperatur kurz über

seinem Gefrierpunkt abgekühlt ist. Es ist wichtig, ein Auslaufen des Isopentans in den Stickstoff zu verhindern. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme und dem Eindecken in das kalte Isopentan überführt, sind nach etwa 1 min eingefroren und wurden anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.4. Klassische Histologie

Die histologische Auswertung beschränkte sich auf 3 Tiere pro Futtergruppe und Zeitpunkt. Bei der Kontrollgruppe mit Normalfutter wurden je 5 Tiere ausgewertet. Die Auswertung und Dokumentation der gefärbten Kryostatschnitte erfolgte mittels Lichtmikroskopie, beziehungsweise mittels Fluoreszenzmikroskopie bei den Immunfluoreszenzen und der *in situ* Zymographie.

3.4.1. Kryotomie

Von den in Kryo-Medium eingebetteten Organen wurden zur histologischen und immunhistologischen Färbung Kryostatschnitte angefertigt. Während des Kryotomierens wurde darauf geachtet, einheitliche, fest definierte Schnittebenen zu treffen. In jeder dieser Schnittebenen wurden Schnitte mit einer Dicke von $4\text{ }\mu\text{m}$ und solche mit einer von $6\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt.

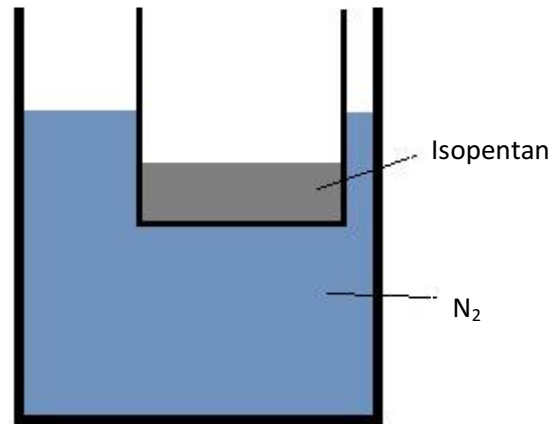


Abb. 3: Schematische Darstellung der Kühlung des Isopentans. Kleineres Gefäß Isopentan in größerem mit Stickstoff gefüllten Gefäß.

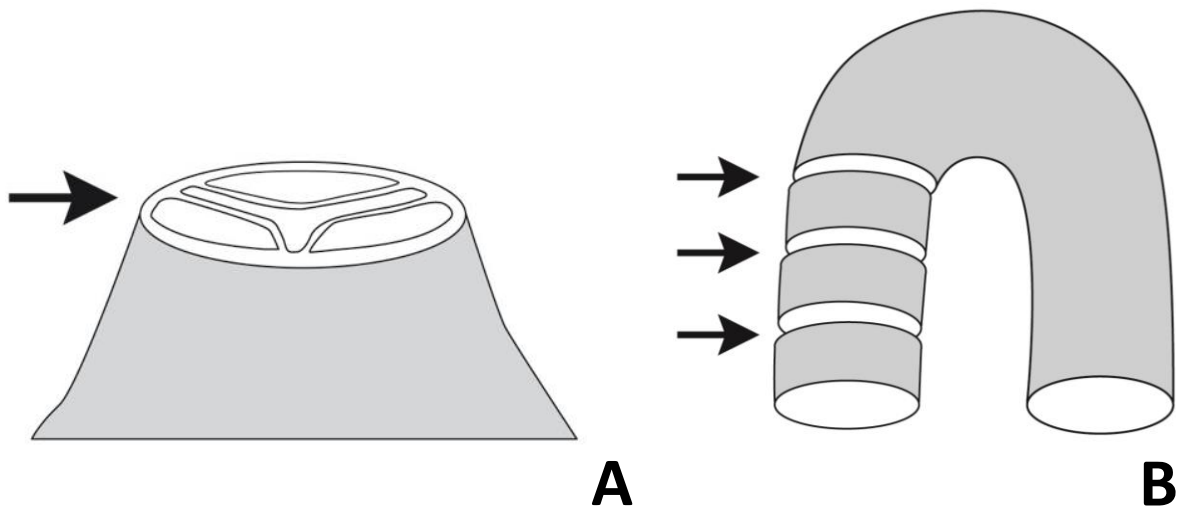


Abb. 4: Definierte Schnittebenen (Pfeilmarkierungen): Senkrecht zum Blutfluss auf Höhe des Aortenklappenrings (A) und jeweils drei innerhalb der *Aorta ascendens* (B) im Abstand von $200\text{ }\mu\text{m}$.

Bei den Aortenklappen befindet sich die Ebene auf Höhe der Klappenansätze senkrecht zum Blutfluss im Aortenring, wie Abbildung 4 A zeigt. Bei den Präparaten der *Aortae* sind drei Schnittebenen definiert worden, die in Abbildung 4 B dargestellt werden. Die erste Region befindet sich knapp unterhalb des Aortenbogens, sobald kein Lumen des Bogens mehr angeschnitten wurde, so dass die *Aorta ascendens* senkrecht zum Blutfluss ohne Aortenbogen angeschnitten werden konnte und sich ein kreisrundes Lumen auf den Schnitten sehen ließ. Die anderen beiden Schnittebenen folgen im Abstand von $200\text{ }\mu\text{m}$ herzwärts.

3.4.2. Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbung

In dieser Übersichtsfärbung werden azidophile Strukturen durch das saure Eosin rötlich und basophile durch den basischen Kernfarbstoff Hämatoxylin bläulich gefärbt, so dass das Zellplasma rosa-rötlich und die Zellkerne blauschwarz bis violett dargestellt werden.

Gefärbt wurden Kryotomschnitte einer Schnittdicke von 4 µm. Die Präparate wurden 1 min in Hämatoxylin angefärbt und daraufhin 1 min in Aqua dest gegeben. Es folgte 1 min in 5 % Eisessig, der danach ebenfalls 1 min in Aqua dest abgewaschen wurde, bevor die Schnitte 2 min in fließendem, sauberem Leitungswasser gebläut wurden. Anschließend wurden die Präparate 1 min in 70 % Ethanol dehydriert und 15 min in alkoholischer Eosin B Arbeitslösung leicht überfärbt. In einer aufsteigenden Ethanolreihe von 1 min in 70 % Ethanol und je zweimal 1 min in 96 % und 100 % Ethanol wurden sie weitestgehend entwässert und das überschüssige Eosin wurde entzogen. Das Ethanol wurde durch zweimaliges Waschen für 1 min in Xylol vollständig entfernt. Nach Lufttrocknung wurden die Präparate mit dem xylollöslichen synthetischen Einschlussmittel (Roti® Histokitt II) und einem Deckglas eingedeckt.

3.4.3. Von Kossa Versilberung

Die Färbung nach von Kossa ermöglicht eine Darstellung kalzifizierter Areale durch den Austausch von Kalzium in Carbonaten und Phosphaten durch Silberionen, die durch Bestrahlung zu sichtbarem, metallischem Silber reduziert werden. Diese Hydroxylapatit-Ablagerungen der Verkalkungsareale erscheinen dunkelbraun-schwarz. Durch eine Gegenfärbung mit Kernechtrot (*Nuclear Fast Red*) werden die Zellkerne zur besseren Übersichtlichkeit in einem kräftigen rötlichen Rosaton und das Zellplasma schwach rötlich angefärbt.

Diese Färbung wurde bei 6 µm Gewebeschnitten durchgeführt. Durch eine Umrandung der einzelnen Präparate mit einem wasserabweisenden Stift wurde es ermöglicht, 1 % flüssige Silbernitratlösung auf die Präparate auf horizontal liegenden Objektträger zu tropfen, ohne dass die Lösung verfloss. Die mit Silbernitrat bedeckten Schnitte wurden 30 min im Abstand von 5 cm durch eine 75 W Lampe bestrahlt und anschließend mehrfach mit Aqua dest abgewaschen. Es folgte eine 5minütige Inkubationszeit in 5 % Natrium Thiosulfat, das ebenfalls mit Aqua dest abgewaschen wurde. Durch 5 min in 0,1 % *Nuclear Fast Red* Lösung gelöst in 5 % wässriger Aluminiumsulfat Lösung wurden die Präparate gegengefärbt, bevor sie erneut in Aqua dest gewaschen und dann durch eine aufsteigende Ethanolreihe (1 min 70 % Ethanol, 1 min 96 % Ethanol, zweimal 1 min 100 % Ethanol, zweimal 1 min Xylol) entwässert und, wie die bei der HE-Färbung beschrieben, eingedeckt wurden.

3.4.4. Von-Kossa-Score

Zur systematischen Auswertung der Kalzifizierung wurde bei den nach von Kossa angefärbten Gewebeschnitten ein eigens entwickelter Bewertungs-Score angewendet, der in den Abbildungen 5 und 6 skizzenhaft veranschaulicht und im Folgenden näher erläutert wird. Er unterscheidet sich bei den einzelnen Organen:

Die Aorta ascendens wurde in 4 Quadranten unterteilt, die einzeln bewertet wurden. Dabei wurde jeder Quadrant mit einer Punktzahl von 0 bis 3 Punkten bedacht, so dass eine Minimalpunktzahl von 0 und eine Maximalpunktzahl von 12 Punkten erreicht werden konnte.

- **0 Punkte** entsprechen keiner sichtbaren Verkalkung.

- **1 Punkt:** Sobald minimalste Gewebe- oder Intimaverkalkungen bei einer 20fachen Vergrößerung im Lichtmikroskop auszumachen sind, wurde der Quadrant mit 1 Punkt bewertet.
- **2 Punkte:** Eine stärkere Verkalkung, die auch bereits in 5facher Vergrößerung imponiert, erhielt eine Bewertung von 2 Punkten.
- **3 Punkte:** Die Maximalpunktzahl erhielten die Regionen, bei denen die Verkalkungen so stark ausgeprägt waren, dass sie als Kalkschollen konfiguriert waren, die das native Gewebe verdrängten.

Der Aortenklappenring wurde auf Höhe des Ansatzes der Aortenklappen beurteilt. Die Klappensegel selber wurden nicht beurteilt, aber sofern beurteilbar bei Verkalkung unabhängig vom Score dokumentiert. Getrennt voneinander wurden jeweils der kommissurenahe Klappenansatzbereich und der im Aortensinusbereich fern vom Klappenansatz bewertet, so dass 6 Regionen pro Präparat entstanden. Auch hier wurde jede Region mit einem Punktwert von 0 bis 3 Punkten bewertet, so dass hier maximal 18 Punkte vergeben werden konnten.

- **0 Punkte** wurden vergeben, wenn keine Verkalkung ersichtlich war.
- **1 Punkt** entspricht minimalsten oder leichten Verkalkungen, die bei einer 20fachen Vergrößerung auffielen.
- **2 Punkte:** Stärkere Verkalkungen oder auch Kalkschollen, die weniger als 50 % des Kreisumfanges ausmachten, wurden mit 2 Punkten bewertet.
- **3 Punkte** wurden bei starken Verkalkungen oder Kalkschollen vergeben, die mehr als 50 % des Kreisumfanges ausmachten.

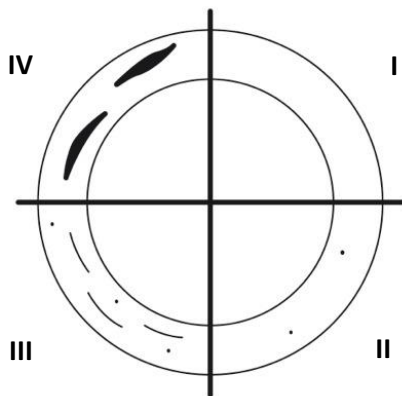


Abb. 5: Von-Kossa-Score Aorta ascendens.
 Quadranten: I- 0 Punkte (Pkt), II- 1 Pkt, III- 2 Pkt, IV- 3 Pkt.

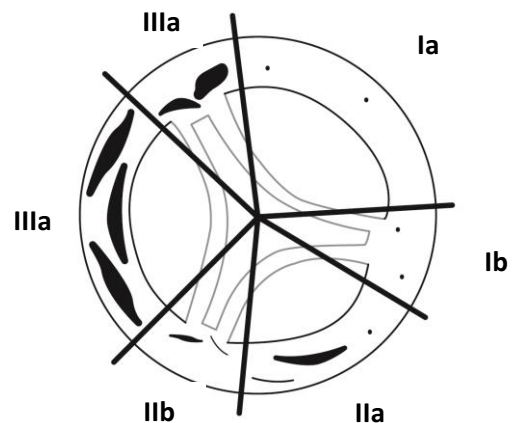


Abb. 6: Von-Kossa-Score Aortenklappenring.
 Quadranten: Ia und Ib- je 1 Punkt (Pkt), IIa und IIb- je 2 Pkt, IIIa und IIIb- je 3 Pkt.

3.4.5. Objektivierung des Von-Kossa-Scores mit ImageJ

Die semiquantitative Validierung des Von-Kossa-Scores beschränkte sich auf die 20 histologisch ausgewerteten Tiere, deren Organe 12 Wochen nach Beginn der Fütterung explantiert wurden. Sie erfolgte sowohl bei den Präparaten des Aortenrings auf Klappenansatzhöhe, als auch bei denen der *Aorta ascendens*. Bei letzteren wurde die Beurteilung auf die mittlere der drei Schnittregionen reduziert.

Bei jeder *Aorta ascendens* wurden 4 standardisierte Fotos der 4 Quadranten unter einheitlichen Bedingungen aufgenommen. Bei den Aortenklappenregionen entstanden pro Präparat 6 Bilder der oben beschriebenen Regionen. Die Fotos wurden mit einer 10fachen Vergrößerung aufgenommen. Artefakte im Bild wurden soweit möglich minimiert und uniforme Belichtung in der Aufnahmesoftware eingestellt.

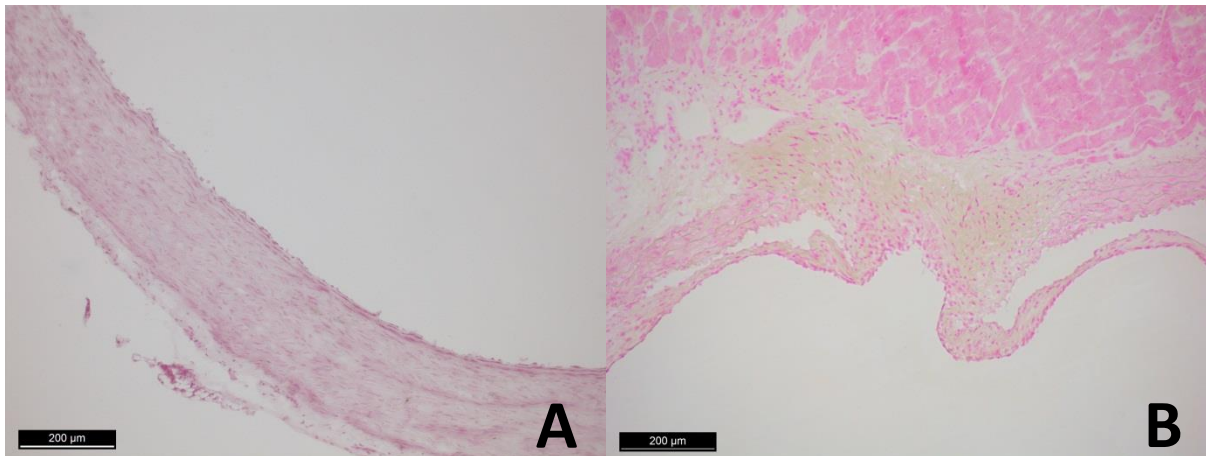


Abb. 7: Standardisierte Orientierungen anhand zweier nach Von-Kossa gefärbter Präparate. Aortenring bzw. Aortensinusbereich (A): Quadrant diagonal, Lumen rechts oben. Kommissurennahe Bereich (B): Horizontale Wandorientierung, Lumen unten. Maßstabsbalken = 200 µm.

Die *Aorta ascendens* und der Aortensinusbereich des Aortenklappenrings wurden jeweils diagonal von links oben nach rechts unten mit dem Aortenlumen nach rechts oben im Bild zentriert, wie Abbildung 7 A zeigt. Die Region mit dem kommissurennahen Klappenansatzbereich wurde in der oberen Bildhälfte zentriert, sodass wenig Myokard mitabgebildet wurde. Das Lumen wurde nach unten gerichtet, sodass die Klappensegel nach rechts und links unten abgingen. Ein Beispiel ist in Abbildung 7 B zu sehen.

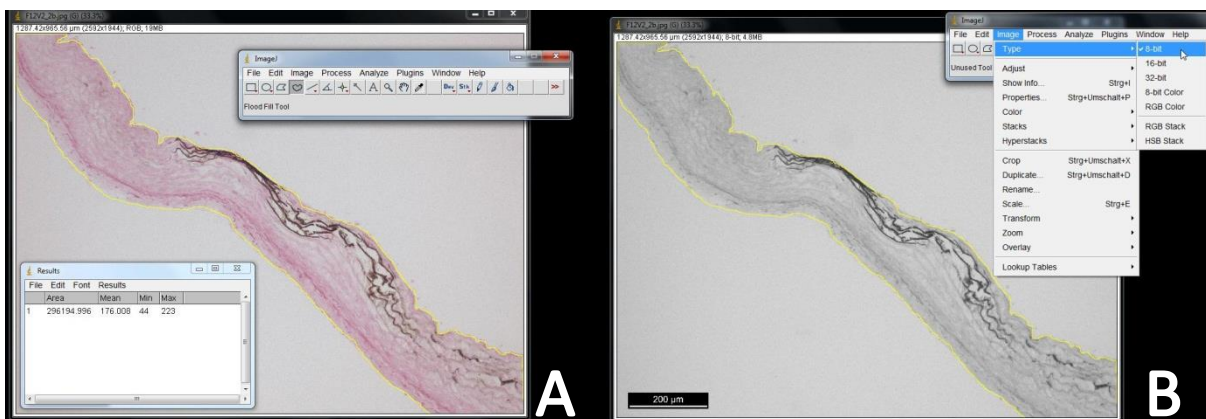


Abb. 8: Anwendung der Software ImageJ. Messung der Gesamtgewebefläche (A), Erstellen eines Grau-schwarz-weißen Halbtonbildes des Fotos (B).

Mittels der Software ImageJ erfolgte die weitere Verarbeitung der Fotos. Die Gewebefläche wurde durch manuelles Bestimmen der zugehörigen Bereiche im Bild gemessen (ROI = *region of interest*). Anhand einer unbunten 8-bit schwarz-grau-weißen Halbtonbild-Version des Fotos wurde der Grenzbereich festgelegt, in dem eine Graustufe als kalzifizierungs-positiv bewertet wird. Dieser Grenzbereich der einheitslosen Graustufe befand sich von 20 bis je nach Färbungsintensität 120-150, bestimmt im visuellen Abgleich mit dem Originalpräparat. Mit Hilfe der Partikelanalyse des Programms war es möglich, so die tatsächlich verkalkte Fläche des

Präparats, wie graphisch in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt, zu bestimmen und in Relation zur vorher gemessenen Gesamtgewebefläche zu setzen.

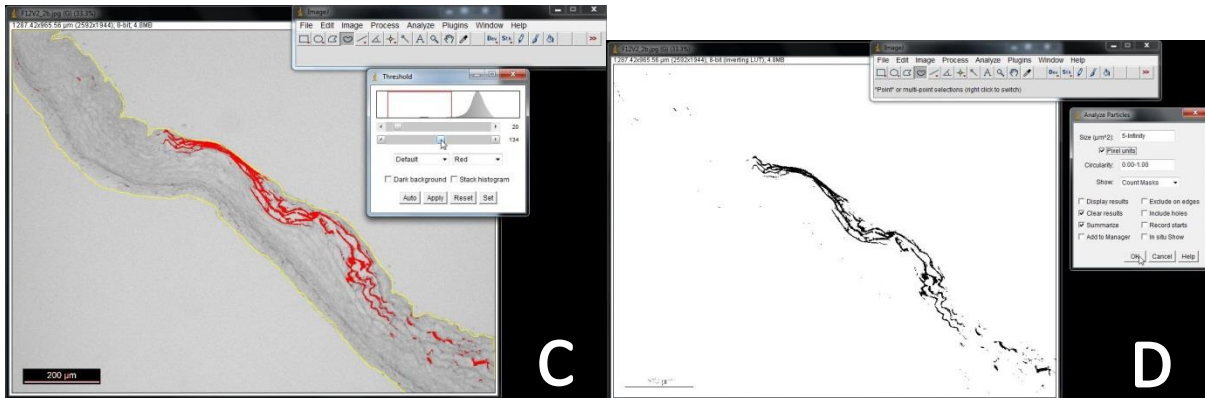


Abb. 9: Anwendung der Software ImageJ. Definition des Grenzbereiches (C) und Partikelanalyse bzw. Bestimmung der kalkifizierten Fläche an einem Negativbild (D).

3.4.6. Movat Pentachrom Färbung

Das Ergebnis der Pentachrom Färbung nach Movat ist eine Übersichtsfärbung, auf der Zellkerne und elastische Fasern schwarz, Muzine blau, Muskulatur rot, Kollagen und retikuläres Bindegewebe gelb, Glykosaminoglykane (GAGs) grün und Fibrin sowie Fibrinoid in einem intensiven rot imponieren. Sie bietet sich zur Bewertung von Änderung des Gehaltes von Kollagen, Elastin und Proteoglykanen an.

Es wurden Kryoschnitte mit einer Schnittdicke von 4 µm gefärbt. Diese wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet. Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte 5 min in Aqua dest rehydriert und 10 min in 4 % Formaldehydlösung fixiert, die anschließend durch 5 min in Aqua dest abgewaschen wurde. Zur weiteren Fixierung folgten 10 min in sehr vorsichtig auf ca. 50 °C erhitzter Bouinscher Lösung, die 10 min in kaltem, fließendem Leitungswasser ab gespült wurde. Nach 5 min in 5 % Natrium Thiosulfat und mehrfacher Spülung durch zweimal 2 min und dann 1 min in jeweils frischem Aqua dest erfolgte die Anfärbung von Muzinen und GAGs durch 20 min in 1 % Alcianblau. Der Farbstoff wurde 3,5 min in fließendem Leitungswasser ab gespült, bevor die Färbung 10 min in zuvor auf 60 °C erhitztem alkalischen Alkohol stabilisiert wurde. Dieser wurde ebenfalls 3,5 min unter fließendem Leitungswasser ab gespült. Durch 9 min in frisch angesetzter Eisenhämatoxylin Lösung nach Weigert wurden Zellkerne und elastische Fasern angefärbt. Der stark intensive Farbstoff wurde 1 min unter kaltem, fließendem Leitungswasser und zweimal 2 min und dann 1 min in jeweils frischem Aqua dest ab gespült und die Färbung so differenziert. Anschließend wurden die Muskulatur und das Fibrin sowie Fibrinoid 1 min in frisch angesetzter Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Lösung angefärbt. Es folgte eine Differenzierung in zweimal 2 min und dann 1 min in je frischem Aqua dest und sowie 5 min in 5 % Phosphorwolframsäure. Unmittelbar darauf wurden die Objektträger in 1 % Eisessig und abermals zweimal 2 min und dann 1 min in je frischem Aqua dest gespült. Durch eine aufsteigende Ethanolreihe (1 min in 96 %, zweimal 1 min in 100 %) wurden die Präparate dehydratisiert. Daraufhin wurden sie 8 min in Alkoholischem Safran gefärbt, der zweimal 1 min in 100 % Ethanol ab gespült wurde. Durch dreimal 5 min in je frischem Xylol wurden die Gewebeschnitte entfettet und anschließend, analog zur HE-Färbung, eingedeckt. Abschließend wurden die Objektträger über Nacht bei 37 °C getrocknet.

3.4.7. Oil Red O Färbung

Die Oil Red O Färbung ermöglicht einen anschaulichen Nachweis einer Lipidakkumulation. Adipozyten imponieren in einem kräftigen Rot. Durch eine Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin nehmen Kerne und Zytoplasma einen Blauton an. Die Färbung ist nur an Kryoschnitten möglich, da bei einer Paraffineinbettung alle Lipide ausgewaschen werden.

Es wurden 4µm dicke Schnitte gefärbt. Zuerst war eine Lagerung der Schnitte über Nacht bei 37°C nötig. Anschließend wurden die Präparate 10 min in 4% Formaldehydlösung fixiert, welche 2min unter fließendem Leitungswasser und 2min in Aqua dest abgewaschen wurde. Nach 1min in frisch auf 60% verdünntem Isopropanol wurden die Gewebeschnitte 15 min in neu angesetzter Oil Red O Arbeitslösung gefärbt. Es folgten Waschschrte für 1min in 60% Isopropanol und zweimal 1min in Aqua dest. Zur Gegenfärbung wurde Mayers Hämatoxylin auf die Objektträger pipettiert, das nach 5-10 s schonend für einige Sekunden erst in Leitungswasser (nicht fließend) gebläut und dann in Aqua dest ausgewaschen wurde. Die Objektträger wurden mit Filterpapier vorsichtig getrocknet und mit Eindeckmedium auf Wasserbasis (Aquatex) eingedeckt. Zum Schluss wurden die Objektträger erneut über Nacht bei 37 °C gelagert.

3.5. Immunfluoreszenzen

Es fanden zwei Immunfluoreszenz-Protokolle (beide an 4 µm Kryoschnitten) Anwendung. Alle Inkubationszeiten ab 30 min fanden in einer Feuchtkammer statt. Folgendes Protokoll wurde bei Kaninchen anti-CD3- (1:200), Maus CD-68- (1:200), Maus anti-αSMA- (1:300) und Kaninchen Syndecan-3-Antikörpern (1:100) angewendet:

Die 10 min in 4 % Formaldehyd fixierten Präparate wurden dreimal 1 min in *Phosphat Buffered Saline* (PBS) gewaschen und anschließend 10 min in 0,25 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach dreimal 1 min in PBS folgte eine Blockierung für 1 h in 5 % Bovinem Serumalbumin (BSA), das in 0,1 % Tween-20 in PBS gelöst war. Nach dreimaligem Waschen für je 1 min in 0,1 % Tween-20 in PBS schloss sich 1 h Inkubationszeit des Primärantikörpers in 1 % BSA und 0,1 % Tween-20 in PBS bei 37 °C an. Der überschüssige Primärantikörper wurde durch dreimal 5 min in 0,1 % Tween-20 in PBS abgewaschen. Alle weiteren Schritte fanden lichtfrei oder –sparend in möglicher Dunkelheit statt. Der Sekundärantikörper (1:200) inkubierte ebenfalls für 1 h bei 37 °C, bevor die Objektträger durch dreimal 5 min in PBS gewaschen wurden. Die Präparate wurden durch Eindeckmedium mit DAPI (Vectashield) bedeckt und das Deckglas mit Nagellack fixiert.

Bei Kaninchen anti-Desmin- (1:200) und Maus anti-3-Nitrotyrosin-Antikörpern (1:100) wurde ein vereinfachtes Protokoll verwendet. Die Präparate zur Anti-Desmin-Färbung wurden in 2 % Formaldehydlösung fixiert, 10 min in 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und der Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Beim Anti-Nitrotyrosin-Antikörper erfolgte die Fixierung für 20 min in 4 % Formaldehyd, die Permeabilisierung 15 min in 0,1 % Triton X-100, die Blockierung 1 h in 5 % BSA und die Inkubation des Primärantikörpers ebenfalls bei 4 °C über Nacht. Alle Waschschrte zwischen den einzelnen übrigen Schritten erfolgten hier durch dreimal 5 min in reinem PBS. Nach der Zugabe der Primärantikörper wurde lichtsparend gearbeitet. Der Sekundärantikörper wurde für 30 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben und die Objektträger nach Abwaschen wie zuvor beschrieben noch 1 min in Aqua dest und 5 min in 100 % Ethanol gewaschen und analog eingedeckt.

Alle Maus-Antikörper waren monoklonal, alle Kaninchen-Antikörper polyklonal. Die Sekundärintikörper waren bei allen Färbungen Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen und 546 anti-Maus entsprechend der Primärintikörper.

3.6. *In situ* Zymographie

3.6.1. Methode

Die *in situ* Zymographie ermöglicht eine Visualisierung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) durch eine fluorogene Gelatine, die bei vorhandener Enzymaktivität und daraus folgender Proteolyse zur Fluoreszenz angeregt wird. Diese Bestimmung der MMP-Aktivität wurde auf die Tiere, die 12 Wochen nach Beginn der Futterapplikation getötet wurden, beschränkt

Das Verfahren wurde möglichst lichtsparend durchgeführt. 4 µm Kryoschnitte wurden 24 h bei 37 °C mit 60 µl Fluoreszin-konjugierter DQ-Gelatine (40 µg/ml 1:100 in Puffer aus 50 mM TRIS-HCl [pH 7,5], 10 mM CaCl₂-Dihydrat, 150 mM NaCl und 5 % Triton X-100 verdünnt) pro Gewebeschnitt inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal 2 min in PBS gewaschen, inklusive einer PBS-Spülung der Gewebeschnitte per Pipette zwischen den Waschschritten. Nach 5-10 min Trocknungszeit wurden die Präparate analog zur Immunfluoreszenz mit einem DAPI-enthaltenden Eindeckmedium bedeckt. Die Spezifität der Gelatinaseaktivität wurde durch die gleiche Methodik an Kontrollproben nach Behandlung mit 20 mMol EDTA validiert.

3.6.2. Quantifizierung mit ImageJ

Es wurden standardisierte Fotos des Grünkanals (488 nm) zur Auswertung mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ aufgenommen (Orientierung analog zur ImageJ Quantifizierung der von Kossa Präparate, 10fache Vergrößerung, Belichtungszeit 2 s, keine Verstärkung, γ-Wert 1,6). Die einheitslose Mittlere Graustufe (*Mean Gray Value*) ermöglicht es, eine Aussage über die Fluoreszenzintensität zu machen. Bei der Bestimmung der Graustufe wird der Farbe Schwarz der Wert 0 und der Farbe Weiß der maximale Punktwert zugeordnet. Die Mittlere Graustufe entspricht der Summe aller Grauwerte im zu bestimmenden Bereich geteilt durch die Anzahl der Pixel. Da nur ein Farbkanal aufgenommen wurde, ist eine Umrechnung in ein unbuntes schwarz-grau-weißes Halbtonbild nicht nötig. Bei allen Bildern wurde der zu bewertende Bereich (*region of interest* = ROI) manuell bestimmt und die Mittlere Graustufe berechnet, wie Abbildung 9 veranschaulicht.

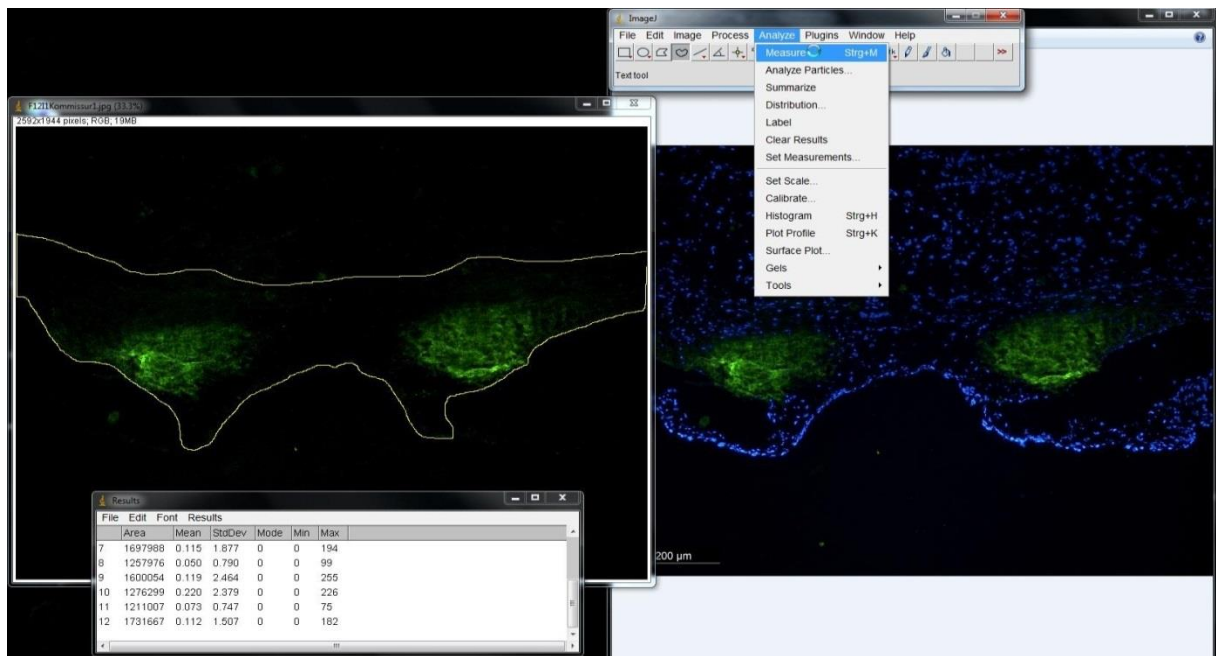


Abb. 9: Quantifizierung der in situ Zymographie. Exemplarisch Markierung der ROI und Messung der Fluoreszenzintensität mittels ImageJ.

3.7. PCR

Die quantitative Auswertung mit der Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) beschränkte sich auf die Aortenwände der Tiere der Futtergruppen V, H und Ctrl zum Explantationszeitpunkt 12 Wochen nach Beginn der Fütterung (n = 5 pro Gruppe).

3.7.1. RNA-Isolation

Die gefrorenen Präparate wurden mit einem Metallmörser zerkleinert und 5 min in ein Mikroreaktionsgefäß mit 1 ml TRIzol gegeben. Es wurden 0,2 ml Chloroform dazugegeben und das Gefäß geschüttelt, bis keine getrennten Phasen mehr erkennbar waren. Die Lösung wurde 15 min bei 6 °C mit einer Geschwindigkeit von 11000 rpm zentrifugiert. Es bildet sich oben eine wässrige Chloroformphase, welche die gelösten Nucleinsäuren enthält. Sie wurde anschließend abpipettiert und mit 0,5 ml Isopropanol zur Präzipitation der RNA vermischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine erneute Zentrifugation mit 11000 rpm für 10 min bei 6 °C. Der Überstand wurde abgeschüttelt, während das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen wurde. Nach einer finalen Zentrifugation mit 8600 rpm für 5 min bei 6 °C wurde der Überstand erneut abgeschüttelt und das Pellet leicht angetrocknet, bevor es in 100 µl Wasser gelöst wurde. Die weitere Aufreinigung der RNA, DNase –Behandlung und Entfernung des TRIzols erfolgte mittels QIAGEN RNeasy Mini Kit bei Raumtemperatur nach Herstellerangaben („RNA-CleanUp“ Protokoll).

Eine Konzentrationsbestimmung war durch photometrische Bestimmung der Extinktion bei 230, 260 und 280 nm gegenüber einer TRIzol-Pufferlösung als Leerwert möglich. Es folgten zwei Qualitätskontrollen: Die Qualität der RNA wurde im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf auf einem Agilent Chip bestimmt, um die Degradation zu beurteilen. Restliche genomische DNA wurde mittels eines speziellen β -Aktin-Primers (Forward-Primer-Sequenz: 5'-CCGCGAGTACCAACCTTCTTG-3'/ Reverse-Primer-Sequenz: 5'-

GCAGCGATATCGTCATCCA-3'), der an eine Intron-Sequenz in der genomischen DNA bindet, in der RT-PCR detektiert.

3.7.2. Reverse Transkription

Zum Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polmerase chain reaction*, PCR) ist eine Umschreibung der extrahierten RNA in *complementary DNA* (cDNA) und ein Abbau der RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase notwendig. Die Reverse Transkription erfolgte mit dem QuantiTect *Reverse Transcription Kit*, das entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet wurde (*handbook march 2009*).

3.7.3. Real-Time PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion werden ausgewählte Gene auf der zuvor gewonnenen cDNA amplifiziert. Durch den Grad der Amplifikationsgeschwindigkeit lassen sich Aussagen über den Expressionsgrad bestimmter Gene treffen.

Die PCR wurde an einem Applied Biosystems Real-Time StepOne Plus PCR System auf einer 96-Loch-Flachbodenplatte (*96-well-plate*) mit dem Platinum SYBR Green PCR Master Mix (life technologies) durchgeführt. Dazu wurden in jedes Loch (*well*) 2 µl der gewonnenen cDNA, je 0,3 µl Forward- und Reverse-Primer, 10 µl SYBR Green, sowie 7,4 µl RNase-freies Wasser (Bestandteil des Kits) gegeben. Auf jeder Platte war eine Leerprobe nur mit RNase-freiem H₂O und SYBR Green vorhanden. Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl in RNase-freiem Wasser angesetzt. Zur Fehlerminimierung wurden Dupletts jedes Primers verwendet.

Die Primer folgender Gene wurden ausgewählt:

- Mit Entzündungsprozessen, Hypoxie und hyperglykämischer Stoffwechsellage assoziierte Gene (Forward-Primer-Sequenz/ Reverse-Primer-Sequenz)
 - **CD39** (5'-GGGCCTATGGGTGGATTACT-3'/ 5'-CAAAGGTTGCCTGTTTCTGG-3')
 - **CD73** (5'-ACGTGTCCATGTGCATTGTAA-3'/ 5'-GGTTCTCCCAGGTGATGGTA-3')
 - *hypoxia-inducible factor-1-alpha* (**HIF1α**; 5'-ATCAAGTCAGCAACGTGGAA-3'/ 5'-CGTCATAGCGGTTTCTTGT-3')
 - Rezeptor für glykierte Endprodukte (*receptor for advanced glycation end products*, **RAGE**; 5'-TGAACCTCACAGCCAATGTCC-3'/ 5'-TCAGAGGTTTCCCATCCAAG-3')
- Mit osteogener Transformation assoziierte Gene (Forward-Primer-Sequenz/ Reverse-Primer-Sequenz)
 - **Osteopontin** (OPN; 5'-AAGCCTGACCCATCTCAGAA-3'/ 5'-ATGGCTTTCATTGGAGTTGC-3')
 - **Osteocalcin** (OCN; 5'-AAGCAGGAGGGCAGTAAGGT-3'/ 5'-GTCCGCTAGCTCGTCACAAT-3')
 - *Runt-related transcription factor-2* (**RUNX2**; 5'-GATGACACTGCCACCTCTGA-3'/ 5'-GATGAAATGCCTGGGAACTG-3')

Zur Kontrolle eines nicht regulierten *housekeeping* Gens wurde ein weiterer β-Aktin-Primer verwendet. Am PCR-Gerät fand folgender Denaturierungs-Anlagerungs (*Annealing*)-Elongations Zyklus (*Run Method*) Anwendung:

- 2 min bei 50 °C
- 2 min bei 95 °C
- 40x abwechselnd 15 s bei 95 °C und 30 s bei 60 °C
- 15 s bei 95 °C

- 1 min bei 60 °C
- 15 s bei 95 °C
- 15 s bei 60 °C.

3.7.4. $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Die Auswertung der PCR erfolgte mittels der Delta-Delta- C_t -Methode ($\Delta\Delta C_t$). So ist eine relative Quantifizierung möglich. Der C_t -Wert (*Cycle of threshold*) entspricht dem Zyklus der PCR, bei welchem der Fluoreszenzwert der Hintergrundfluoreszenz überschritten wird. Bei der $\Delta\Delta C_t$ -Methode wird die Differenz des gemessenen Wertes der Expression des jeweils ausgewählten Gens einer Futtergruppe (Mittelwert der Duplets) erst zu dem Wert eines konstant exprimierten Gens (Mittelwert der β -Aktin-Kontrolle) errechnet (Differenz der C_t -Werte ΔC_t : gewähltes Gen - β -Aktin) und dann die Differenz zum Mittelwert der Expression des ausgewählten Gens in der Kontrollgruppe (Mittelwert aller Tiere der entsprechenden Futtergruppe $\Delta\Delta C_t$) bestimmt. Der errechnete Wert wird in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

3.8. Radiologische Diagnostik: μ CT

Zusätzlich zu den Tieren zur histologischen, immunhistologischen und enzymographischen Auswertung wurden zur radiologischen Diagnostik 12 weitere Tiere gehalten. Diese Diagnostik ermöglicht eine Darstellung des Kalzifizierungsmusters im gesamten Kardiovaskularsystem sowie eine Quantifizierung. Eine Übersicht der entsprechenden Tiere bietet Tabelle 2. Die Futtergruppen wurden auf die Gruppen V, H und die Kontrollgruppe beschränkt, sowie die Explantationszeitpunkte auf 4 und 12 Wochen nach Beginn der Futtergabe reduziert. Die Tierhaltung und -tötung erfolgte wie bei den übrigen Tieren zuvor beschrieben.

Zeitpunkt	Ctrl (Kontrolle)	V (Volle Dosis Härtefutter)	H (Halbe Dosis Härtefutter)
4 Wochen	n = 2	n = 2	n = 2
12 Wochen	n = 2	n = 2	n = 2

Tabelle 2: Übersicht über die Tiere zur radiologischen Diagnostik. Anzahl der Tiere pro Futtergruppe und Explantationszeitpunkt.

3.8.1. Explantation und Einbettung

Die Aorta wurde *in toto* explantiert und von anliegendem Gewebe freipräpariert. Das Lumen der Präparate wurde über eine Kanülierung mit einem peripheren Venenkatheter mit Agarosegel (Low Melt Agarose, 5 % in Aqua dest, flüssig bei 37 °C) gefüllt, um das Lumen der Aorta offen zu halten.

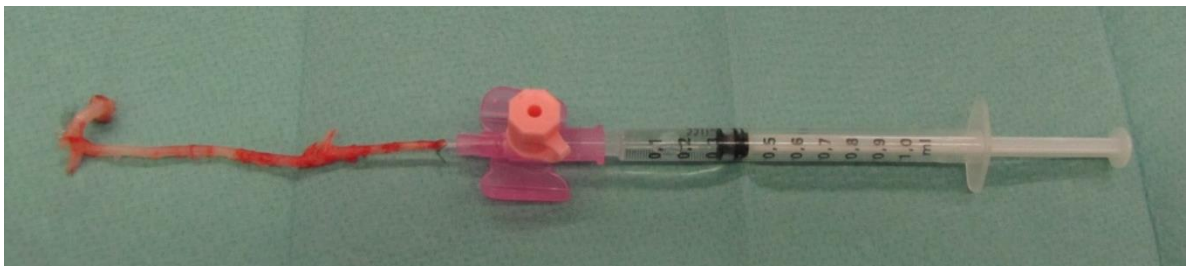


Abb. 10: *In toto* explantierte, kanülierte und mit Agarosegel gefüllte Aorta.

Nach Aushärtung wurden die Präparate in flüssige Gelatine, die mit Lipiden homogen angefärbt worden war, eingebettet (9 g Gelatine und 6 ml Lipovenös pro 60 ml Aqua dest). Dieser Vorgang wird in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

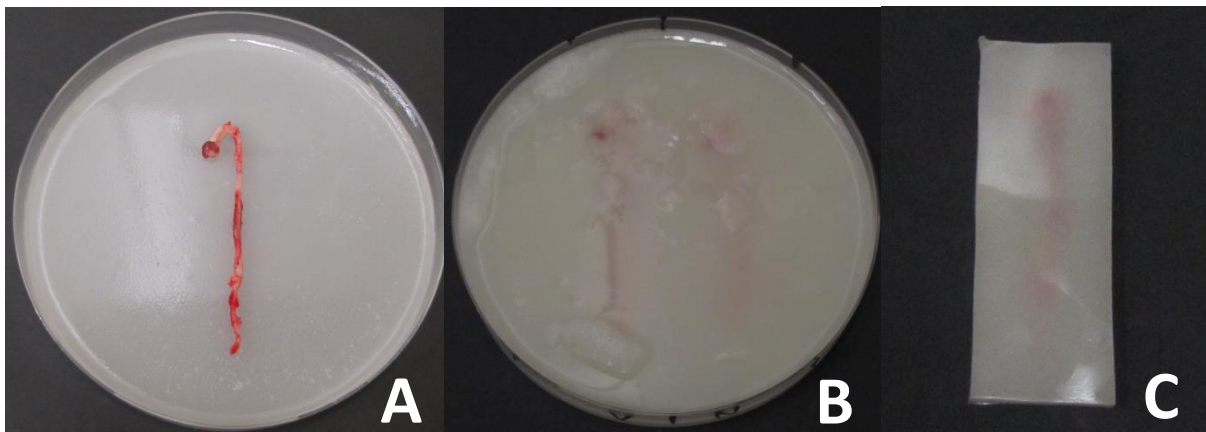


Abb. 11: Einbettung der Aorta in Gelatine: Ausgehärtete Aorta auf fester Gelatineschicht (A). Auffüllung durch eine weitere Gelatineschicht (B). Ausschneiden eines Blockes für die μ CT Bildgebung (C).

3.8.2. μ CT

Die radiologische Bildgebung erfolgte am Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung des Universitätsklinikums Aachen nach dem dortigen Standardprotokoll [177]. Dem zu Folge wurden die Gelatineblöcke der zuvor eingebetteten Organe in einem standardisierten Gestell fixiert und eine Mikro-Computertomographie (μ CT) an den zuvor eingespannten Organen erstellt.

Die Rekonstruktion erfolgte mittels eines modifizierten Feldkamp Algorithmus mit weichem Rekonstruktionskernel, sowie der Korrektur von Cupping- und Ringartefakten. Es wurden dreidimensionale Datensätze mit einer Voxelgröße von 35 μ m rekonstruiert. Um das μ CT Scanprotokoll zu kalibrieren, wurde ein Wasserphantom benutzt, um reproduzierbare und quantitative Bildintensitäten zu generieren. Die Auswertungssoftware Philips Imalytics Preclinical ermöglichte es, die volumetrischen Datensätze auszuwerten, exemplarisch dargestellt in Abbildung 12, und die Aortenpräparate dreidimensional darzustellen.

Die kalzifizierten Areale konnten auf benutzerunabhängige Weise lokalisiert und quantifiziert werden, indem ein einheitlicher Schwellenwert knapp oberhalb der Gelatinedichte definiert wurde. Die Dichtewerte im Bereich über 200 Hounsfield-Einheiten wurden als Kalzifizierungspositiv klassifiziert, so dass eine Volumenberechnung der positiven Areale durch das Programm möglich war. Das Programm ist außerdem in der Lage, die so klassifizierten kalzifizierten Regionen als 3D-Modell zu visualisieren.

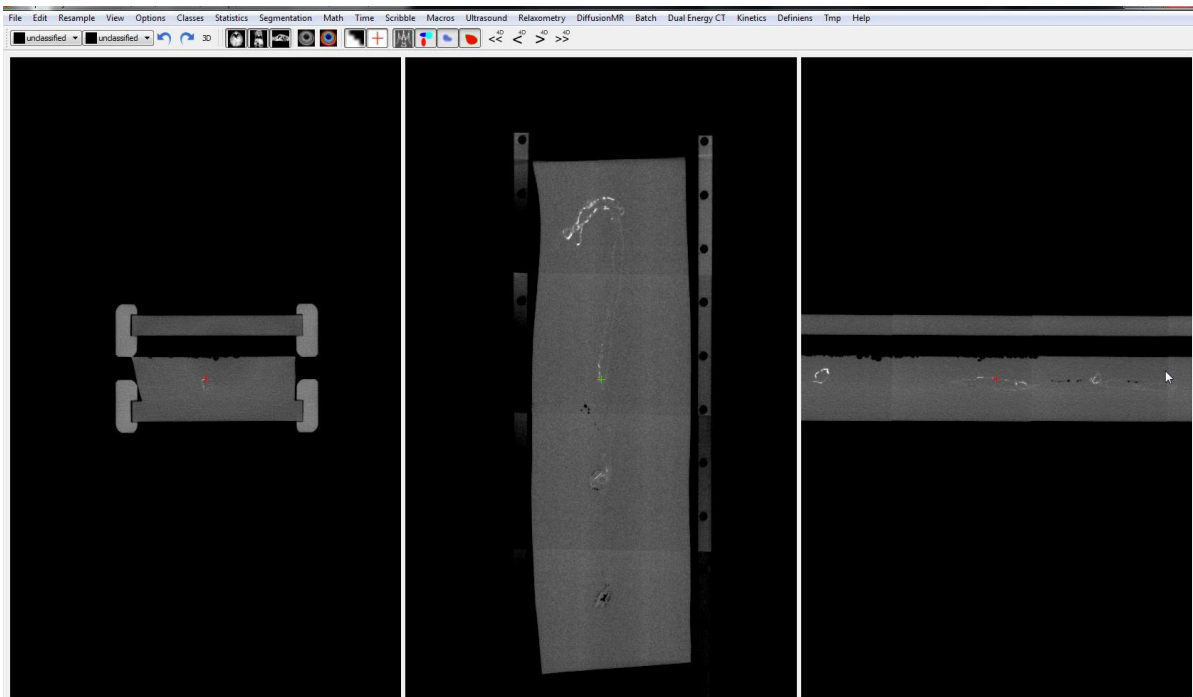


Abb. 12: Imalytics Preclinical Software. Exemplarische Darstellung eines Schnittbild-Datensatzes der Aorten in 3 Ebenen.

3.9. Statistische Angaben

Die Messdaten werden im Folgenden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus n voneinander unabhängigen Experimenten angegeben. Zur Berechnung der Signifikanz wurde beim Vergleich von nur 2 Gruppen ein einseitiger ungepaarter t-Test und bei mehreren Vergleichsgruppen an einem Zeitpunkt eine einfaktorielle ANOVA (*analysis of variance*) mit Bonferroni-Post-Hoc-Tests, beziehungsweise bei mehreren Zeitpunkten eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt. p -Werte kleiner 0,05 wurden als Indikatoren für signifikante Unterschiede betrachtet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Jeweils als Kontrollgruppe (Ctrl) wurde die Rattenpopulation betrachtet, die mit Normalfutter gefüttert wurde. Zur Berechnung einer Korrelation wurde eine zweifaktorielle Pearsonberechnung durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.04.

3.10. Eigenanteil der durchgeführten Methodik sowie geleistete Etablierungsarbeit

Wie bereits im Text gekennzeichnet erfolgte die Serumanalyse im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf und das μ CT am Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung des Universitätsklinikums Aachen. Die Echokardiographie wurde durch den in dieser Technik erfahrenen Untersucher Hiroshi Munakata durchgeführt. Die Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR wurde unter Hilfestellung der biologisch-technischen Assistentin Gisela Müller sowie der medizinischen Doktorandin Franziska Schiffer durchgeführt.

Bereits etabliert im Labor der Forschungsgruppe für Experimentelle Chirurgie der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf waren die HE-Färbung, die Färbung nach von Kossa und die α SMA-Immunfluoreszenz. Die Durchführung dieser etablierten Färbungen sowie alle weiteren methodischen Arbeiten und Arbeiten der Analytik und Auswertung wurden durch den Doktoranden und Autor dieser Arbeit nach methodischer Einarbeitung durch die wissenschaftlichen Mitarbeiter (Forschungsrotanden der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie und *Postdocs* der gleichen Klinik) in eigenhändiger Arbeit durchgeführt. Auch die operativen Eingriffe und die Betreuung der Versuchstiere wurden von ihm zuerst unter Anleitung, dann auf Anweisung durch die Leiter des Tierversuchsprojektes durchgeführt.

Eigens für die vorliegende Studie erfolgte eine Anpassung der histologischen Färbung Movat Pentachrom und Oil Red O speziell an Kryoschnitte, da diese Färbungen zuvor nur an Paraffinschnitten durchgeführt wurden. Ebenso wurde die immunhistologische Darstellung von Desmin- und 3-Nitrotyrosin mittels Fluoreszenzfärbungen eigens etabliert. Des Weiteren erfolgte die Entwicklung des Von-Kossa-Scores für die Quantifizierung der Kalzifizierung durch den Doktoranden.

In Zusammenarbeit mit anderen Doktoranden und den biologischen und biochemischen festangestellten Mitarbeitern erfolgte zudem die Etablierung und Optimierung der Protokolle für die *in situ* Zymographie und die CD3-, CD68- und Syndecan-3-Immunfluoreszenzen.

3.11. Verwendete Materialien

3.11.1. Materialliste

Material	Bezugsquelle
Aceton	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland, 1.00013.2500
Agarose Low Melt	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 6351.1
Alcianblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. A5268-106
Alkalischer Alkohol	360 ml 96 %iger Ethanol, 40 ml konzentriertes Ammoniumhydroxid
Alkoholischer Safran	12 g Safran du Gatinais in 200 ml 100 %igem Ethanol lösen
Aluminium Sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. 202614-25G
Ammoniaklösung 30 % Rotipuran®	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. CP17.1
Ammoniumhydroxid, konzentriert (25 %)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland, 1.05422.1000
Bouinsche Lösung	300 ml Pikrinsäure, 100 ml Formaldehyd 37-40 %, 20 ml 100 %iger Eisessig
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. A7906-500G
Brillant-Crocein-Säurefuchsin-Lösung	80 ml Brilliant Crocein R Stock (4 g Brilliant Crocein R, 398 ml Aqua dest), 20 ml Säurefuchsin Stock (0,5 g Säurefuchsin, 497,5 ml Aqua dest, 2,5 ml 100 %iger Eisessig)
Brilliant Crocein R	Waldeck, Münster, Deutschland, 1B-109
CaCl ₂ -Dihydrat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland, 1.02382.1000
Carprofen Paracarp, 50 mg/ml Injektionslösung,	IDT Biologica GmbH, Dessau-Roßlau, Deutschland, Zul.-Nr. 401182.00.00
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, C2432-500ML
Eindeckmedium Roti® Histokitt II	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.Nr. T160.1
Eindeckmedium Vectashield mit DAPI	Vector Laboratories, Peterborough, Großbritannien, Produktnr. H-1200
Eindeckmedium Aquatex	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland, 1.08562.0050
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. 236489

Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert	60 ml 2 % Alkoholisches Hämatoxylin, 40 ml Eisenchloridlösung (12,4 g Eisen-Chlorid-Hexahydrat, 500 ml Aqua dest, 5 ml konzentrierte Salzsäure), 20 ml Jodlösung (10 g Jod, 20 g Kaliumjodid, 500 ml Aqua dest)
Eisessig (Essigsäure)	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Rotipuran®, Art.-Nr. 3738.1
Eosin B	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. 861006- 100G, 5 g Eosin B in 500 ml Aqua dest und 500 ml Ethanol lösen, kurz vor dem Gebrauch 2 Tropfen Eisessig auf 200 ml Lösung
Formaldehydlösung > 37 %	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland, 8.18708.1000
Formaldehydlösung 4 % Roti®-Histofix	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. P087.3
Futtergruppe Ctrl, Normalfutter (Basisfutter)	ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland, R/M-H Alleinfuttermittel
Futtergruppe H	ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland, S3544-S011 SM R/M-H Sondermischung
Futtergruppe I	ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland, S3544-S022 SM R/M-H Sondermischung
Futtergruppe II	ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland, S3544-S032 SM R/M-H Sondermischung
Futtergruppe III	ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland, S3544-S042 SM R/M-H Sondermischung
Futtergruppe V	ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland, S3544-S012 SM R/M-H Sondermischung
Gelatine	Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld, Deutschland
Gelatine DQ, für <i>In situ</i> Zymographie	Life technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland, D12054, Lot: 989801
Hämatoxylin Shandon Gill3 Hematoxylin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, REF 6765009
Hämatoxylin Pulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, H3136-25G
Heparin-Natrium 25.000 IE/ml,	Rotex medica, Trittau, Deutschland, Pharmazentralnummer: 3862340
Isofluran Flüssigkeit zur Inhalationsnarkose	Actavis, Langenfeld, Deutschland, Zul.-Nr. 30372.00.00
Isopentan 2-Methylbutan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. 59070- 1l
Jod	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 7935.1
Jonosteril Infusionslösung 1/1 E	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland,

KabiPac	Zul.-Nr. 6100285.00.00
Kaliumjodid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 8491.1
Kryo-Einbettmedium Tissuetek O.C.T TM Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande, Artikelnr. 4583
Lipovenös MCT 20 %	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland, Zul.-Nr. 33150.01.00
Mayers Hämatoxylin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, REF TA-125-MH
NaCl	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland, 1.06404.0500
NaCl isotonische Lösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, Zul.-Nr. 6697366.00.00
Natrium (Sodium) Thiosulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. S-1648
Nuclear Fast Red (Kernechtrot)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. N8002.5G
Oil Red O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. O0625-25G
Oil Red O Arbeitslösung	Stammlösung: 2 g Oil Red O, 400 ml Isopropanol; Arbeitslösung: 60 ml Stammlösung, 40 ml Aqua dest
PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA Sequenzen siehe Abschnitt Real-Time PCR
Peroxyinitrit	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA, Cay81565-1
Phosphat Puffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. P4417-50TAB
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. P40061006
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. P6744
Platinum SYBR Green PCR Master Mix	Life technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland, Cat. No. 11744-500
Reverse Transkriptase Kit QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland, Cat.No. 205311 (<i>handbook march 2009</i>)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland, Katalognr. 74104, „RNA-Clean-up“-Protokoll (Seite 56)
Safran du Gatinais (Spanish Saffron)	Waldeck, Münster, Deutschland, 5A-394
Salzsäure, konzentriert (32-37%)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland, 1.00317.1000
Säurefuchsin	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. T128.1
Silbernitrat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland, Bestellnr. 1.01512.0100

TRIs Puffer 10mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland Art.-Nr. T1503
TRIs-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland, 9090.3
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. T-9284
TRizol	life technologies, Darmstadt, Deutschland, Ambion, REF 15596026
Tween-20	Merck Millipore Calbiochem, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. 655205
Wistar-Ratten, männlich	Bezogen von der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 9713.3

3.11.2. Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Alexa Fluor® 488 (a-rabbit)	Life technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland, Katalognummer A11008, Lot-Nr. 1073082
Alexa Fluor® 546 (a-mouse)	Life technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland, Katalognummer A 11030, Lot-Nr. 988446
Anti-3-Nitrotyrosine-Antikörper (mouse)	Abcam, Cambridge, Großbritannien, ab110282
Anti-CD3-Antikörper (rabbit)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. C7930-.2ML
Anti-CD68-Antikörper (mouse)	Abcam, Cambridge, Großbritannien, ab31630
Anti-Desmin-Antikörper (rabbit)	Abcam, Cambridge, Großbritannien, ab15200
Anti-Vimentin-Antikörper (mouse) Vimentin V9	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Cat. No. 10515
Anti- α SMA-Antikörper (mouse)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. A5228-200UL

3.11.3. Software

Software	Bezugsquelle
Excel 2010, Office	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software, San Diego, California USA
ImageJ 1.46 (open source)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Imalytics Preclinical μ CT Software	Philips Healthcare, bezogen über das Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung des

	Universitätsklinikums Aachen, Deutschland
Leica Fotosoftware	Leica, Wetzlar, Deutschland, Application Suite V3.7
PCR-Software StepOne Software v2.1	Life technologies, Darmstadt, Deutschland, Applied Biosystems
Word 2010, Office	Microsoft, Redmond, USA
Zotero 3.0	Roy Rosenzweig Center for History and New Media, Fairfax, USA

3.11.4. Geräteliste

Gerät	Bezugsquelle
96-well-plate MicroAmp	Life technologies, Darmstadt, Deutschland, Applied Biosystems Part No. 4346906
Agilent Chip RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA Part Number 5067-1511
µCT	CT Imaging, Erlangen, Deutschland, Tomoscope DUO
Kaltlichtquelle	Schölly Fiberoptic GmbH, Denzlingen, Deutschland, Flexilux Mo-200HL
Kryotom	Leica, Wetzlar, Deutschland, CM 1950
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland, comfort KSD 3534
Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland, RH basic 2
Mikroskop mit Fluoreszenzlampe und Digitalkamera	Leica, Wetzlar, Deutschland, DM 2000 mit EL6000 und DFC 425C
Narkosegasanlage	Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland, Isofluran vet.med.vapor
OP-Lampe	Dr. Mach GmbH & Co. KG, Ebersberg, Deutschland, Triaflex
OP-Mikroskop	Nikon Instruments, Amsterdam, Niederlande, SMZ-1-Zoom-Stereomikroskop
PCR-Gerät	Life technologies, Darmstadt, Deutschland, Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland, BioPhotometer plus
Rasierer	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland, Favorita II, Typ GT104
Reagenzglasschüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland, REAX top, Bestellnr. 541-10000-00
Tiefkühltruhe (-20°C)	Robert Bosch Healthcare GmbH, Waiblingen, Deutschland, automatic GTA 50
Tiefkühltruhe (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Revco,

	Model: PULT14903-V12
Tischabzug	wrt-Laborbau, Stadtlohn, Deutschland, maxima
Trockenschrank (37°C)	Thermo Fisher Scientific, Heraeus Instruments, Schwerte, Deutschland, Function line, Typ: UT 20
Trockenschrank (60°C)	Binder GmbH, Tuttlingen, Germany, WTB
Ultraschallgerät Echokardiographie	Philips Healthcare, Hamburg, Deutschland, HD11 XE Ultrasound system, 15 MHz Schallkopf
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland, Basic BA 110 S
Wasserabweisender Stift (DAKO Pen)	Dako, Glostrup, Dänemark, REF S2002
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland, 5804 R

3.12. Berechtigungsnachweise

3.12.1. Aktenzeichen

Genehmigungsverfahren- Vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) vergebenes Aktenzeichen: 87-51.04.2010.A068

Aktenzeichen der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: G68-10

3.12.2. Tierversuchsgenehmigung



Ordnungsamt
Landeshauptstadt Düsseldorf

Briefpostanschrift: Stadtverwaltung Amt 32/12-1, 40200 Düsseldorf
Universitätsklinik für Kardiovaskuläre Chirurgie
Herrn Dr. Payam Akhyari
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf

**Landeshauptstadt
Düsseldorf**
Der Oberbürgermeister
Ordnungsamt
Allgemeine Ordnungs-
angelegenheiten
Worringer Straße 111
40210 Düsseldorf

Kontakt
Herr Thiele
Zimmer
2.03
Telefon
0211.89-93280
Fax
0211.89-29226
E-Mail
matthias.thiele@
duesseldorf.de
Datum
18.01.2012
AZ
32/12-1 - 5

Ordnungsbehördliche Erlaubnis

Sehr geehrter Herr Dr. Akhyari,

aufgrund Ihres Antrages vom 28.11.2011 wird Ihnen für Herrn Kai Zwirnmann hiermit gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes in der Neufassung vom 25.05.98 (BGBl. I S. 1105) in der zurzeit geltenden Fassung die

Ausnahmegenehmigung

zur Anwendung folgender Tätigkeit an Ratten mit der Auflage, dass diese - nach einer Einarbeitungszeit unter Anleitung - nach Anweisung erfolgt:

- wie im o. g. Antrag beschrieben

erteilt.

Die Erlaubnis wird mit der Auflage erteilt, der Ordnungsbehörde rechtzeitig alle Änderungen der im o. a. Antrag dargelegten Sachverhalte mitzuteilen.

Die vorliegende Erlaubnis bezieht sich nur auf die genannte Tierart und die ausgeübte Tätigkeit sowie auf die im Antrag angegebene Versuchseinrichtung.

Ich weise darauf hin, dass bei Nichtbeachtung der gesetzlichen Vorschriften nicht nur Ordnungswidrigkeitenverfahren gegen Sie eingeleitet werden können, sondern auch die Rücknahme der Erlaubnis bewirken kann.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag


Thiele

Seite 1/1

Telefonzentrale
0211.89-91
Internet
www.duesseldorf.de/
ordnungsamt
gesundheitsaufsicht@
duesseldorf.de
Sprechzeiten
Mo.-Fr.8.00-12.30
u. n. Vereinbarung
Bus, Bahn, U-Bahn
Hauptbahnhof
Bankkonten
Stadtsparkasse
Düsseldorf
10 000 495
BLZ 300 501 10
Postbank Essen
3269 431
BLZ 360 100 43

3.12.3. Erklärung über die Teilnahme an der Versuchstierkunde

Universitätsklinikum Düsseldorf


HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Übungsschein

Kai Zwirnmann
Kardiovaskuläre Chirurgie
geb. am: 07.01.1988
in: Haan / Rhl.

hat an der versuchstierkundlichen Einführung für wissenschaftliche und technische Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises gem. § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes mit Erfolg teilgenommen.

Den Teilnehmern werden in 40 Stunden theoretische Kenntnisse und praktische Fähigkeiten auf dem Gebiet der Versuchstierkunde vermittelt.

**Allg. Kurseinführung; Entwicklung des Tierschutzgedankens;
Tierschutzgesetz, Verordnungen, (Alters-, Geschlechtsbestimmung)
Einführung in die Versuchstierkunde (Markierung von Versuchstieren)**

**Gesundheitsüberwachung von Versuchstierhaltungen
(Probenentnahme; Gefahrstoffe, Abwasser)**

**Narkose (am Beispiel kleiner Nager);
sachgerechter Umgang mit Narkotika**

Belastung im Tierversuch; Schmerztherapie

Statistische Grundbegriffe und Verfahren

**Vergl. Anatomie und Physiologie ausgewählter Versuchstiere
(Skelett und Gelenke, Verdauungssystem, Medikamente)**

Führung durch die Tierversuchsanlage

Ersatz- und Ergänzungsmethoden

Antragsverfahren, Meldeverordnung

Tierspezifische Übungen:

Umgang mit kleinen Nagern (Maus, Ratte)
(Zucht und Genetik, Haltung, Fütterung, Verhalten, Handling, Gesundheitszustand; Vaginalabstrich, Applikation und Probenentnahme; Euthanasie)

Transgene Tiere

Immunisierung; Umgang mit Kaninchen, Meerschweinchen, Hühnern
(Verhalten, Handling, Haltung, Fütterung, Gesundheitszustand; Applikation und Probenentnahme; Narkose und Euthanasie)

Umgang mit Hund, Katze, Schwein (theor.)
(Verhalten, Handling, Haltung, Fütterung, Gesundheitskontrolle; Applikation und Probenentnahme; Narkose und Euthanasie)

Düsseldorf, den 11.11.2011


PD Dr. M. Sager

Tierversuchsanlage

Komm. Leiter
PD Dr. med. vet. Martin Sager
Fachleiterarzt für
Versuchstierkunde
und Chirurgie
Tel.: 0211 81 14400 / -60
e-mail:
martin.sager@med.uni-duesseldorf.de

stellv. Leiter
PD Dr. rer.nat. W. Peter M. Benten
Tel.: 0211 81 14433
e-mail:
peter.benten@med.uni-duesseldorf.de

Sekretariat
Barbara Theis
Petra Boldt
Tel.: 0211 81 14400 / -02
Fax: 0211 81 14403
e-mail:
tva@uni-duesseldorf.de

Dozenten:
PD Dr. Martin Sager
PD Dr. Peter Benten
Dr. Laurentiu Benga
Dr. Evalotta Sehng-Lovén
Dr. Dieter Hafner
Prof. Dr. Martin Rosenbruch

4. Ergebnisse

4.1. In vivo erhobene Daten

4.1.1. Gewichtsverlauf

Alle Tiere haben bis zum jeweiligen Explantationszeitpunkt überlebt. Die Tiere der Futtergruppen mit voller Vitamin-D₃-Dosis (V, I, II) zeigten ab etwa 8 Wochen nach Beginn der Futterapplikation einen reduzierten Allgemeinzustand mit zunehmend versteifender Wirbelsäulenkyphose und dadurch bedingter Einschränkung des Bewegungsausmaßes. Ein solches Tier zeigt Abbildung 13. Auch die Gewichtskurve

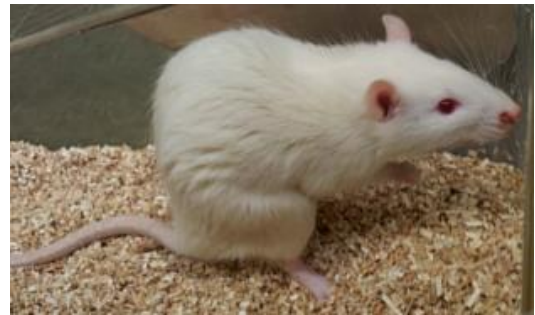


Abb. 13: Klinisches Outcome. Volldosis-Härtefuttermittel mit versteifter Wirbelsäulenkyphose nach 8 Wochen Futterapplikation

zeigt eine ähnliche Unterscheidung im Verlauf zwischen Futtergruppen mit voller und solchen mit reduzierter VD-Dosis. Die Tiere mit der vollen VD-Dosis zeigten zu späteren Zeitpunkten sogar einen Gewichtsverlust. Die übrigen applizierten Futterkomponenten unterschieden sich bezüglich des Gewichtsverlaufs nicht signifikant. Abbildung 14 stellt den Gewichtsverlauf über den kompletten Zeitraum der Futterapplikation dar. Um die unterschiedlichen Startgewichte (200-250 g) zu berücksichtigen, wird in dem Diagramm der Gewichtszuwachs (aktuelles Gewicht – Startgewicht) abgebildet. Zu einem Überblick über die Gewichtsverteilungen innerhalb der einzelnen Futtergruppen dient Abbildung 15 zu den Zeitpunkten Woche 4 und 12.

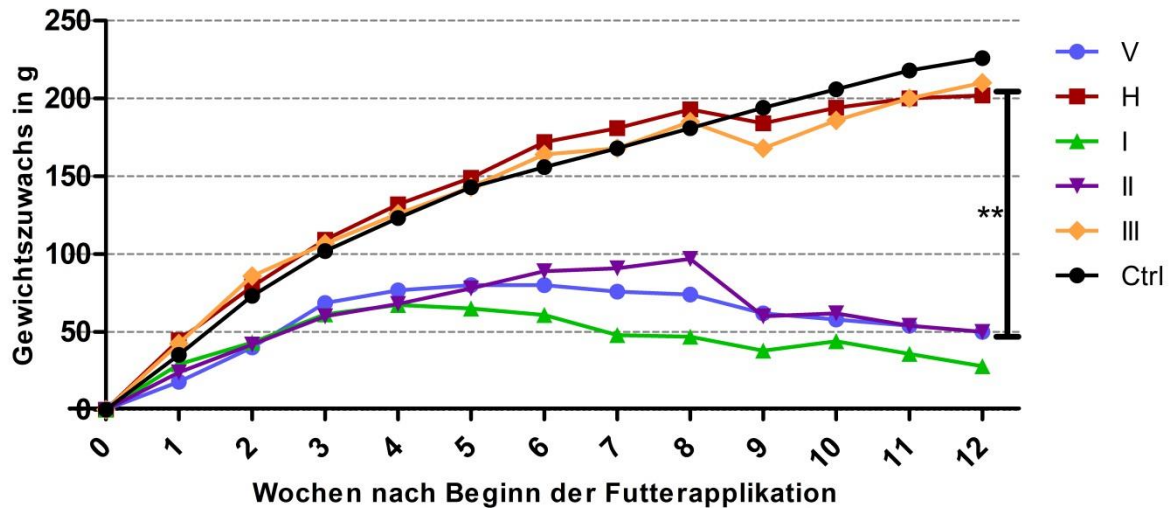


Abb. 14: Gewichtszuwachs über den gesamten Beobachtungszeitraum. Deutliche Unterscheidung im Verlauf zwischen Futtergruppen mit voller (V, I, II) und reduzierter (Ctrl, H, III) VD-Dosis. 0 g Gewichtszuwachs entspricht dem Startgewicht zum Beginn der Futterapplikation.

Nach 4 Wochen Fütterung haben die Tiere mit reduzierter VD-Dosis (Gruppen H und III) bereits einen signifikant größeren Gewichtszuwachs (Ctrl: $123,3 \pm 4,65$ g; H: $132 \pm 10,79$ g; V: $76,67 \pm 5,32$ g; p [V vs. H] $< 0,0001$). Nach 12 Wochen wird dieser Unterschied auch auf den ersten Blick im Diagramm eindrucksvoll sichtbar (Ctrl: $226 \pm 19,9$ g; H: $202 \pm 37,01$ g; V: $50 \pm 16,12$ g; p [V vs. H] = $0,0028$). Da die Gewichtskurven nur die noch nicht getöteten Tiere darstellen, sind nach 12 Wochen entsprechend weniger Tiere darstellbar und die Standardfehler folglich etwas größer.

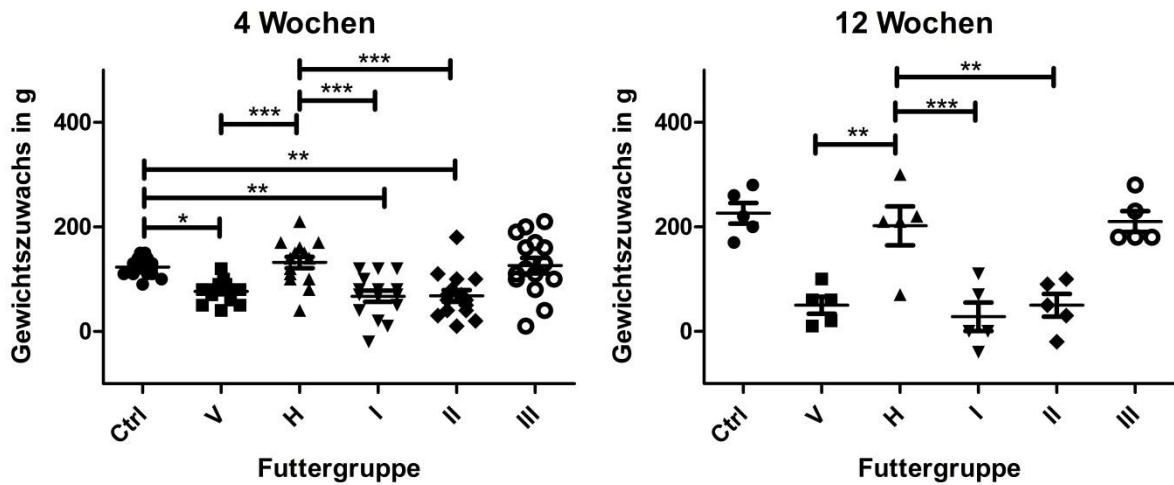


Abb. 15: Gewichtszuwachs nach 4 und 12 Wochen. Vor allem nach 12 Wochen zeigt sich auch hier die Differenz zwischen Futtergruppen mit voller (V, I, II) und reduzierter (Ctrl, H, III) VD-Dosis. Nur ausgewählte Signifikanzen dargestellt.

4.1.2. Gefressene Futtermengen

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen den Verlauf der wöchentlich gefressenen Futtermengen pro Ratte an. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Tieren der Futtergruppen mit voller und reduzierter VD-Dosis: Die Futtergruppen mit der vollen Dosis Vitamin D₃ zeigen, im Gegensatz zu denen mit reduzierter VD-Dosis, einen deutlichen Abwärtstrend über den Zeitraum von 12 Wochen. Da das Wiegen der Futtermenge erst zum Zeitpunkt 0 begann und die gefressene Futtermenge als Differenz aus aktueller und voriger Futtermenge bestimmt wird, wird die Futtermenge hier erst ab Woche 1 und nicht ab Woche 0 dargestellt. Ein Standardfehler kann hier nicht sinnvoll angegeben werden, da nicht das pro Ratte gefressene Futter, sondern nur das pro Käfig gefressene Futter bestimmt werden konnte.

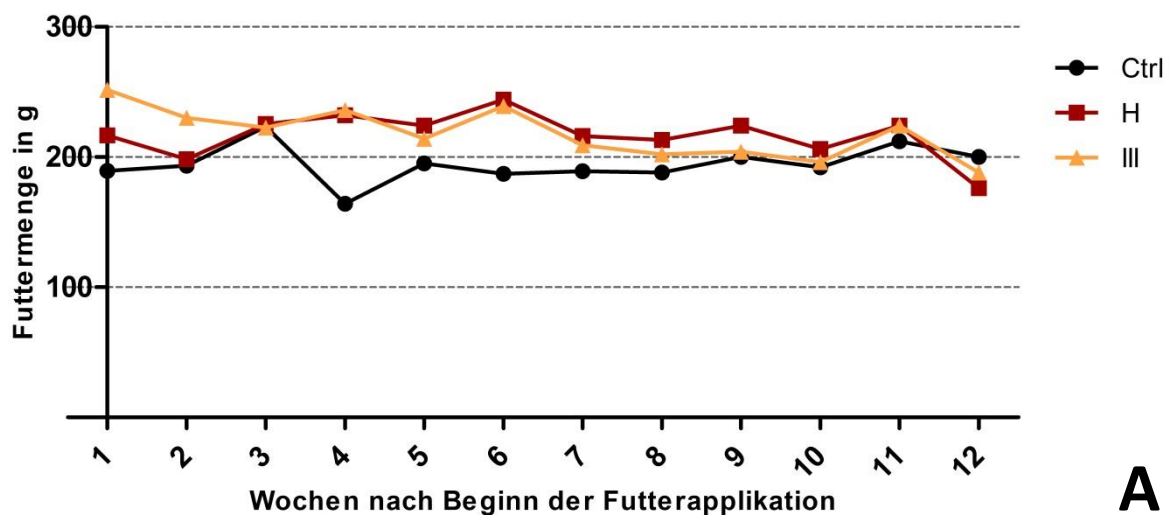


Abb. 16: Gefressene Futtermenge pro Ratte (Gefressene Gesamtmenge pro Käfig/Rattenanzahl). Vitamin D₃-reduzierte Gruppen (Ctrl, H, III) mit weitestgehend stabilem Verlauf.

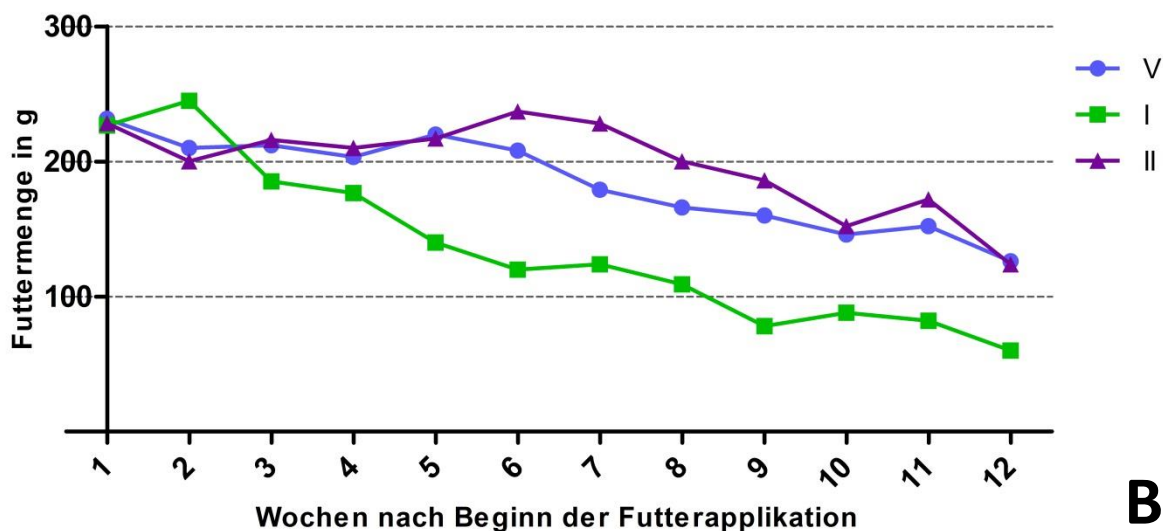


Abb. 17: : Gefressene Futtermenge pro Ratte (Gefressene Gesamtmenge pro Käfig/Rattenanzahl). VD-Volldosis-Gruppen (V, I, II) mit einem deutlichen Abwärtstrend im Verlauf.

4.1.3. Kardiale Masse (ex vivo)

Die ermittelte Masse des Herzens (Gewicht des explantierten Herzens) zum Ende des Versuches zeigte weniger deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Futtergruppen, vor allem aber eine weniger deutliche Entwicklung zwischen den Explantationszeitpunkten als ermittelten Werte für die Gesamtkörpermasse. Diejenigen Gruppen mit einem durchschnittlich höheren Körpergewicht zeigten aber auch ein durchschnittlich höhere kardiale Masse (Herzgewicht). Zur näheren Erläuterung dient Tabelle 3 mit den absoluten Werten für die kardiale Masse ausgewählter Futtergruppen.

	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
Ctrl	0,978 ± 0,027 g	1,198 ± 0,051 g	1,115 ± 0,037 g
H	1,322 ± 0,04 g	1,368 ± 0,104 g	1,402 ± 0,042 g
V	1,165 ± 0,057 g	1,118 ± 0,075 g	1,078 ± 0,034 g
p (V vs. H)	0,027	0,053	0,0003

Tabelle 3: Kardiale Masse der Gruppen Ctrl, H und V unmittelbar nach der Explantation. Ähnliche Tendenzen zwischen den Futtergruppen im Vergleich mit dem Körpergewicht.

4.1.4. Echodaten vor der Explantation

Zur Beurteilung der Herzfunktion und des Stenosegrades wurden die Tiere vor der Euthanasie echokardiographiert. Die Echokardiographie wurde immer durch denselben, in dieser Technik erfahrenen Untersucher durchgeführt, um Intra- und Inter-Observer-Abweichungen minimieren zu können.

Es zeigte sich zu keinem Explantationszeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Futtergruppen sowie im Vergleich zur Referenzgruppe hinsichtlich der Werte des LVIDd und LVIDs, des *fractional shortening*, sowie der links-ventrikulären Ejektionsfraktion, wie Abbildung 18 darstellt. Eine systolische Funktionsreduktion und eine linksventrikuläre Dilatation können somit ausgeschlossen werden. Da der enorme Datenumfang an dieser Stelle übersichtlich dargestellt werden soll und bei allen degenerativen Prozessen ein

kontinuierlicher Prozess unterstellt werden darf, ist die Darstellung der Echokardiographie-Parameter auf den Zeitpunkt nach 12 Wochen Futterapplikation beschränkt.

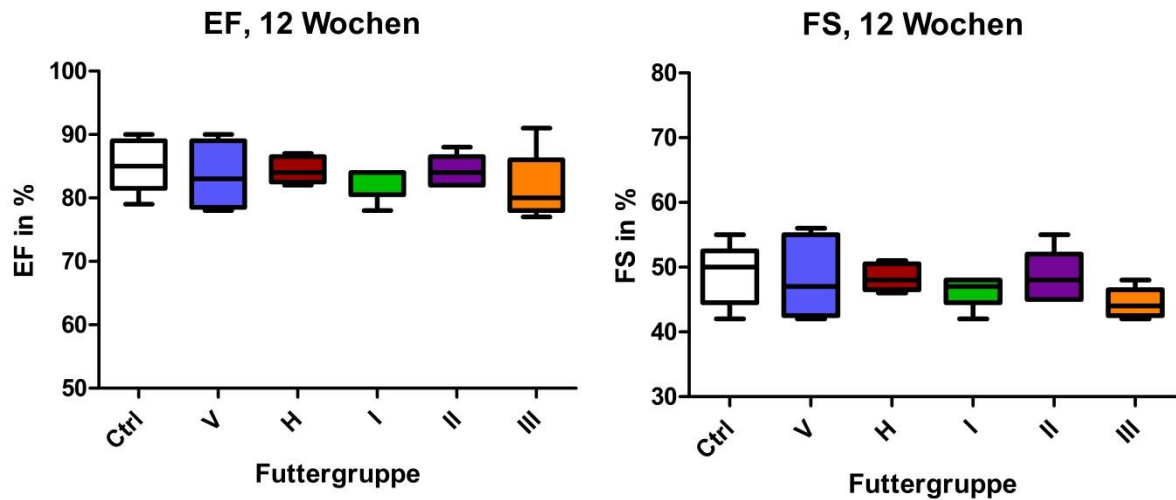


Abb. 18: Echokardiographie-Daten. Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) und *fractional shortening* (FS) nach 12 Wochen Futterapplikation ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Bei der Erhebung der Druckgradienten über der Aortenklappe als funktionellem Parameter einer Aortenklappenstenose konnte bei den Tieren der Gruppen H und III nach 12 Wochen eine statistisch signifikante Erhöhung der Druckgradienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Demzufolge kann bei diesen Tieren von einer Funktionseinschränkung im Sinne einer zunehmenden Stenosierung ausgegangen werden (Ctrl: $3,8 \pm 0,83$ mmHg; V: $6,7 \pm 0,92$ mmHg; H: $10,74 \pm 1,29$ mmHg; I: $5,2 \pm 0,77$ mmHg; II: $5,05 \pm 1,29$ mmHg; III: $8,8 \pm 0,8$ mmHg; p [Ctrl vs. H] = 0,001).

4.1.5. Serumwerte zum Zeitpunkt der Explantation

Die Blutserumanalyse zeigte die metabolischen Unterschiede der verschiedenen Futtergruppen auf. Alle VD-haltigen Futtergruppen zeigten bereits nach 4 Wochen Fütterung eine signifikante Serumkalziumerhöhung. Diese war auch nach 12 Wochen Fütterung nachweisbar. Eine Auswahl an absoluten Werten zeigt Tabelle 4.

	4 Wochen	12 Wochen
Ctrl	$2,45 \pm 0,07$ mmol/l	$2,53 \pm 0,05$ mmol/l
H	$2,99 \pm 0,08$ mmol/l	$2,98 \pm 0,1$ mmol/l
V	$3,1 \pm 0,13$ mmol/l	$3,18 \pm 0,03$ mmol/l
III	$2,59 \pm 0,06$ mmol/l	$2,35 \pm 0,09$ mmol/l
p (V vs. H)	0,21	0,04
p (V vs. III)	0,003	< 0,0001

Tabelle 4: Serumkalzium-Werte. Ausgewählte Futtergruppen zu den Explantationszeitpunkten nach 4 und 12 Wochen.

Abbildung 19 gibt einen Überblick über die Serumkalziumwerte aller Futtergruppen. Zusätzlich zu den hier dargestellten Signifikanzen ist nach 4 und nach 12 Wochen der Unterschied zwischen der Futtergruppe ohne VD (III) und allen anderen prokalzifizierenden Futtermischungen signifikant.

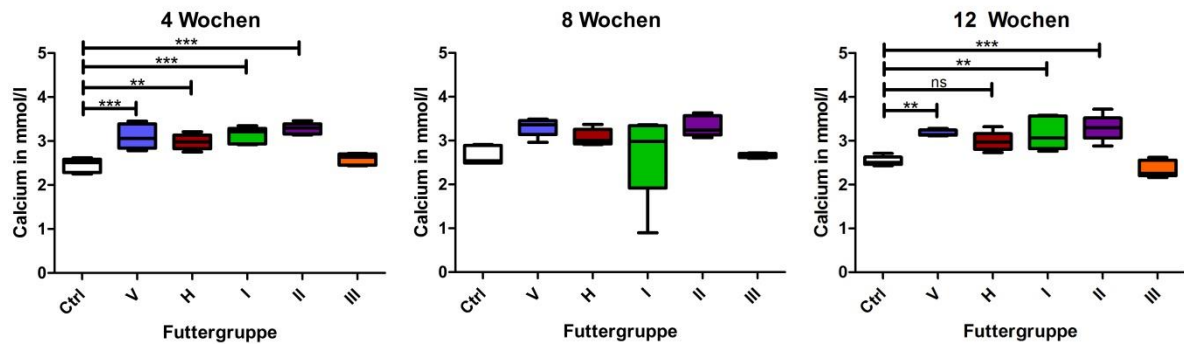


Abb. 19: Serumkalzium. Signifikante Erhöhung der Werte aller VD-haltigen Futtergruppen sowie Erniedrigung der Werte der prokalzifizierenden Futtergruppe ohne VD (III) nach 4 und 12 Wochen Fütterung.

Abbildung 20 stellt das Serum-Gesamtcholesterin und den Anteil des LDL dar. In Tabelle 5 sind einige absolute Serum-LDL-Werte näher aufgeführt. Über den gesamten Beobachtungszeitraum zeigten alle Futtergruppen mit Zusätzen eine Erhöhung der Cholesterin-Serumwerte im Vergleich zur Normalfuttergruppe, wobei sich der Unterschied zu späteren Untersuchungszeitpunkten verringerte. Nur die Volldosis-Härtefuttergruppe zeigt zu allen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung des Gesamtcholesterins und -LDL im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 4 und 8 Wochen ist das Gesamtcholesterin aller VD-haltigen Futtergruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
Ctrl	3,0 ± 0,32 mg/dl	7,2 ± 2,11 mg/dl	10,4 ± 1,44 mg/dl
H	32,2 ± 4,53 mg/dl	54,4 ± 5,45 mg/dl	40,8 ± 5,07 mg/dl
V	37,8 ± 8,19 mg/dl	51,4 ± 5,05 mg/dl	58,6 ± 13,96 mg/dl
I	11,0 ± 1,05 mg/dl	29,0 ± 4,74 mg/dl	20,4 ± 2,79 mg/dl
p (V vs. H)	0,079	0,35	0,13
p (V vs. I)	0,006	0,006	0,014

Tabelle 5: Serum-LDL-Werte. Ausgewählte Futtergruppen.

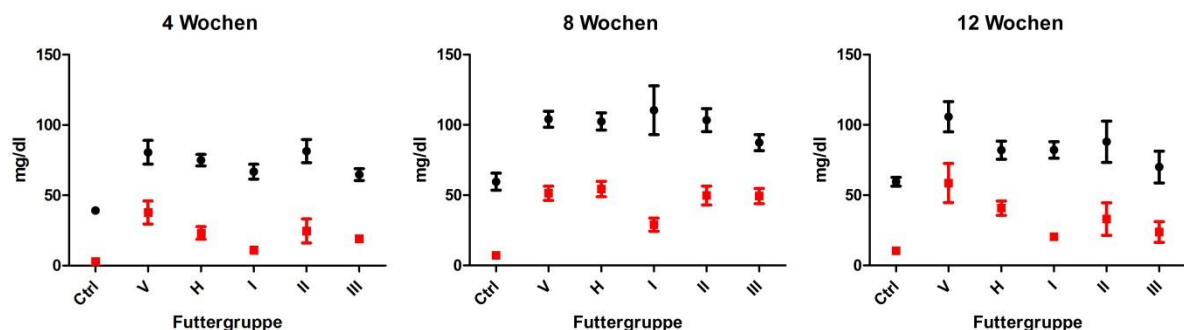


Abb. 20: Serum-Gesamtcholesterin (●) und -LDL (■). Erhöhung der Gesamtcholesterinwerte aller Futtergruppen mit Zusätzen einschließlich der Futtergruppe ohne Cholesterinzusatz im Vergleich zur Normalfuttergruppe sowie signifikante Erhöhung des Gesamtcholesterins und -LDL der Volldosis-Härtefuttergruppe zu allen Zeitpunkten.

Besonders auffällig ist die Futtergruppe ohne Cholesterinzusatz (I), deren Serum-Gesamtcholesterin auch erhöht war. Sie hat allerdings zu allen Zeitpunkten im Vergleich zur Volldosis-Härtefuttergruppe und nach 8 Wochen auch im Vergleich Halbdosis-Härtefuttergruppe ein signifikant niedrigeres LDL. Nach 8 Wochen ist der Unterschied im Serum-LDL zur Kontrollgruppe bei allen Futtergruppen, die Cholesterin enthalten, signifikant ($p < 0,0001$). Das

Verhältnis von LDL/HDL zeigt während des gesamten untersuchten Zeitraumes eine signifikante Erhöhung der Volldosis- und Halbdosis-Härtefuttergruppe.

Das Serum-HDL ist nach 4 Wochen sowohl in der Futtergruppe ohne Cholesterin (I, $p = 0,0001$) als auch in der ohne DCP (II, $p = 0,0019$) signifikant erhöht. Nach 12 Wochen ist das HDL der Gruppe ohne Cholesterin nur noch im Vergleich zur Gruppe ohne VD signifikant höher ($p = 0,0075$).

Der 4-Wochen-Serum-Harnstoff der Volldosis-Härtefuttergruppe ($p = 0,0014$), der Gruppe ohne Cholesterin ($p = 0,0002$) und derjenigen ohne VD ($p = 0,0024$) ist im Vergleich zur Normalfuttergruppe signifikant verringert. Die Serum-Glukose der VD-losen Gruppe ist nach 12 Wochen nur im Vergleich zur Halbdosis-Härtefuttergruppe signifikant höher ($p = 0,0139$), nicht aber zu den anderen Zeitpunkten oder im Vergleich mit der Kontrollgruppe beziehungsweise den anderen Gruppen. Bei der Bestimmung der Serumwerte von Phosphat, Kreatinin und Triglyceriden ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Futtergruppen.

4.2. Histologie

Bei der Beurteilung der *Aortae ascendentes* wurden jeweils 3 Regionen berücksichtigt, um einen umfassenden Überblick über dieses Organ gewährleisten zu können.

4.2.1. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Diese Routine-Standardfärbung bietet einen guten Überblick über die kryotomierten Organe. Je eine Übersicht der beiden Organe bieten die Aufnahmen in Abbildung 21. In keinem der Organe waren morphologisch infiltrierende inflammatorische Zellkonglomerate oder andere Zellvermehrungen auffällig.

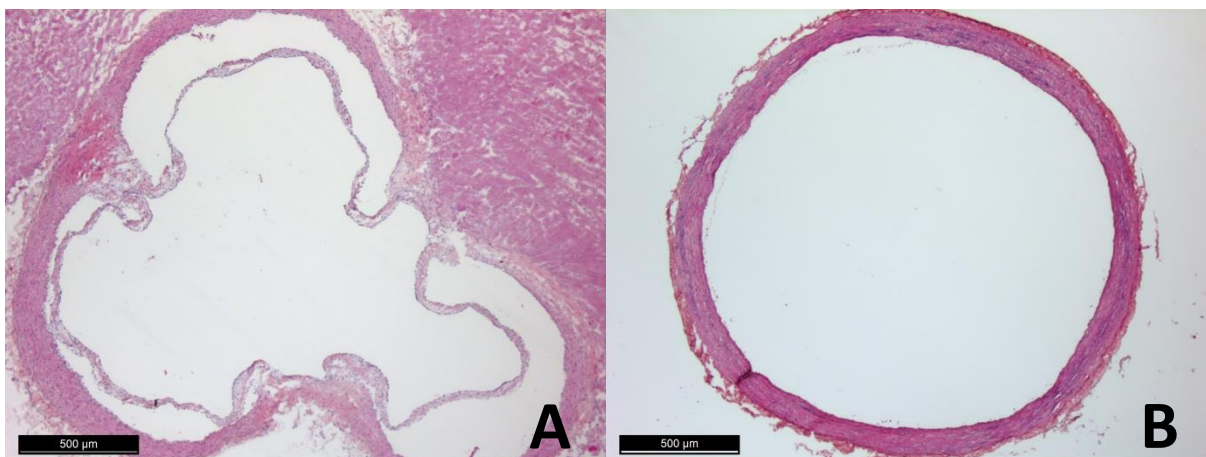


Abb. 21: HE-Färbung. Übersichtsaufnahmen der Aortenklappenregion (A, Normalfüttertier 8 Wochen nach Beginn der Fütterung) und *Aorta ascendens* (B, Härtefüttertier 12 Wochen nach Beginn der Fütterung). Maßstabsbalken = 500 µm.

4.2.2. Von-Kossa Färbung

Diese Färbung ermöglicht eine deutliche Abgrenzung kalzifizierter Regionen, bzw. Hydroxylapatit-Einlagerungen, gegenüber anderem Gewebe. Die Tiere mit voller Vitamin-D₃-Dosis im Futter zeigten zu allen Zeitpunkten eindeutig eine stärkere Kalzifizierung als jene mit reduzierter VD-Dosis oder ohne VD. Das Kalzifizierungsmuster in den Schnitten der *Aorta ascendens* zeigte eine Betonung der Media, wie aus Abbildung 22 ersichtlich ist, und weniger stark der Intima.

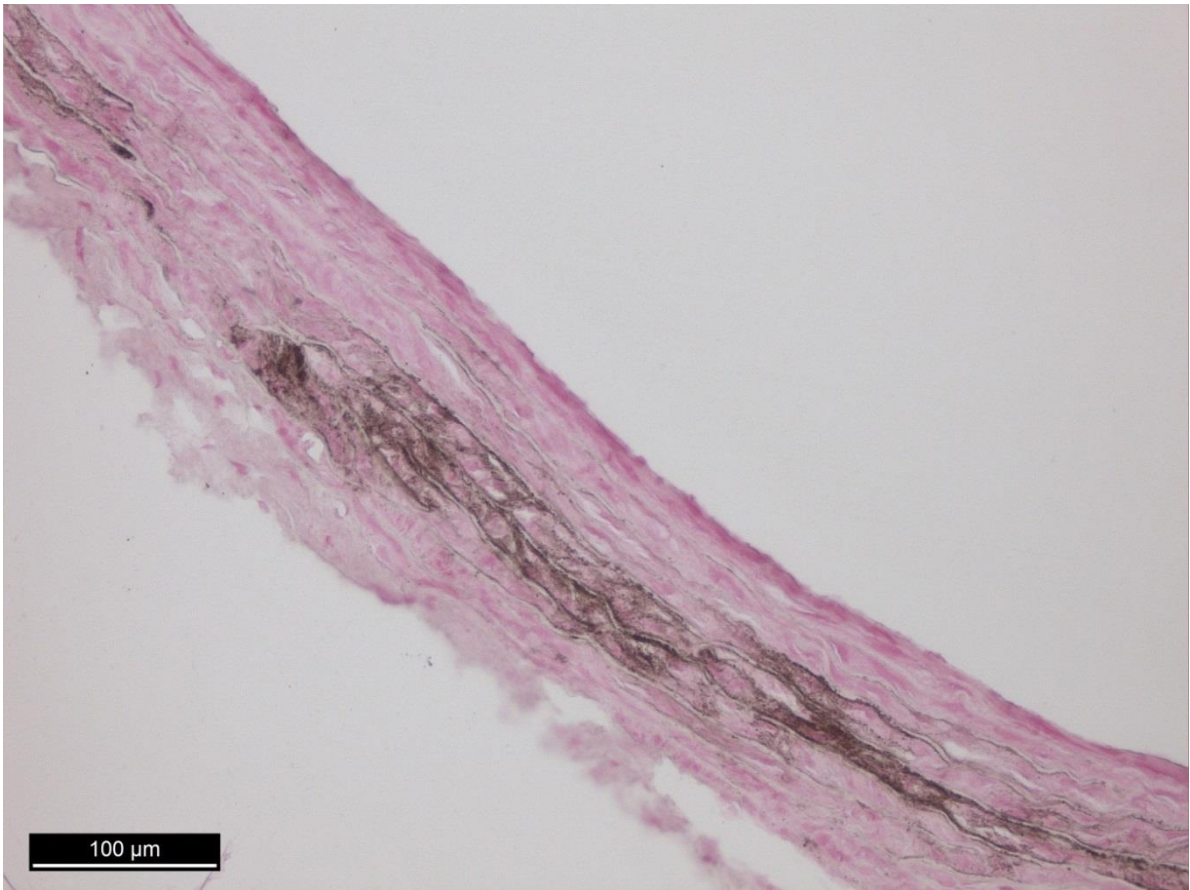


Abb. 22: Deutliche Media-Kalzifizierung. *Aorta ascendens* eines Tieres nach 12 Wochen Vollfutter-Applikation in Von-Kossa-Färbung mit deutlich abgrenzbaren Hydroxyapatiteinlagerungen in der Media.

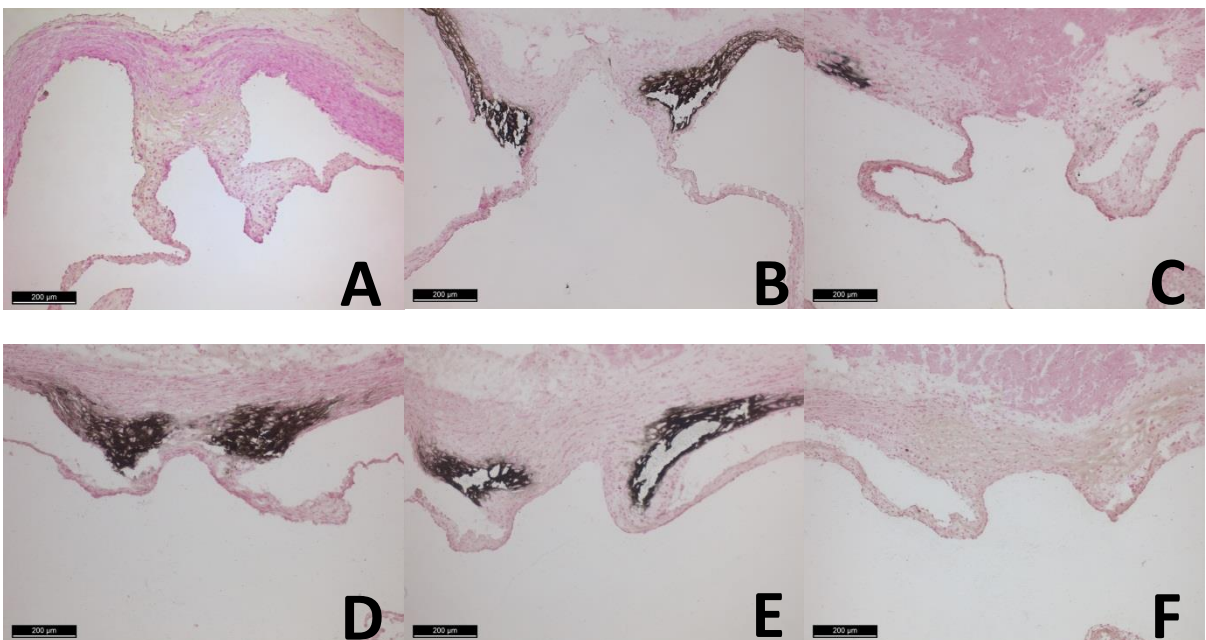


Abb. 23: Kalzifizierung der Aortenklappenkommissuren. Übersicht zum Vergleich repräsentativer Aortenklappenansätze in Von-Kossa-Färbung nach 12 Wochen Fütterung mit Normalfutter (A, aus [178]), Volldosis Härtefutter (B), Halbdosis Härtefutter (C), I ohne Cholesterin (D, aus [178]), II ohne DCP (E, aus [178]) und III ohne VD (F, aus [178]). Starke Kalzifizierung in den kommissurennahen Klappenansatzbereichen der Gruppen V, I und II mit voller VD-Dosis sowie geringerer in der Gruppe H mit halber VD-Dosis. Maßstabsbalken = 200 µm.

Auch die Präparate der Tiere mit reduzierter VD-Dosis (H) zeigten einen deutlichen Trend zur Kalzifizierung im Vergleich zu den Futtergruppen ohne VD, wobei diese sich eher als langsam progrediente Mikrokalzifizierung darstellte. Besonders auffällig war, dass die Kalzifizierung zu früheren Explantationszeitpunkten in den kommissurennahen Klappenansatzbereichen stärker ausgeprägt ist, als in den Sinusbereichen des Aortenrings oder den Schnitten der *Aorta ascendens*. Einen repräsentativen Eindruck der einzelnen Futtergruppen nach 12 Wochen Fütterung gibt Abbildung 23.

4.2.3. Von-Kossa-Score

Durch den eigens entwickelten Score war es möglich, oben zusammengefasste Beobachtungen zu quantifizieren. Die Ergebnisse der Auswertung der *Aortae ascendentes* zeigt Abbildung 24. Zusätzlich zu den hier dargestellten Signifikanzen ergeben sich folgende: In Woche 8 ist der Unterschied der Futtergruppen ohne VD (Ctrl und III) zu den Gruppen V und I signifikant (III vs. V: $p = 0,0132$). In Woche 12 ist der Unterschied dieser beiden Gruppen zu allen VD-haltigen Gruppen signifikant (III vs. V: $p < 0,0001$). Die Volldosis-Härtefuttergruppe ist zu diesem Zeitpunkt signifikant stärker kalzifiziert als alle übrigen Futtergruppen.

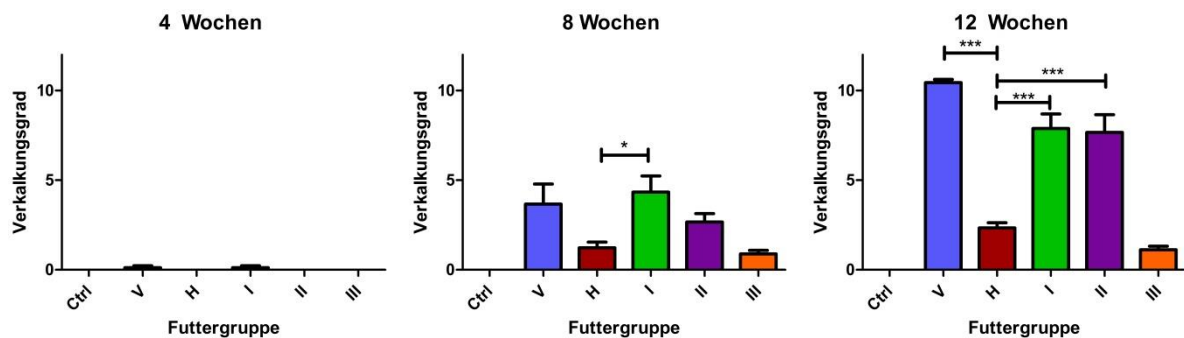


Abb. 24: Von-Kossa-Score Auswertung der Verkalkungsgrade der *Aortae ascendentes*. Deutlich stärkere Kalzifizierung der Aorten aus den Futtergruppen mit voller VD-Dosis im Vergleich mit jenen reduzierter oder ohne VD-Dosis.

Bei der Beurteilung des Aortenklappenrings, die Abbildung 25 veranschaulicht, genügte eine Einteilung in Quadranten nicht, da die verschiedenen Regionen eine unterschiedliche Morphologie zeigten und auch unterschiedliche Verkalkungsstadien in den verschiedenen Regionen auffielen, wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben. Dies verdeutlicht auch Abbildung 26. Wie zuvor beobachtet wird hier deutlich, dass die Kalzifizierung zu früheren Explantationszeitpunkten in den kommissurennahen Klappenansatzbereichen eindeutig stärker ausgeprägt ist als in den Sinusbereichen des Aortenrings. Außer den dargestellten Signifikanzen sind zu allen Zeitpunkten die Unterschiede zwischen den Futtergruppen ohne Vitamin D₃ (Ctrl und III) und denen mit der Höchstdosis (V, I, II) signifikant (III vs. V: Nach 4 Wochen $p = 0,0002$, nach 8 Wochen $p = 0,0048$, nach 12 Wochen $p < 0,001$).

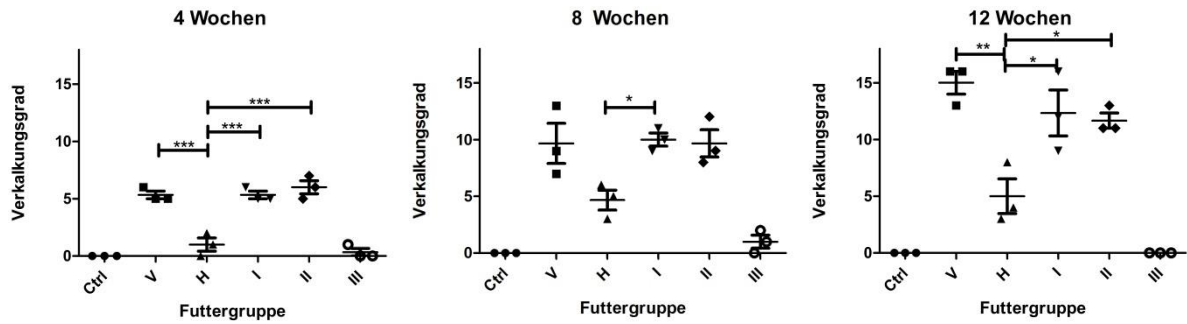


Abb. 25: Von-Kossa-Score Auswertung der Verkalkungsgrade des Aortenklappenrings. Deutlich stärkere Kalzifizierung der Aorten aus den Futtergruppen mit voller VD-Dosis im Vergleich mit jenen reduzierter oder ohne VD-Dosis.

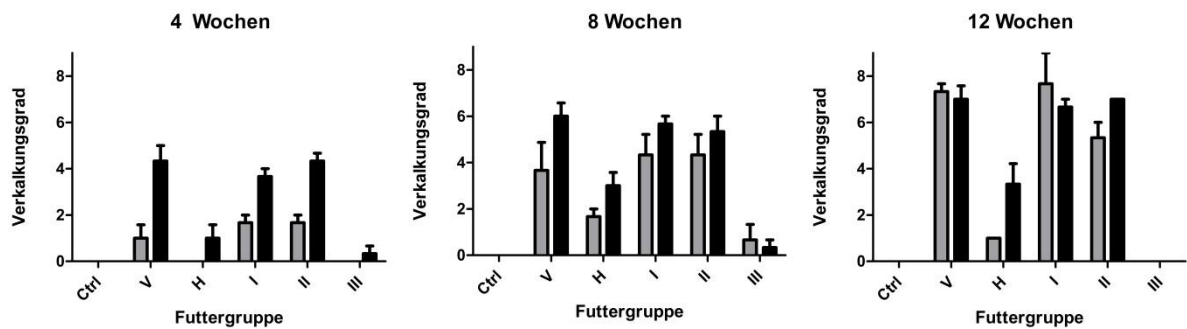


Abb. 26: Von-Kossa-Score des Aortenklappenrings getrennt nach Regionen (schwarz: Kommissurennaher Aortenklappenansatz, grau: Sinus der Aortenwand). Die Kalzifizierung ist insbesondere zu früheren Explantationszeitpunkten in den kommissurennahen Klappenansatzbereichen deutlich stärker ausgeprägt.

Die Klappensegel wurden bei der Beurteilung durch den Score nicht beachtet, da sie wegen der geringen Organgröße in der Mehrheit der Gewebeschnitte nicht zuverlässig vollständig darstellbar waren. Wenn es möglich war, die Klappensegel darzustellen, ging eine starke Kalzifizierung auch immer mit einer Mikrokalzifizierung der Klappensegel einher. Beispiele dafür zeigen die Abbildungen 27 A und B. Eine futtergruppenabhängige Verdickung der Klappensegel konnte nicht nachgewiesen werden.

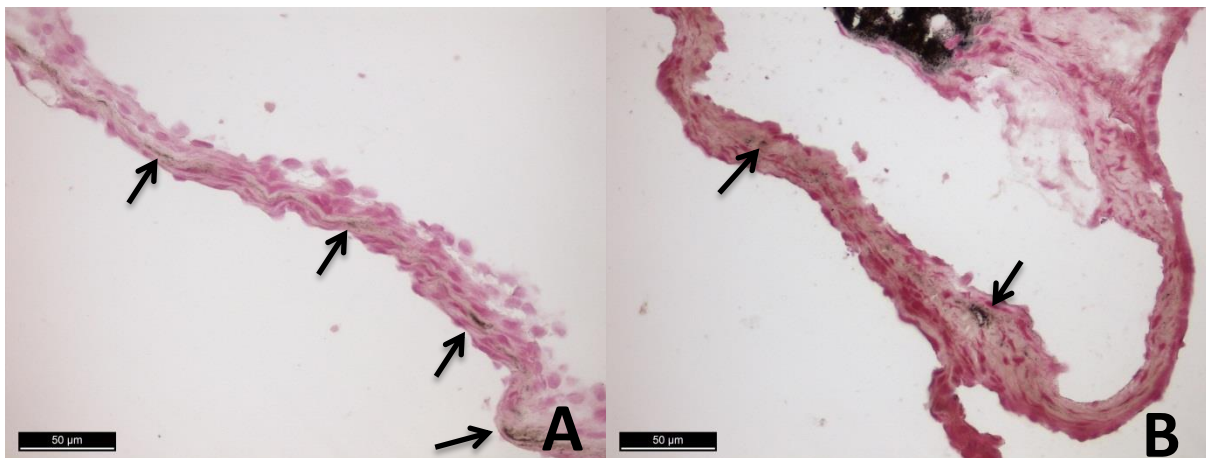


Abb. 27: Kalzifizierte Klappensegel (Pfeilmarkierungen in A und B, A aus [178]). Von-Kossa-Färbung. Maßstabsbalken = 50 µm.

Um es zu ermöglichen, die subjektiven Bewertungen des Kalzifizierungsgrades durch die Von-Kossa-Scores zu validieren und die Scores so zu beurteilen, war es nötig die Kalzifizierung objektiv zu quantifizieren. Dies geschah durch eine semiquantitative, automatisierte Auswertung mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ. Die Abbildungen 28 und 29 zeigen den direkten Vergleich der

durch ImageJ bestimmten relativen verkalkten Fläche mit der Beurteilung durch den Von-Kossa-Score am Beispiel der Tiere 12 Wochen nach Beginn der Futterapplikation. Trotz der unterschiedlichen Schwerpunkte der beiden Beurteilungssysteme zeigen sich in den Abbildungen eindeutig die gleichen Trends in der Unterscheidung zwischen den Futtergruppen. Der Standardfehler der relativen verkalkten Fläche ist meistens etwas höher als bei der subjektiven Beurteilung durch den Von-Kossa-Score.

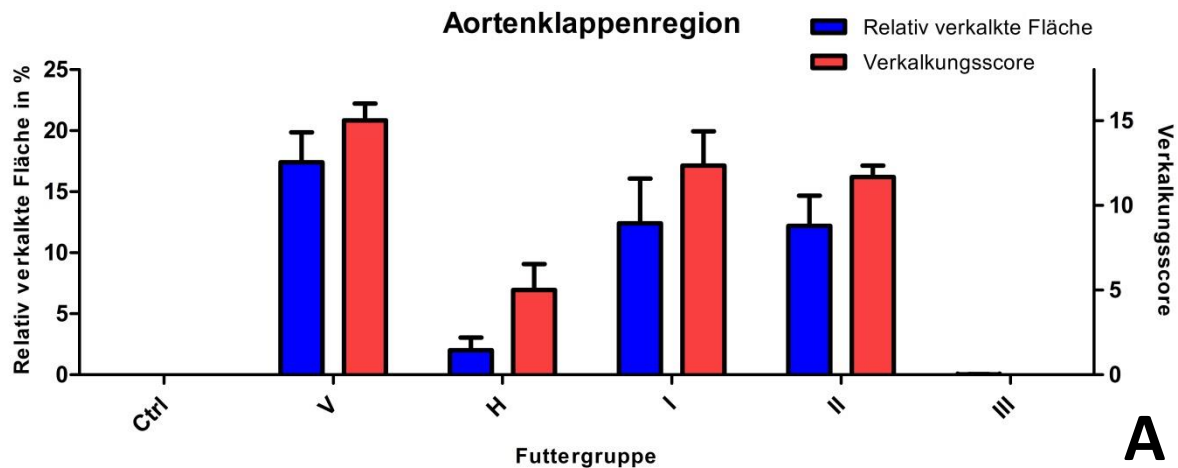


Abb. 28: Von-Kossa-Score-Quantifizierung. Der Vergleich der Bewertung der Aortenklappenregionen (A) durch den Von-Kossa-Score mit der durch ImageJ berechneten relativen verkalkten Fläche zum Explantationszeitpunkt nach 12 Wochen zeigt die gleichen Trends zwischen den Futtergruppen.

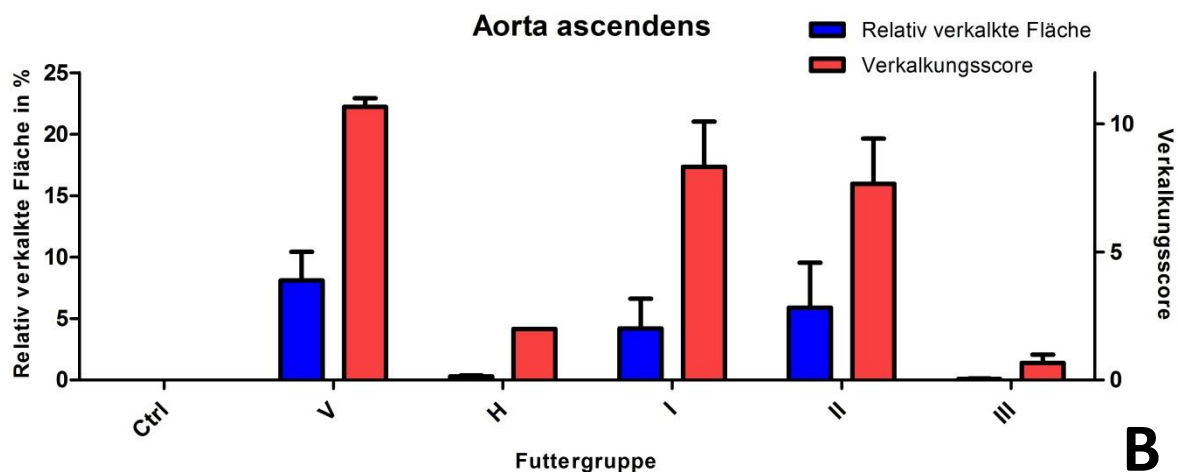


Abb. 29: Von-Kossa-Score-Quantifizierung. Der Vergleich der Bewertung der *Aortae ascendentes* (B) durch den Von-Kossa-Score mit der durch ImageJ berechneten relativen verkalkten Fläche zum Explantationszeitpunkt nach 12 Wochen zeigt die gleichen Trends zwischen den Futtergruppen.

Die Korrelation der beiden Beurteilungssysteme konnte auch statistisch belegt werden. Der Grad des linearen Zusammenhangs zeichnete sich durch einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9498$ bei den Aortenklappenpräparaten sowie $r = 0,8752$ bei den *Aortae ascendentes* aus. Dieser statistisch signifikante Zusammenhang ($p < 0,0001$) wird in Abbildung 30 verdeutlicht.

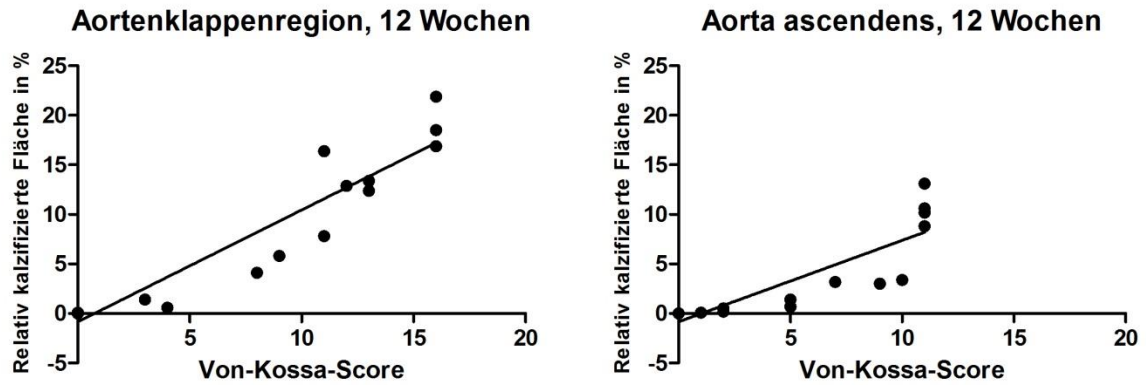


Abb. 30: Korrelation zwischen Von-Kossa-Score und der relativ kalzifizierten Fläche bestimmt mittels ImageJ. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter linearer Zusammenhang im Vergleich der beiden Beurteilungssysteme.

4.2.4. Movat Pentachrom Färbung, Neointimale Hyperplasie

Ein guter Überblick über die Anteile und Verteilung der verschiedenen Gewebearten kann durch die Pentachrom Färbung nach Movat gegeben werden, die, wie zuvor beschrieben leicht modifiziert, auf Gefrierschnitten anwendbar ist.

Ein Unterschied in der Verteilung und in den Anteilen der verschiedenen Gewebearten war zwischen den Futtergruppen nicht auszumachen. Die Ausdehnungen der einzelnen Gewebearten schwankten auch innerhalb der einzelnen Futtergruppen sehr stark. Kalzifizierte Areale imponierten in einem kräftigen Grün- bis Schwarzton. Ein Beispiel für eine nicht verkalkte Aortenklappenregion zeigt Abbildung 32.

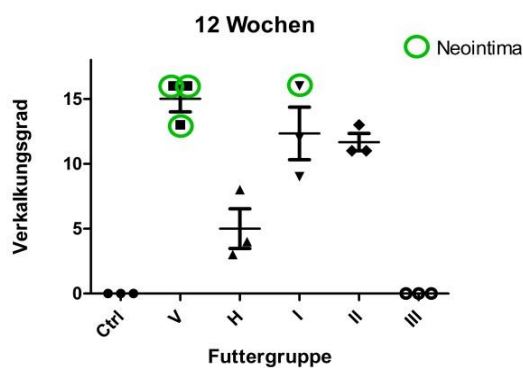


Abb. 31: Neointimale Hyperplasie. Die Markierung der Tiere mit Ausbildung einer Neointima in der Von-Kossa-Score Auswertung der Aortenklappenregionen nach 12 Wochen zeigt, dass es sich um die am stärksten kalzifizierten Aortenklappen handelt.

4 von 60 histologisch ausgewerteten Tieren zeigten in der Aortenwand auf Höhe des Aortenklappenansatzes eine neointimale Hyperplasie mit phänotypisch spindelförmigen Zellen. Diese Hyperplasie war in der Pentachrom Färbung nach Movat besonders eindrucksvoll sichtbar. Es handelte sich dabei um dieselben Tiere, die auch in der Bewertung mit Hilfe des Von-Kossa-Scores die höchsten Punktzahlen erreichten, also durch die größte Kalzifizierung hervorstachen, wie das Diagramm in Abbildung 31 deutlich macht. Ein Beispiel für die neointimale Hyperplasie zeigt die Abbildung 33 in Übersicht und als Detailaufnahme.

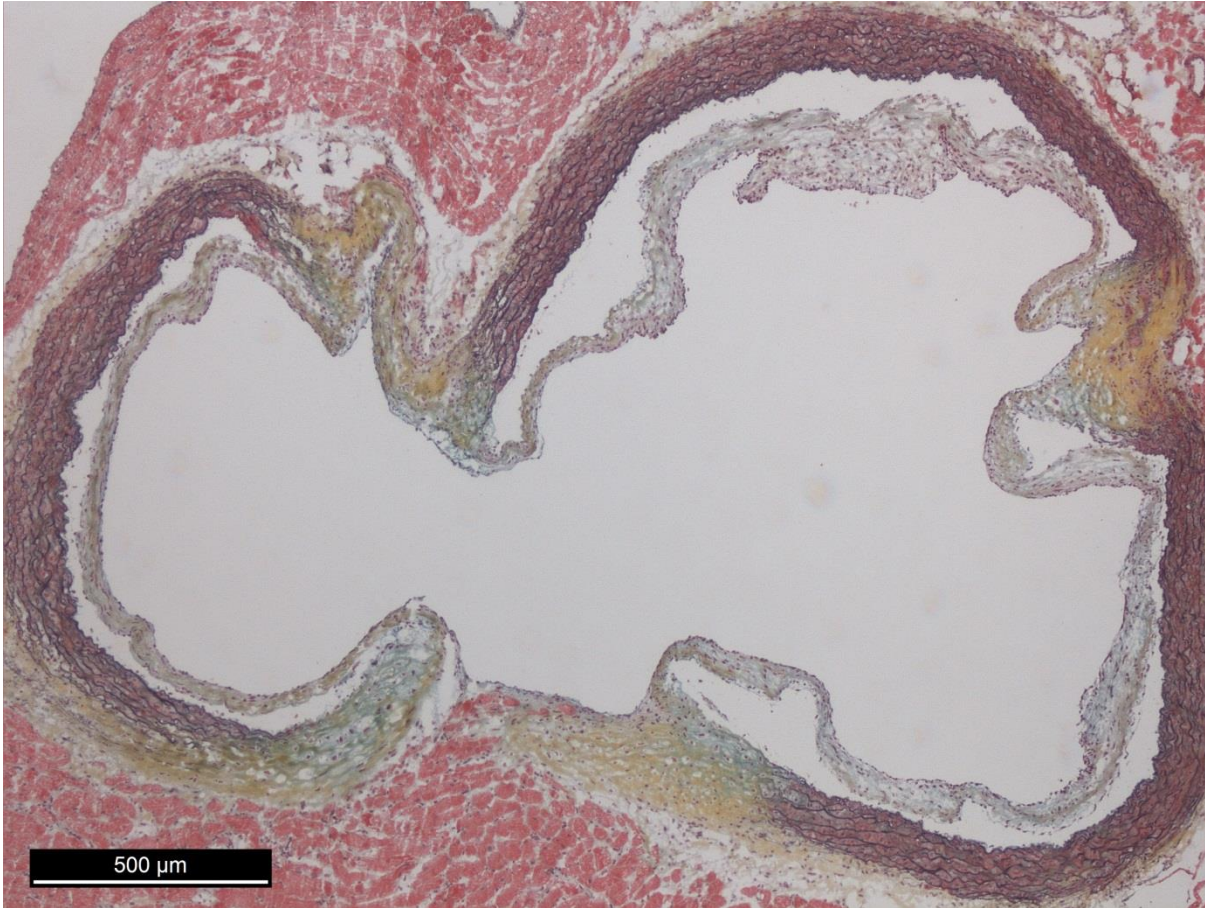


Abb. 32: Movat Pentachrom Färbung. Übersichtsaufnahme des Präparats der Aortenklappenregion eines Tieres aus Futtergruppe III (kein VD), 12 Wochen nach Beginn der Futterapplikation, mit gut erhaltenen Klappensegeln (aus [178]).

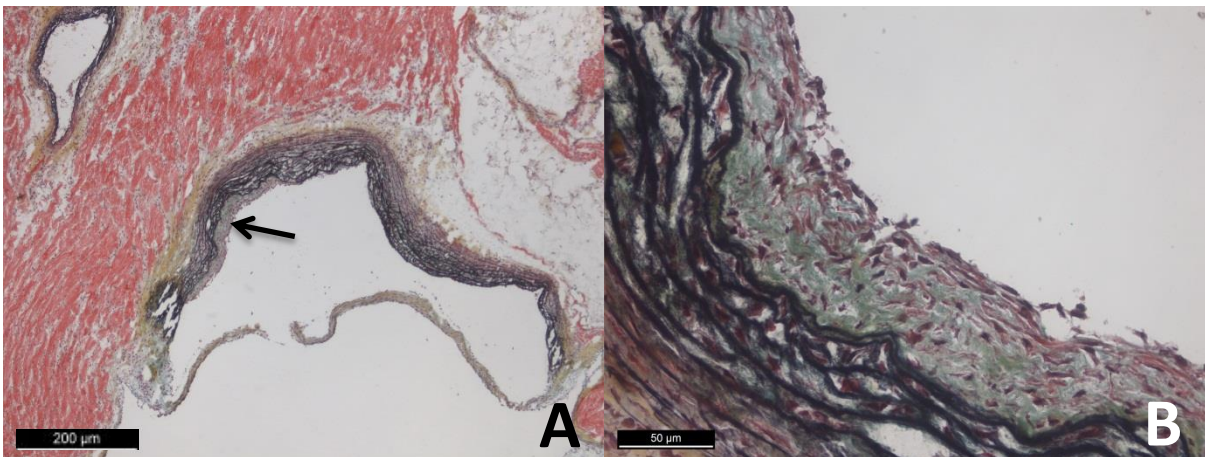


Abb. 33: Neointimale Hyperplasie. Movat Pentachrom Färbung als Übersicht (A, aus [178], Pfeil markiert Neointima, Maßstabsbalken = 200 µm) und im Detail (B, Maßstabsbalken = 50 µm).

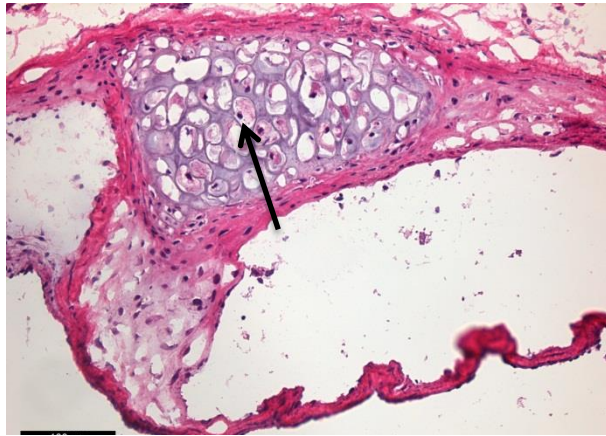


Abb. 34: Vakuolen (Pfeil) in Aortenklappenkommissurnähe. HE-Färbung, Maßstabsbalken = 100 µm.

4.2.5. Oil Red O Färbung, Lipidvakuolen

Da in den Übersichtsfärbungen der Aortenklappenansatzregionen, sowohl im Kommissurenbereich als teilweise auch in den Sinus, einige Zellen imponierten, die morphologisch Lipidvakuolen ähnelten (Abbildung 34, aus [178]), wurde diese Färbung zum Lipidnachweis durchgeführt.

Alle Vakuolen färbten sich in der Oil Red O Fettfärbung eindeutig rot (positiv), wie die Abbildungen 35B und 36 zeigen.

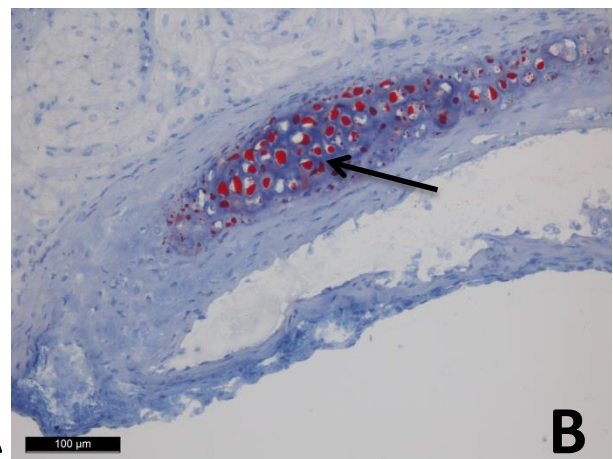
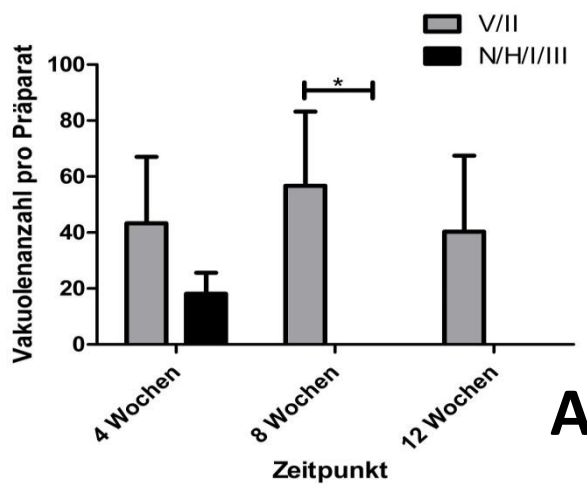


Abb. 35: Lipidvakuolen. Persistenz in den Tieren mit voller VD- und Cholesterin- Dosis über den gesamten Beobachtungszeitraum, ersichtlich an der Anzahl pro Aortenklappenbereich-Präparat, getrennt nach Futtergruppen mit voller (V/II) und reduzierter oder ohne (N/H/I/III) VD und Cholesterin Dosis (A). Oil Red O positive Färbung (B) der Vakuolen (Pfeil). Maßstabsbalken = 100 µm.

Während zum frühen Zeitpunkt nach 4 Wochen Fütterung die Vakuolen in Tieren aller Futtergruppen zu finden waren, persistierte das Vorkommen der Vakuolen nach 12 Wochen nur in den Gruppen mit der vollen Dosis VD und Cholesterin, wie das Diagramm in Abbildung 35A anschaulich macht. Außerhalb dieser bereits morphologisch adipozytoiden Zellen fiel in der Oil Red O Färbung keine Region durch eine positive Färbung auf.

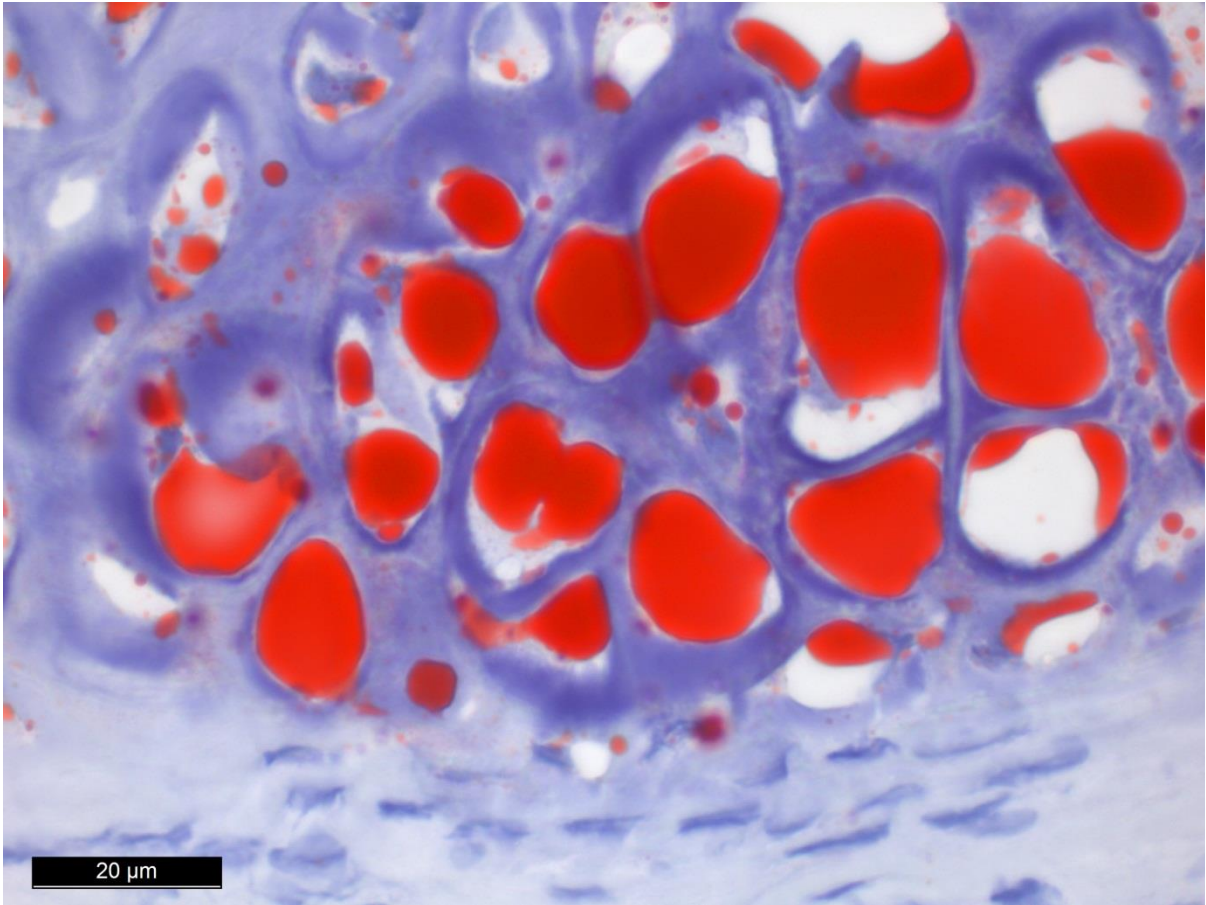


Abb. 36: Lipidvakuolen. Repräsentative Detailaufnahme der Lipid-positiven Vakuolen in Aortenklappenkommissur (Oil Red O Färbung).

Die Vakuolengröße variierte zwischen einem minimalen Durchmesser von 5-9 µm und einem maximalen Durchmesser von 15-57 µm, je nach Präparat. Der durchschnittliche Vakuolendurchmesser, bestimmt an einer Stichprobe von 10 Vakuolen je Präparat, betrug 16 ± 5 µm. Höhere Vakuolenzahlen gingen mit größeren Durchmessern einher, wobei die Gruppen mit der vollen Dosis VD und Cholesterin (V und II) durch eine größere Vakuolenanzahl auffielen.

4.3. Immunfluoreszenzen

4.3.1. CD3/CD68

Durch eine Doppelfärbung mit Anti-CD3- und Anti-CD68-Antikörpern sollte eine Aussage über Makrophagen- (CD68) oder Lymphozyten-Infiltrate (CD3) getroffen werden. Dazu wurden die Präparate der Voll- und Halbdosis Härtefuttergruppe sowie der Normalfuttergruppe nach 12 Wochen Fütterung gefärbt. Die Immunfluoreszenzen ergaben kein positives Signal, wie in Abbildung 37 A anhand eines Volldosis-Härtefuttertieres nach 12 Wochen Futterapplikation dargestellt wird (Abbildung 37 B: Analoge Stelle in Von-Kossa-Färbung). Die Validität der Färbung wurden anhand einer Positivkontrolle durch die Färbung einer Ratten-Milz gewährleistet. Es war somit kein inflammatorisches Infiltrat in den kardiovaskulären Präparaten der verschiedenen Futtergruppen lokalisierbar.

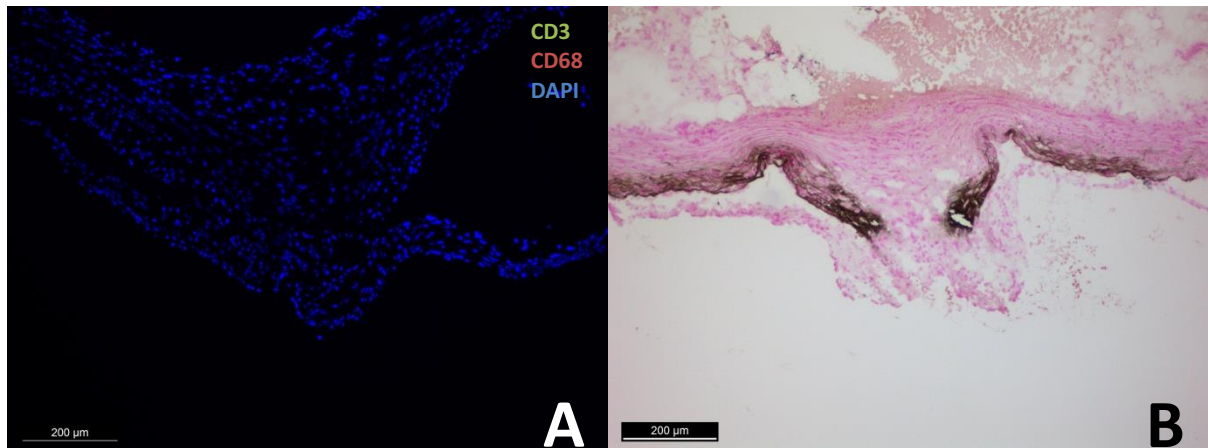


Abb. 37: Keine lokalisierbaren CD-3- oder CD-68-positiven Zellen. Negative Anti-CD3 und -CD68 Immunfluoreszenz (A) einer Aortenklappenkommissur eines Volldosis-Härtefutter-Tieres nach 12 Wochen Fütterung, sowie analoge Stelle nach von Kossa gefärbt (B) mit deutlicher Kalzifizierung. Maßstabsbalken = 200 µm.

4.3.2. α -Smooth-muscle-actin

Wie zu erwarten zeigten die glatten Myozyten der Aortenwand homogen ein positives Signal bei einer Färbung mit dem Anti- α -Smooth-muscle-actin(SMA)-Antikörper. Ein Beispiel dafür zeigt Abbildung 39D. Besonders fiel auf, dass dieses positive Signal in einigen Regionen, die besonders von der starken Kalzifizierung betroffen waren, teilweise nicht vorhanden war. Hier imponierten einige Stellen in Volldosis-Härtefutter-Tieren nach 12 Wochen, in denen es zwar ein positives DAPI-Signal gab, in denen also noch vitale Zellen existierten, die allerdings ein negatives α -SMA-Signal zeigten. Ein Beispiel mit der analogen Stelle in der Färbung nach von Kossa zeigen die Abbildungen 38 A – 39 C. Ein weiterer Unterschied zwischen den Futtergruppen war nicht auszumachen.

Um die α -SMA-negativen Zellen näher zu klassifizieren, wurde an den entsprechenden Präparaten in den Organen eine Anti-Desmin-Immunfluoreszenz derselben Regionen durchgeführt.

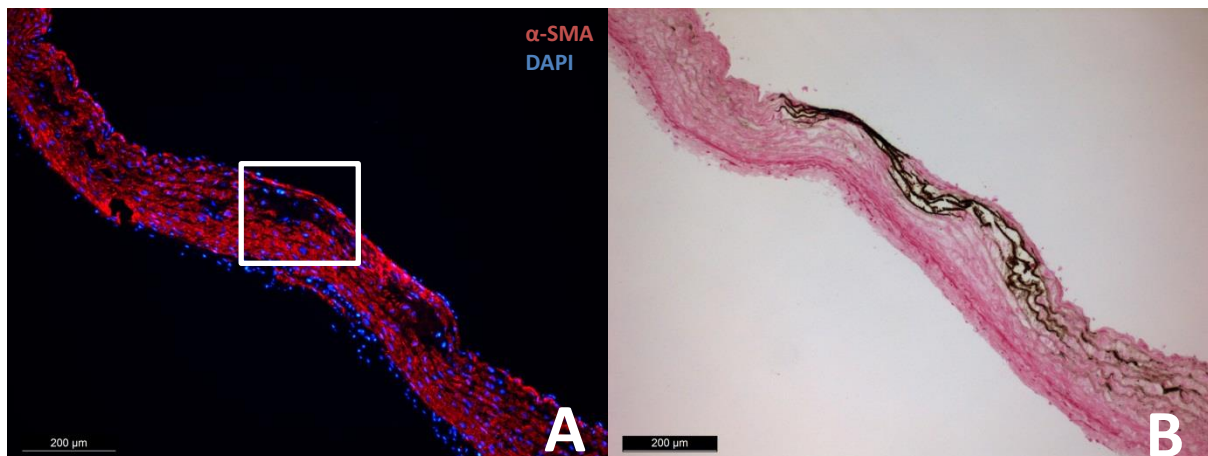


Abb. 38: α -SMA. Aortenwand eines Volldosis Härtefuttertieres nach 12 Wochen in Anti- α -SMA-Immunfluoreszenz (A, Maßstabsbalken = 200 µm) mit Arealen mit Anti- α -SMA-negativem Signal im Bereich starker Kalzifizierung, sichtbar anhand der analogen Stelle in von Kossa Färbung (B, Maßstabsbalken = 200 µm).

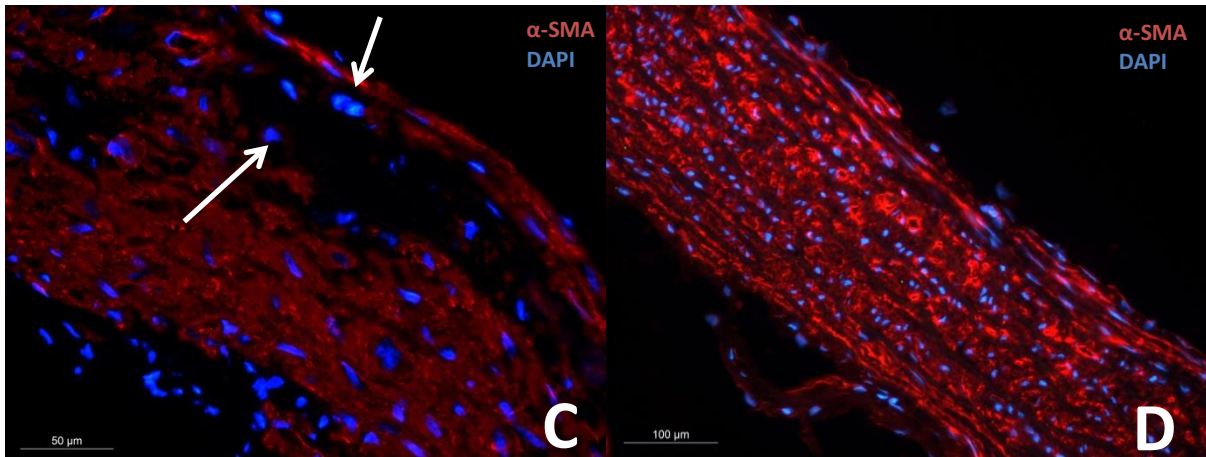


Abb. 39: α -SMA. Die Vergrößerung der in 38A markierten Stelle (C Maßstabsbalken = 50 μ m) zeigt deutlich das DAPI-positive Signal im entsprechenden Bereich, was vitalen Zellen entspricht. Durchweg positives Anti- α -SMA-Signal in nicht kalkifizierten Regionen anhand eines Tieres der Futtergruppe III ohne VD nach 12 Wochen (D, Maßstabsbalken = 100 μ m).

4.3.3. Desmin

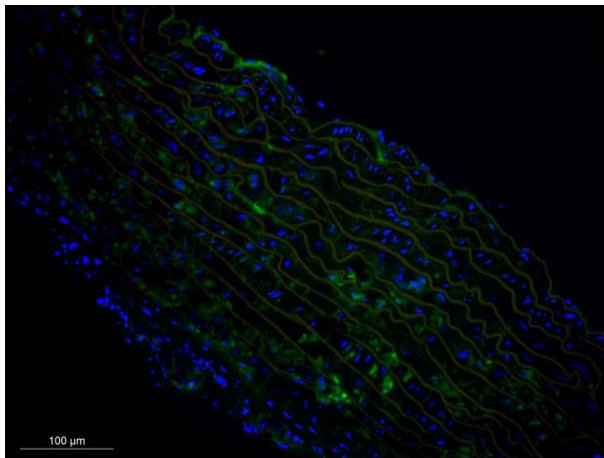


Abb. 40: Desmin. Positives Signal in einer Anti-Desmin Immunfluoreszenz der Aortenwand eines Volldosis-Härtefutertieres nach 12 Wochen Fütterung entsprechend einem unauffälligen Befund. Maßstabsbalken = 100 μ m.

Die Zellen der Aortenwand in der Anti-Desmin-Färbung zeigten ein teilweise positives Signal, das sich nicht von dem einer gesunden Aortenwand unterschied. Die zuvor beschriebenen α -SMA-negativen Regionen deckten sich nicht mit den positiven Stellen in der Anti-Desmin-Färbung. Die Abbildungen 41 A und B zeigen die gleiche Region eines Volldosis-Härtefutertieres im direkten Vergleich. Abbildung 40 stellt einen Aortenwandabschnitt eines weiteren Volldosis-Härtefutertieres nach 12 Wochen dar, um die Verteilung der Desmin-positiven Zellen über der gesamten Wandbreite zu verdeutlichen.

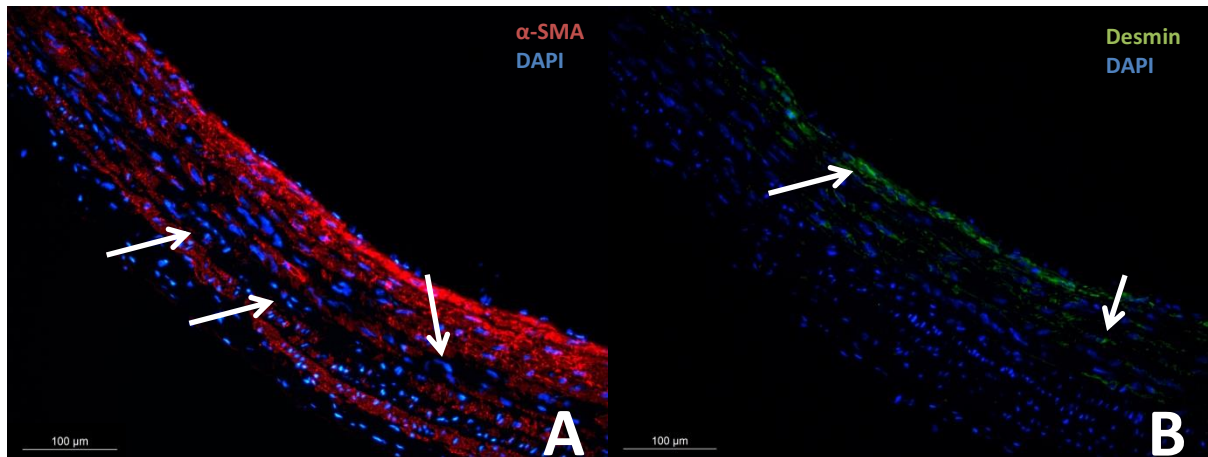


Abb. 41: Desmin. Desmin-positive Zellen (Pfeilmarkierungen in B) sowie negatives Signal in einer Anti-Desmin Immunfluoreszenz der Aortenwand eines Volldosis-Härtefuttermitteltieres nach 12 Wochen (B) im Bereich der α -SMA-negativen Regionen in der Aortenwand (Pfeilmarkierungen in A, analoge Stelle zu B). Maßstabsbalken = 100 μ m.

4.3.4. Syndecan-3

Die Regionen des Aortenklappenansatzes fielen zusätzlich durch einige Zellen mit einem chondroiden Zellphänotyp auf. Diese Zellen imponierten besonders in den Präparaten, die eine ausgeprägte Ansammlung an Adipozyten (siehe Oil Red O Färbung, Lipidvakuolen) zeigten, und traten an den Übergangsbereichen zu den kalzifizierten Arealen auf. Dies ist beispielhaft in Abbildung 42 A anhand der Sinusregion eines Tieres der Volldosis-Härtefuttergruppe nach 8 Wochen Fütterung dargestellt. In diesen Regionen mit morphologisch chondroiden Zellen wurde der Biomarker einer frühen chondrozytären Differenzierung Syndecan-3 nachgewiesen, wie in Abbildung 42 B zeigt. Syndecan-3 wird im Rahmen der chondrogenen Transformation auch im Interstitium exprimiert.

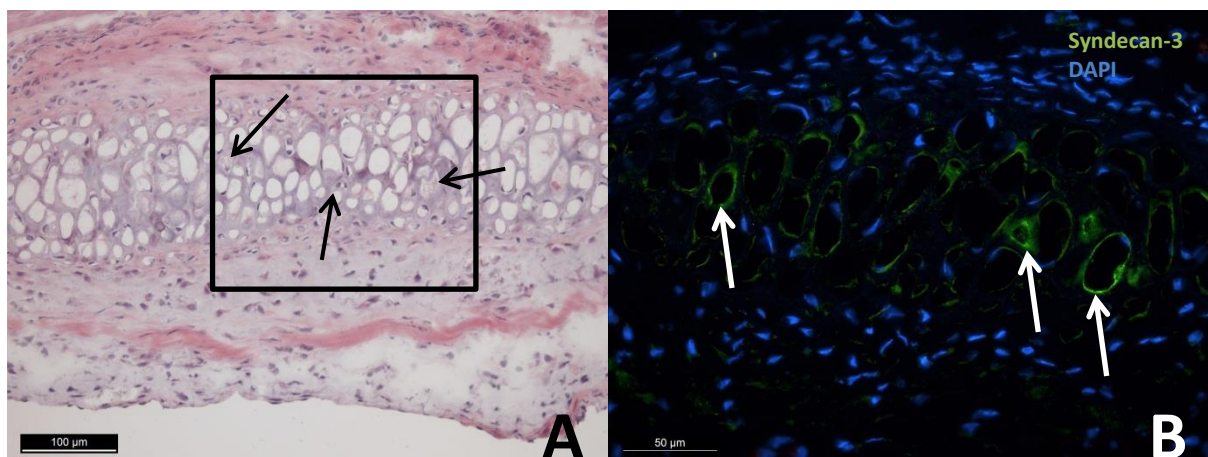


Abb. 42: Chondrozytäre Zellen (Pfeilmarkierung). Aortenring-Sinusbereich eines Volldosis Härtefuttermitteltieres nach 8 Wochen Fütterung in HE-Färbung (A, Maßstabsbalken = 100 μ m), Ausschnitt des durch das Rechteck in A markierten Bereiches in Anti-Syndecan-3-Färbung (B, Maßstabsbalken = 50 μ m) mit deutlich positivem Signal der Zellen des chondroiden Phänotyps, auch im Interstitium.

4.3.5. 3-Nitrotyrosin

Um eine Aussage über den nitrosativen Stress in den untersuchten Geweben als ein Biomarker der Apoptose zu treffen, wurde eine Anti-3-Nitrotyrosin-Färbung an Präparaten der Voll- und Halbdosis-Härtefuttergruppe sowie der Normalfuttergruppe durchgeführt. Die Abbildungen 43 A-D zeigen einen Vergleich zweier Aortenklappenansätze der Halb- und Volldosis-Härtefuttergruppe nach 12 Wochen Futterapplikation. Im Gegensatz zur Halbdosis-Härtefuttergruppe, bei der nur 1

von 3 Tieren zu diesem Zeitpunkt ein positives Signal in nur einer der Aortenklappenkommissuren zeigt (Abbildung 43 C und D), ist bei der Volldosisgruppe jede Aortenklappenkommissur 3-Nitrotyrosin-positiv (Beispiele durch Pfeilmarkierung in Abbildung 43 A gekennzeichnet). Die Volldosisgruppe zeigte auch zu den anderen Explantationszeitpunkten ein sich mit der Zeit flächenmäßig ausbreitendes Signal. Die Halbdosisgruppe zeigte dagegen zu den anderen Explantationszeitpunkten kein positives Signal, ebenso wie die Normalfuttergruppe zu allen Zeitpunkten.

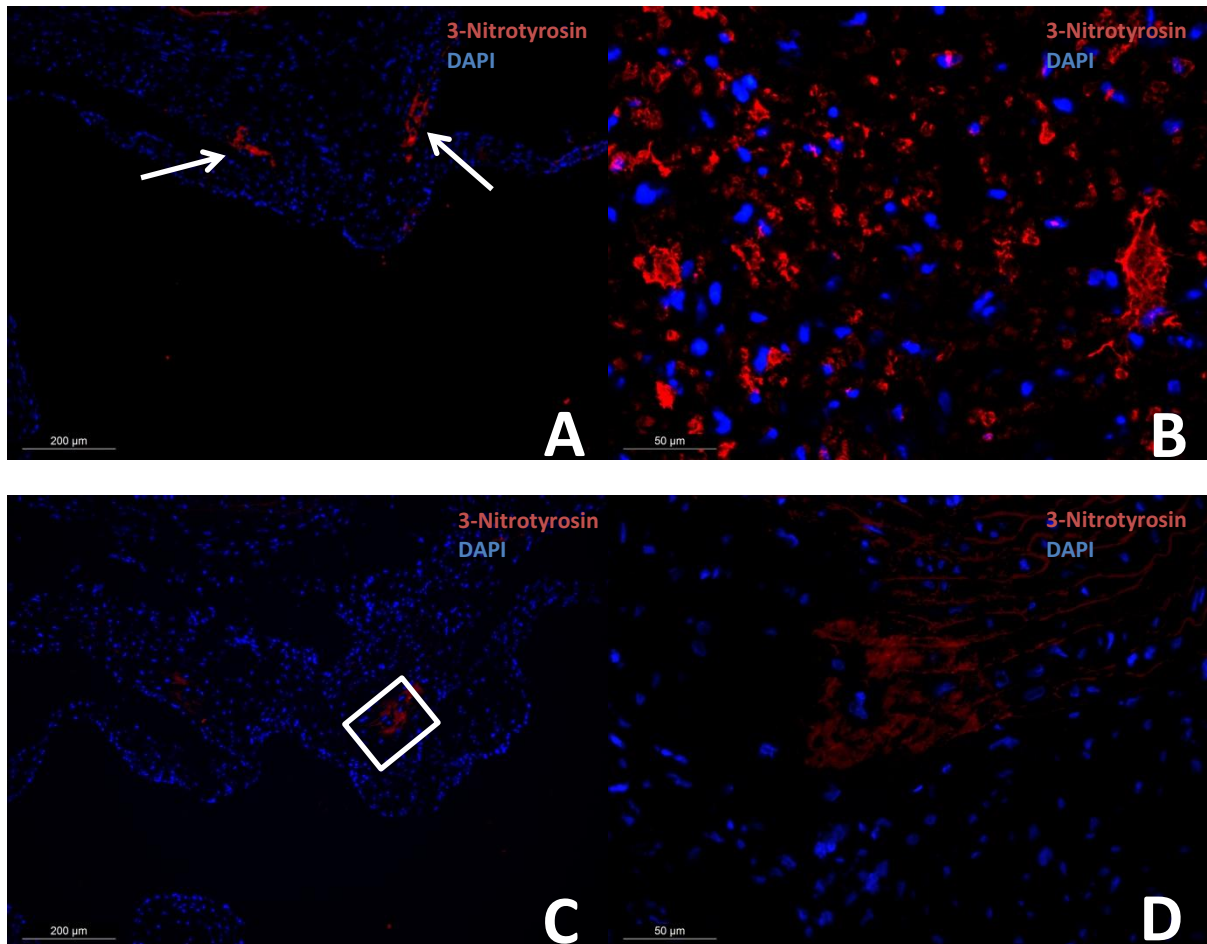


Abb. 43: Anti-3-Nitrotyrosin-Immunfluoreszenz. Deutlich positives Signal in 3/3 Volldosis-Härtefuttertieren im Bereich der Aortenklappenkommissuren (A, Maßstabsbalken = 200 µm) und in 1/3 Halbdosis-Härtefuttertieren (C, Maßstabsbalken = 200 µm). Vergrößerung des in Abbildung C markierten Areals (D, Maßstabsbalken = 50 µm). Positivkontrolle- Fibroblasten, vor der Färbung 5min mit 6 mM Peroxynitrit inkubiert (B, Maßstabsbalken = 50 µm).

4.4. *In situ* Zymographie

Die Bestimmung der MMP-Aktivität mittels der *in situ* Zymographie wurde auf die Tiere, die 12 Wochen nach Beginn der Futterapplikation getötet wurden, beschränkt. Im Gegensatz zur Von-Kossa-Auswertung wurde bei der *in situ* Zymographie der *Aortae* nur die mittlere der drei Schnittregionen berücksichtigt, damit hier ein zuverlässiger Inter-Gewebe-Vergleich der MMP-Aktivität zwischen der Aortenklappenansatzregion und der *Aorta ascendens* gewährleistet ist.

Bei der Auswertung fiel auf, dass sich die Stellen mit vermehrter MMP-Aktivität mit den stark kalzifizierten Arealen in der Von-Kossa-Färbung deckten, wie Abbildung 44 anhand derselben Stelle einer Aortenklappenkommissur deutlich darstellt. Die Auswertung und Quantifizierung der Zymographie mittels ImageJ wird in Abbildung 45 gezeigt.

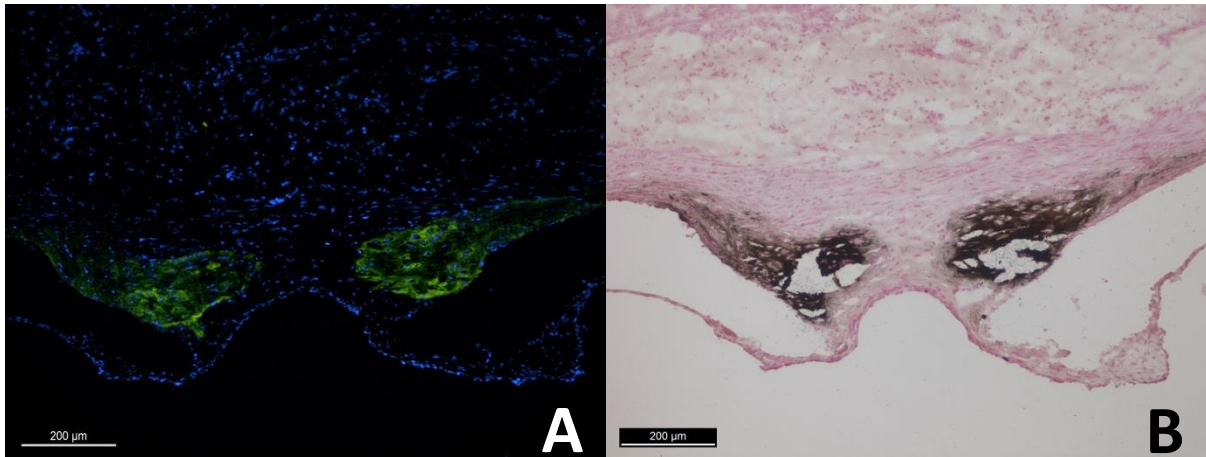


Abb. 44: *In situ* Zymographie (Aortenklappenansatz). Deutlich positive MMP-Aktivität im Bereich starker Kalzifizierung, Beispiel anhand der Aortenklappenkommissur eines Tieres der Futtergruppe I ohne Cholesterin nach 12 Wochen (A), analoge Stelle in von Kossa Färbung (B). Maßstabsbalken = 200 µm.

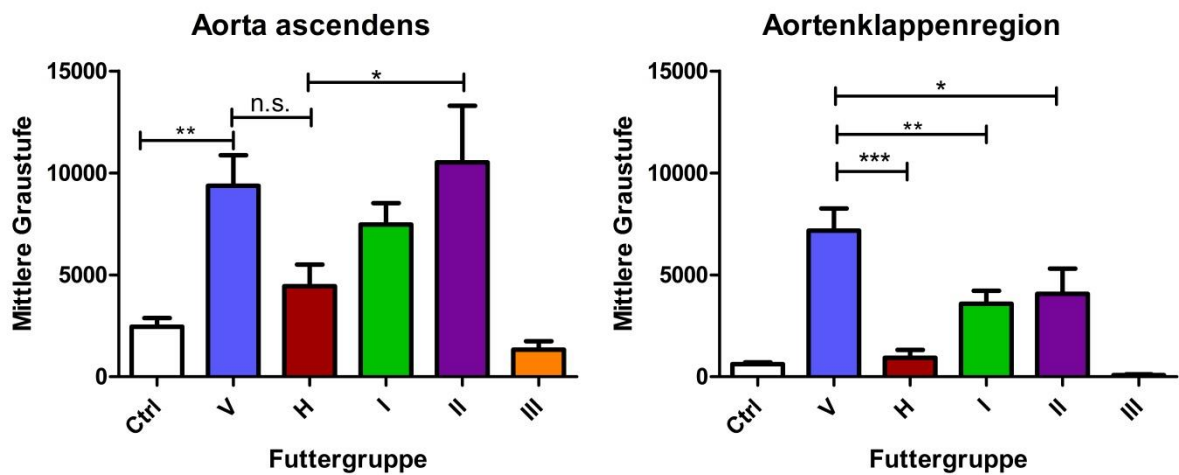


Abb. 45: *In situ* Zymographie. Die Quantifizierung der 12 Wochen Tiere zeigt eine signifikant erhöhte MMP-Aktivität in den Präparaten der Tiere mit erhöhter VD-Dosis.

Es zeigten sich dieselben Trends zwischen den Futtergruppen wie in der Kalzifizierungsanalyse mit einer deutlich erhöhten MMP-Aktivität in den Präparaten der Futtergruppen mit voller VD-Dosis und einer nicht signifikanten Erhöhung der Präparate der Halbdosis-Härtefuttergruppe. Auch die Kontrollgruppe zeigte eine gewisse MMP-Basisaktivität. Die Korrelation der Proteasenaktivität mit dem Grad der Kalzifizierung erwies sich als statistisch signifikant (Korrelationskoeffizienten $r = 0,7841$ bei den Präparaten der Aortenklappenregion, $r = 0,5387$ bei den Präparaten der *Aorta ascendens*). Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 47 veranschaulicht.

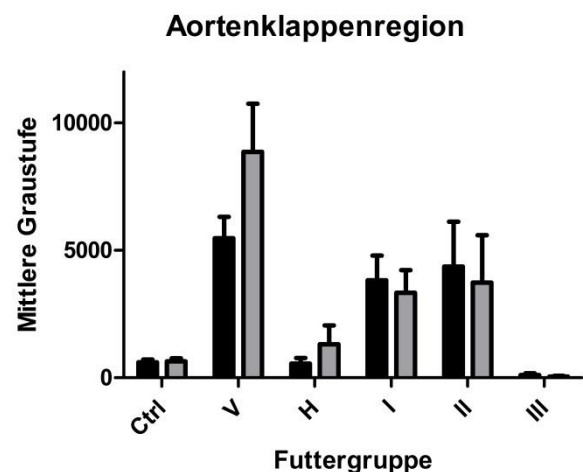


Abb. 46: *In situ* Zymographie des Aortenklappenrings getrennt nach Region (schwarz: Kommissurennahe Aortenklappenansatz, grau: Sinus der Aortenwand). Nicht signifikant vermehrte MMP-Aktivität im Bereich der Sinus im Vergleich zu den Kommissuren.

Anders als die Kalzifizierung in der Von-Kossa-Färbung war die relative Fluoreszenz-Intensität bei der *in situ* Zymographie in der Aorta

ascendens stärker ausgeprägt als in der Aortenklappenregion, sowie innerhalb des Aortenklappenrings stärker in den Sinusbereichen als in den kommissurennahen Klappenansatzbereichen oder auf ähnlichem Niveau, wie Abbildung 46 zeigt. Diese Unterschiede zwischen den Regionen waren allerdings statistisch nicht signifikant. Im Okular fielen sie durch eine homogene Verteilung der MMP-Aktivität über die gesamte Aortenwand, aber eine punktuell starke Aktivität in den kommissurennahen Klappenansatzbereichen im Bereich der verkalkten Regionen auf, die in der Mittleren Graustufe in Relation zur Gesamtfläche allerdings dort weniger ins Gewicht fiel.

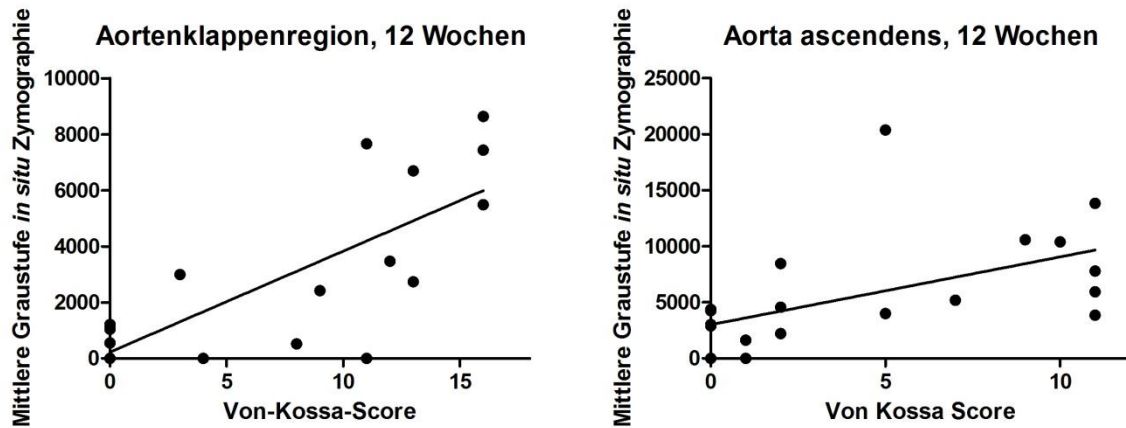


Abb. 47: Korrelation zwischen Kalzifizierungsgrad und MMP-Aktivität. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter linearer Zusammenhang im Vergleich des Grades der induzierten Gewebekalzifizierung und der Proteasenaktivität.

4.5. PCR

Zur Beurteilung einer veränderten Genexpression mittels PCR wurden Explantate der *Aorta descendens* und *abdominalis* verwendet. Um eine Gleichwertigkeit dieser Aortenwandabschnitte mit der zuvor histologisch beurteilten *Aorta ascendens* voraussetzen zu können, war es zuerst nötig, das Verkalkungsmuster der verschiedenen Wandabschnitte miteinander zu vergleichen. Dazu wurde die *Aorta abdominalis* der 12 Wochen Härtefuttermitteltiere mikroskopisch nach einer von Kossa Färbung begutachtet und mit den entsprechenden *Aortae ascendentes* verglichen. Der Grad und das Muster der Kalzifizierung unterschieden sich zwischen den beiden Regionen nicht, wie die Abbildung 48 in A und B veranschaulicht.

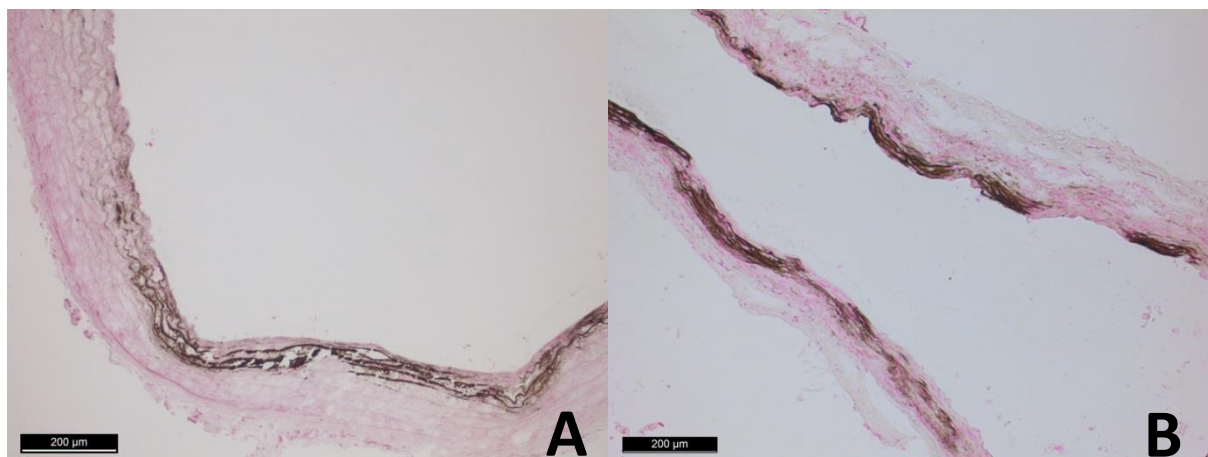


Abb. 48: Vergleich des Kalzifizierungsmusters verschiedener Aortenabschnitte. Von-Kossa-Färbung der Aorta ascendens (A) und abdominalis (B) desselben 12 Wochen Volldosis Härtefuttermitteltieres mit vergleichbarem Kalzifizierungsgrad und -muster. Maßstabsbalken = 200 µm.

Um den Einfluss der Diät auf eine veränderte Genexpression zu beurteilen, wurden verschiedene mit inflammatorischen Prozessen, hypoxischen Zuständen und einer erhöhten Thrombogenität assoziierte Gene (CD39, CD73, RAGE und HIF1 α) betrachtet, sowie die Beispieltgene einer osteochondrogenen Transformation (OPN, OCN, RUNX2) begutachtet. Die RT-PCR wurde an je 5 Tieren der der Volldosis-Härtefuttergruppe, der Halbdosis-Härtefuttergruppe, sowie der Kontrollgruppe mit Normalfutter zum Explantationszeitpunkt nach 12 Wochen Fütterung durchgeführt. In den Tieren der prokalzifizierenden Futtergruppen konnte eine signifikante Hochregulation der kodierenden Gene für CD39, CD73 und OPN, sowie den Transkriptionsfaktor RUNX2 erfasst werden, wie in Abbildung 49 ersichtlich ist. Insbesondere die Werte für OPN der Volldosis-Härtefuttergruppe zeigten eine deutliche Erhöhung im Vergleich sowohl mit der Normalfutter-Gruppe, als auch mit der Halbdosis-Härtefuttergruppe. Die OCN-Werte zeigten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Futtergruppen. Die Auswertung der mit der osteogenen Transformation assoziierten Gene zeigt Abbildung 50.

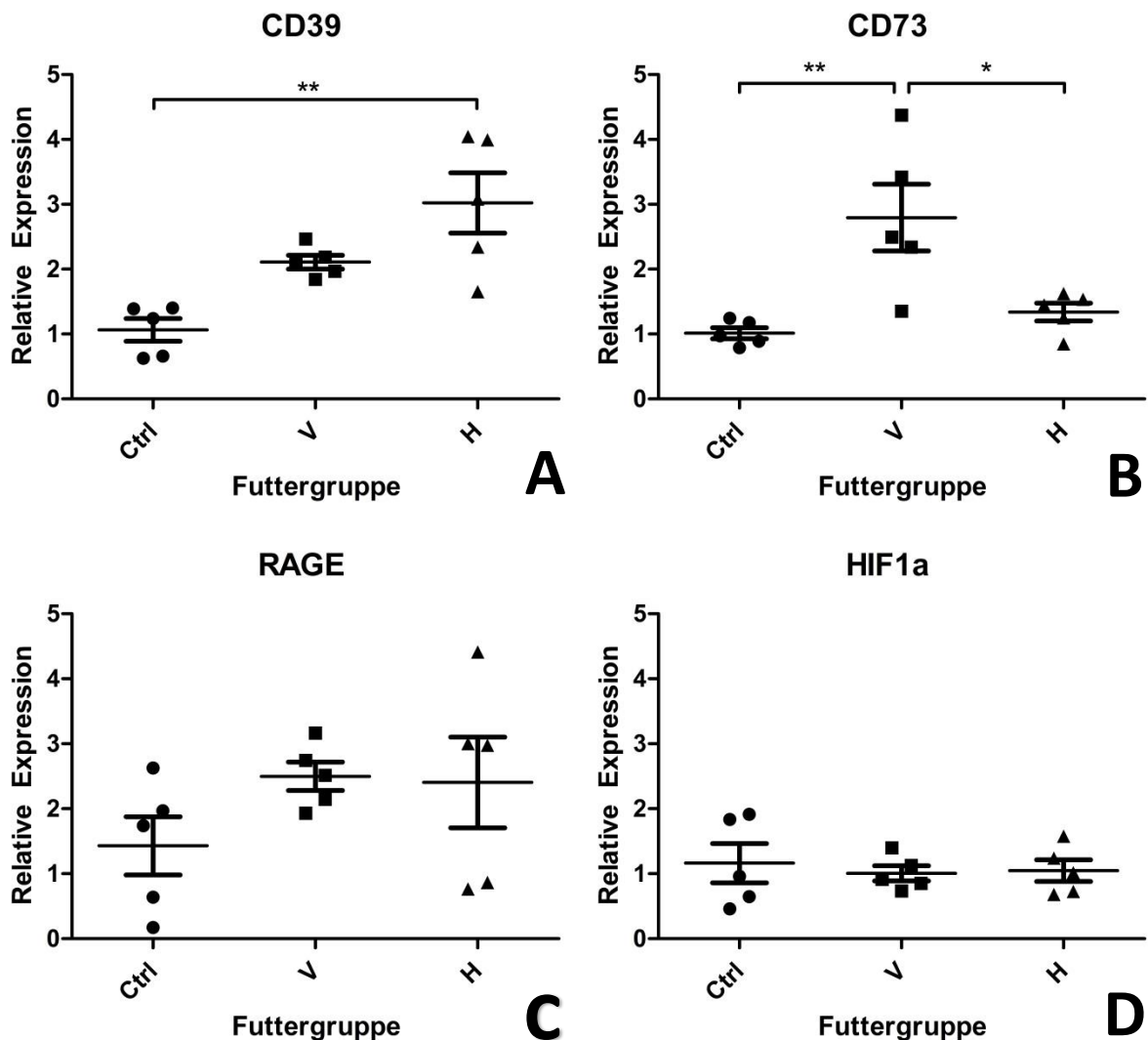


Abb. 49: Veränderte Genexpression durch unterschiedliche Futterkomposition. RT-PCR-Auswertung ausgewählter mit inflammatorischen Prozessen, hypoxischen Zuständen und einer erhöhten Thrombogenität (CD39 in A, CD73 in B, RAGE in C und HIF1 α in D) assoziierter Gene nach 12 Wochen Applikation von prokalzifizierenden Futtermischungen.

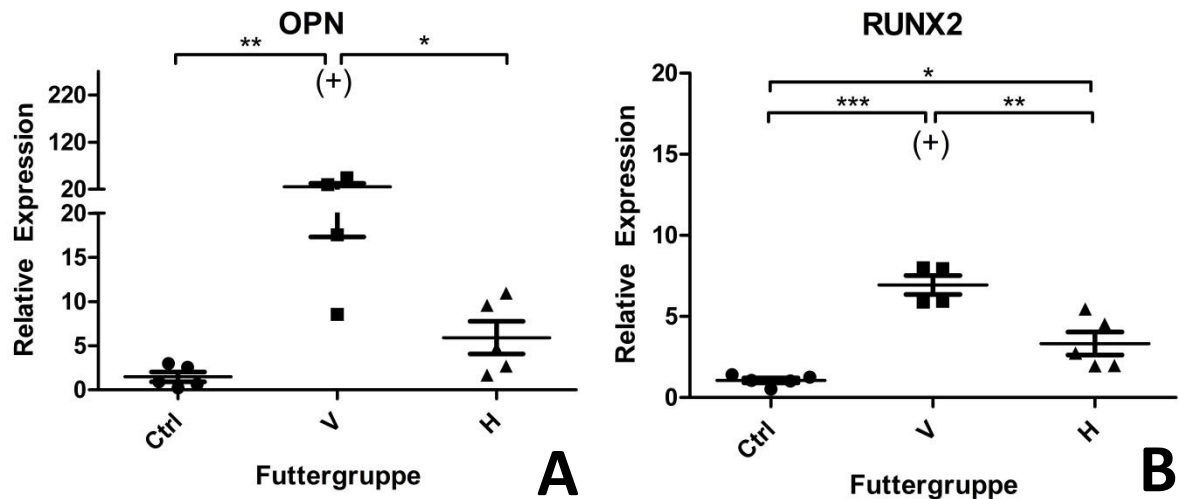


Abb. 50: Veränderte Genexpression durch unterschiedliche Futterkomposition. RT-PCR-Auswertung ausgewählter mit osteochondrogener Transformation (OPN in A, RUNX2 in B) assoziierter Gene nach 12 Wochen Applikation von prokalifizierenden Futtermischungen. Die Werte in Klammern (+) sind von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

4.6. Radiologische Diagnostik

In der Darstellung der volumetrischen Datensätze des μ CT sind die starken Kalzifizierungen der beiden Aorten der Volldosis-Härtefuttermiere nach 12 Wochen Fütterung gut darstellbar. Die dünne Aortenwand ist in der gewählten Bildgebung im nativen μ CT *ex vivo* nicht von der in der Densität sehr ähnlichen Gelatine abgrenzbar und erscheint so nicht in der 3D-Visualisierung.

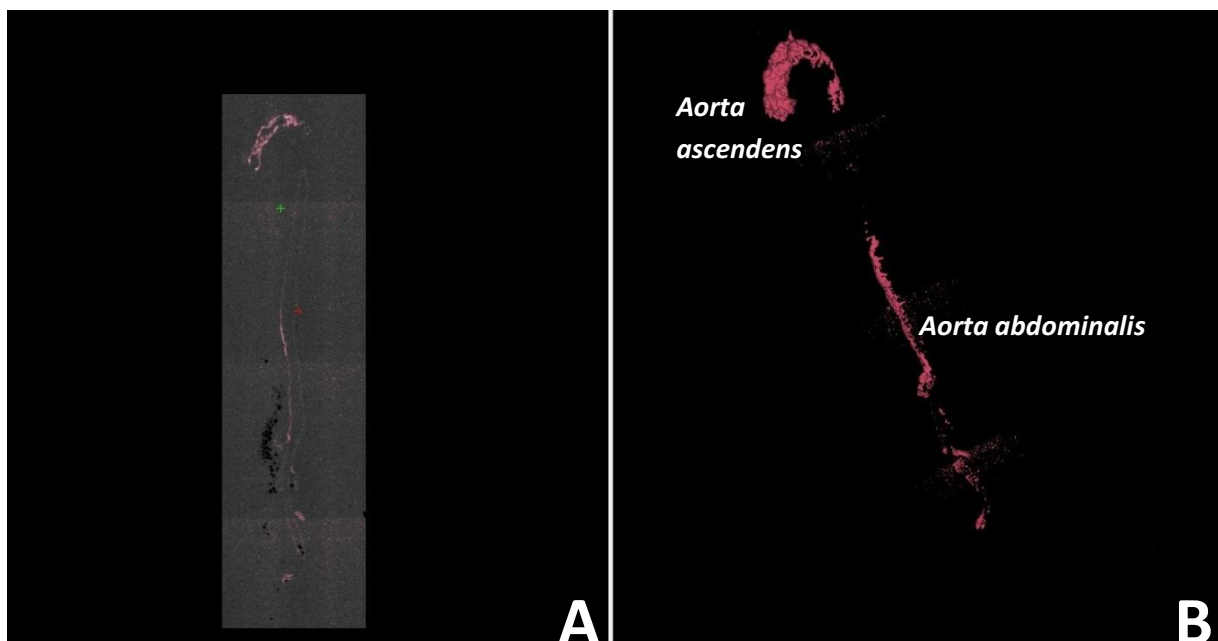


Abb. 51: μ CT Schnittbild coronal (A) und 3D-Visualisierung der segmentierten Kalzifizierungen (B). 12 Wochen Volldosis Härtefuttermier mit Betonung des Aortenklappenrings, der *Aorta ascendens* und dem proximalen Aortenbogen.

Die Quantifizierung der μ CT-Datensätze durch Bestimmung des Kalzifizierungsvolumens bestätigt die zuvor gemachten Beobachtungen. Nach 4 Wochen Fütterung sind kaum Unterschiede zwischen den Futtergruppen erfassbar. Es zeigt sich hier eine gering vermehrte Kalzifizierung in den Aorten der Volldosis-Härtefuttermiergruppe. Die Tiere der Volldosis-Härtefuttermiergruppe heben sich

nach 12 Wochen mit mehr als dem doppelten der Menge der Kalzifizierung allerdings deutlich von den Tieren der anderen Futtergruppen, die keinen signifikanten Unterschied zum frühen Zeitpunkt zeigen, ab. Diese Zusammenhänge sind in der Abbildung 52 dargestellt. Die Kalzifizierung zeigt sich betont im Aortenklappenring, der *Aorta ascendens* sowie dem proximalen Aortenbogen, während die proximale *Aorta abdominalis* eine geringere Kalzifizierung zeigt und im Bereich der *Aorta descendens thoracalis* sowie der distalen *Aorta abdominalis* kaum Kalzifizierung auffindbar ist, wie es aus den Abbildungen 51 A und B ersichtlich ist.

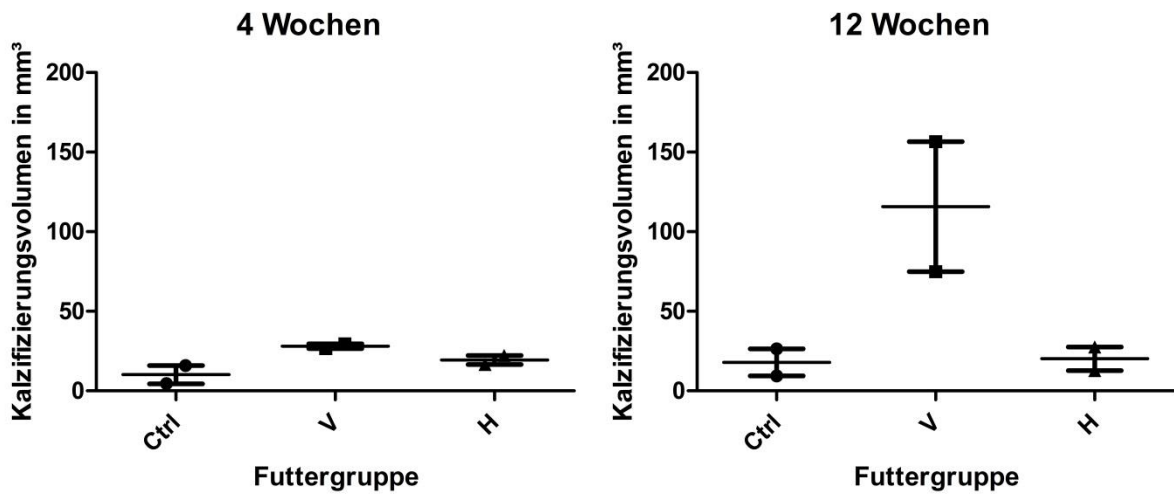


Abb. 52: Quantifizierung des μ CT. Kalzifizierungsvolumen der radiologisch ausgewerteten Tiere nach 4 und 12 Wochen mit deutlich erhöhten Werten der Volldosis-Härtefuttergruppe nach 12 Wochen.

5. Diskussion und Schlussfolgerungen

Bis jetzt hat sich die Mehrheit der Futterstudien mit nativen Ratten auf die kalzifizierende Degeneration der Aorta beschränkt. Der Effekt auf Aortenklappen war bis heute nicht Gegenstand tiefergehender, systemischer Nachforschungen. Er wurde am Kaninchen deutlich umfassender untersucht. Über eine Fütterung mittels verschiedener Zusammensetzungen der prokalzifizierenden Futterzusätze Vitamin D₃, Dikalziumphosphat und Cholesterin soll ein Rattenmodell der akzelerierten kardiovaskulären Kalzifizierung mit Fokus auf die Kalzifizierung der Aortenklappe entwickelt werden. Zur Diskussion der Ergebnisse werden zunächst die durch die Diät erzielten Effekte an der Aorta und der Aortenklappe betrachtet und anschließend die Unterschiede in der Ausprägung der Effekte im Vergleich der verschiedenen Futterzusammensetzungen und -dosen miteinander verglichen.

5.1. Alimentäre Induktion der vaskulären Degeneration

Im Folgenden soll diskutiert werden, in wieweit die durch Fütterung mit prokalzifizierenden und atherogenen Faktoren erzielten Veränderungen den Prozessen der humanen Atherosklerose ähneln.

5.1.1. Kalzifizierung

In der Serumanalyse zeigte sich eine hauptsächlich Vitamin-D-abhängige Erhöhung des Serumkalziums, die über den gesamten Erfassungszeitraum hinweg zu beobachten war. Bei der Bestimmung des Serumphosphats ergab sich hingegen keine statistisch signifikante Veränderung. Das erhöhte Serumkalzium ging zu späteren Beobachtungszeitpunkten mit einem reduzierten Allgemeinzustand der Tiere und einer versteiften Wirbelsäulenkyphose einher. Zur Erfassung der Kalzifizierung im vaskulären System wurde die *Aorta ascendens* der Tiere histologisch ausgewertet und das Kalzifizierungsmuster der gesamten Aorta *ex vivo* mittels eines μ CT beurteilt.

Kalziumablagerungen, die durch Gabe von Vitamin D in der Aortenklappe der *Aorta ascendens* und dem Myokard von Ratten induziert waren, wurden bereits zuvor durch ein μ CT sichtbar gemacht [175]. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Studie nicht nur das Kalzifizierungsvolumen quantifiziert, sondern auch die Verteilungsmuster über die gesamte Aorta beschrieben. Die Kalzifizierung zeigte sich dabei betont im Aortenklappenring, der *Aorta ascendens* sowie dem proximalen Aortenbogen und der proximalen *Aorta abdominalis*, wobei im Bereich der *Aorta descendens thoracalis* sowie der distalen *Aorta abdominalis* kaum Kalzifizierung auffindbar war. In der humanen Atherosklerose stellt sich dagegen teilweise ein anderes Kalzifizierungsmuster dar, da im Menschen neben dem Aortenbogen die distale *Aorta abdominalis* ein Hauptfokus der Kalzifizierung mit den entsprechenden klinischen Komplikationen ist [179]. Frühe Stadien der Kalziumablagerung, wie beispielsweise eine Mikrokalzifizierung, die in der histologischen Diagnostik auffiel, konnten durch das native μ CT nicht erfasst werden. Eine Möglichkeit, auch diese Stadien und eine beginnende Inflammation zu erfassen, wäre der Einsatz von Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Untersuchungen mit fluoreszierenden Agenzien zur Detektion von Bisphosphonaten und Makrophagen, wie er bereits insbesondere in Mäusen beschrieben wurde [180]. Diese Erweiterung könnte einen zusätzlichen Informationsgewinn in zukünftigen Arbeiten mit unserem Modell bedeuten.

Um dem Fokus der Untersuchungen auf der Induktion einer Kalzifizierung gerecht zu werden, erfolgte eine ausführliche Bewertung der Hydroxylapatit-Ablagerungen der Kalzifizierungsareale der *Aorta ascendens* mittels einer semiquantitativen Auswertung der nach von Kossa gefärbten

Schnitte. Wie auch bei der Serumkalziumanalyse konnte eine hauptsächlich Vitamin-D-abhängige ausgeprägte Kalzifizierung nachgewiesen werden. In der histologischen Auswertung zeigte sich eine Betonung der Kalzifizierung der Media und weniger stark der Intima. Diese Verteilung deckt sich mit den Beobachtungen von Hass et al., die Kaninchen unter einer Beeinflussung durch Cholesterin und Ergosterol beschrieben [162] und Wu-Wong et al., die in ihrem Rattenniereninsuffizienzmodell ein Vitamin D Analogon und Kalziumphosphat verwendeten [174]. In der humanen Atherosklerose dagegen kommt es primär zu einer Kalzifizierung der Intima, insbesondere der tieferen muskuloelastischen Schicht der Intima [98]. Somit wurde durch die Futterzusätze anstatt eines reinen Abbildes der Atherosklerose eher eine Mediasklerose mit anteiligen Kalzifizierungen der Intima provoziert. Die Futterstudie hat das Ziel, die Komplexität der degenerativen Kalzifizierung, wie sie in der humanen Atherosklerose beobachtet wird, möglichst vollständig darzustellen. Die Diskrepanz im Verteilungsmuster der Kalzifizierung zwischen einem durch Futterzusätze beeinflussten Tiermodell und der humanen Atherosklerose, nicht nur auf mikroskopischer Ebene im Bereich der Media oder Intima, sondern auch auf makroskopischer Ebene im μ CT in Betrachtung der verschiedenen Aortenregionen, ist ein Beispiel für die grundsätzlichen Limitationen eines Tiermodells.

In der Validation der Auswertung der Gewebskalzifizierung im Gruppenvergleich zum Explantationszeitpunkt nach 12 Wochen fällt mittels der Software ImageJ im Vergleich zum Verkalkungsscore ein Ausschlag der Gruppe III auf. Dieser ist durch eine mangelnde Differenzierung durch die Software zwischen stärker dunkel gefärbten Zellkernen und braunen Verkalkungsarealen zu begründen. Hier ist das menschliche Auge im Vorteil. Zudem mittelt das Auge mehr, woraus ein geringerer Standardfehler resultiert. Letztendlich ändert dieser Ausschlag aber nichts daran, dass durch die Übereinstimmung der Trends die gemeinsame Grundaussage der Beurteilungssysteme im Vergleich zwischen den Futtergruppen bekräftigt wird. Dies wird auch durch die statistisch signifikante Korrelation der beiden Beurteilungsarten im Vergleich mit hohem Korrelationskoeffizienten zeigt.

5.1.2. *Remodeling*

Ein Unterschied in der Verteilung und in den Anteilen der verschiedenen Gewebsarten war in allen Futtergruppen im Vergleich zur Normalfuttergruppe in der Movat Pentachrom Färbung nicht auszumachen. Ebenso wie in der HE-Übersichtsfärbung imponierten keine neuen Zellen oder Zellvermehrungen im Gewebe.

Für eine Differenzierung der ortsständigen Zellen beziehungsweise ein *Remodeling* im Sinne einer induzierten Pathologie sprechen die Ergebnisse der *in situ* Zymographie. Das Gewebsremodeling hat einen zentralen Anteil an der Pathogenese einer Atherosklerose. Als Biomarker für das Remodeling wurde die MMP-Aktivität vorgeschlagen [110]. Eine verstärkte Aktivität dieser katabolen Enzyme, zu deren Substraten unter anderem Kollagen und Elastin zählen [104]–[106], gilt insbesondere als Ursache für die Instabilität ausgeprägter Plaques und scheint maßgeblich in die Migration von Monozyten und glatten Muskelzellen involviert zu sein [110]–[112]. Es wurde zuvor in einem Kaninchenmodell gezeigt, dass die MMP-Hochregulation in der Aortenwand mindestens 4-12 Wochen nach einer Endothelverletzung bestehen bleibt [113]. Passend hierzu zeigte sich in der im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten *in situ* Zymographie, die eine Visualisierung der MMP-Aktivität ermöglicht, eine Kolokalisation vermehrter MMP-Aktivität mit stark kalzifizierten Arealen in der Media der Aortenwand. So offenbarten sich dieselben Trends zwischen den Futtergruppen wie in der Kalzifizierungsanalyse. In der *in situ* Zymographie

wurden lediglich Aussagen über die MMP-Aktivität im Gesamten getroffen, ohne in einzelne Untergruppen zu unterteilen. Insbesondere die MMPs -2 und -9 scheinen in der Degeneration der Strukturproteine Kollagen und Elastin in den Gefäßen eine zentrale Rolle einzunehmen [106], [110], [111]. Um die vorliegenden Ergebnisse weitergehend zu spezifizieren, wäre es daher ein weiterer sinnvoller Schritt, die übrigen Gelatinasen während der Untersuchung zu inhibieren.

Zusätzlich zu den Ergebnissen der *in situ* Zymographie implizieren auch die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen ein fortgeschrittenes Stadium des Gewebsumbaus zu späteren Beobachtungszeitpunkten. Die Desmin-Färbung unterschied sich nicht von der einer gesunden Aorta. Die α -SMA-Färbung zeigte jedoch Auffälligkeiten: Im Vergleich mit einem gesunden Organ, dessen Media von glatten Muskelzellen bevölkert ist, zeigten Media-Regionen, die von einer besonders starken Kalzifizierung betroffen waren, Areale mit vitalen Desmin- und α -SMA-negativen Zellen. Die Frage, ob frühe Kalziumkonglomerate in der extrazellulären Matrix ursächlich für eine osteogene Transformation glatter Muskelzellen der Media sind oder ob umgekehrt die transformierenden Zellen eine Kalzifizierung des Gewebes auslösen, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend beantwortet werden. Erst kürzlich bekräftigte eine *in vitro* Studie die Hypothese, dass kalzifizierte Strukturproteine wie Elastin eine osteochondrogene Transformation glatter Gefäßmuskelzellen stimulieren [130]. Passend zu dieser Hypothese konnten wir Kalziumkonglomerate in der von Kossa Färbung bereits zu sehr frühen Zeitpunkten identifizieren, wohingegen Hinweise auf eine Transformation glatter Gefäßmuskelzellen in Form negativer α -SMA-Färbung erst zu sehr fortgeschrittenen Stadien der Kalzifizierung beobachtet wurden. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass das *Remodeling* des Gewebes durch eine vorige Kalziumablagerung induziert werden könnte.

Eine im Rahmen der Plaquebildung und des *Remodeling* ausgelöste Hypoxie verstärkt über eine Hochregulation Hypoxie-induzierbarer Faktoren die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und unterstützt eine Neoangiogenese [114]. Anhand der PCR-Ergebnisse des Gens für die HIF1 α konnten nach 12 Wochen allerdings keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den prokalzifizierenden Futtergruppen festgestellt werden. Deshalb ist in diesem Modell innerhalb eines dreimonatigen Beobachtungszeitraumes von einem *Remodeling* ohne nennenswerte Involvierung dieses von Hypoxie zentral betroffenen Gens auszugehen.

5.1.3. Osteochondrogene Transformation

Frühe Stadien der vaskulären Degeneration wurden ebenso wie durch die histologische Auswertung der Kalzifizierung auch durch die PCR des Aortengewebes erfasst. Eine ausgeprägtere Kalzifizierung ging einher mit einer Hochregulation des Gens für Osteopontin, sowie des osteogenen Transkriptionsfaktors RUNX2. Diese beiden Biomarker für eine enchondrale Ossifikation sind assoziiert mit den kalzifizierten Arealen nach Endothelverletzungen in atherosklerotischen Plaques und kalzifizierten Aortenklappen [118], [121], [123], [125], [126], [128]. Passend zu den vorliegenden Ergebnissen wurde bereits zuvor gezeigt, dass auch eine alimentär induzierte Kalzifizierung in Ratten und Kaninchen eine Hochregulation dieser Schlüsselgene der osteochondrogenen Transformation hervorrufen kann [121], [129]. Auch Shuvy et al., Rajamannan et al. und Cimini et al. machten ähnliche Beobachtungen [94], [170], [173]. In den Werten für den Ossifikations-Biomarker Osteocalcin konnten diese Ergebnisse jedoch nicht gezeigt werden. Dies gelang jedoch zuvor Shuvy et al. [173].

5.1.4. Inflammation

Die Inflammation spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese einer Kalzifizierung sowohl im Rahmen der arteriellen Degeneration als auch bei der Aortenklappenkalzifizierung. Insbesondere die Aktivierung von Makrophagen und Mastzellen beziehungsweise deren Infiltration ins Gewebe rückten kürzlich in den Fokus der Forschung [75]–[77]. In keinem der Aortenpräparate waren in den histologischen Färbungen morphologisch infiltrierende inflammatorische Zellkonglomerate oder andere Zellvermehrungen auffällig. Auch in den Immunfluoreszenzen des Lymphozyten-Oberflächenmarkers CD3 und des Makrophagen-Oberflächenmarkers CD68 [81], der auch als Biomarker für die Krankheitsaktivität der Atherosklerose vorgeschlagen wurde [82], konnte kein entzündliches Infiltrat identifiziert werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Inflammation in dem vorliegenden Modell der Kalzifizierung nicht als hauptsächlicher Trigger fungiert. Dass jedoch ein niedrigstufiger entzündlicher Gewebsumbau induziert wurde, zeigte sich in der PCR des Aortengewebes. Es konnte eine Hochregulierung der im Rahmen der Inflammation regulatorischen Ektonukleotidasen CD39 und CD73 in den prokalzifizierenden Futtergruppen erfasst werden, was mit einem niedrigstufigen Inflammationsprozess vereinbar ist. Die Oberflächenproteine CD39 und CD73 werden nicht nur auf Immunzellen, sondern auch auf Endothelzellen exprimiert. Ihr Signalweg ist ein integraler Bestandteil der Suppression einer Immunreaktion durch regulatorische T-Zellen. Daher könnten diese Beobachtungen implizieren, dass als Antwort auf die diätische Behandlung ein Mechanismus des Rattenorganismus aktiviert wurde, der zur Kontrolle der Inflammation und damit zur Prävention der Entwicklung einer Atherosklerose beiträgt [83], [84]. CD73 ist insbesondere in die Unterstützung des Heilungsprozesses nach einer Endothelverletzung eingebunden [85]. Passend hierzu offenbarte die PCR, dass teilweise sogar höhere Werte des Oberflächenproteine in der Futtergruppe mit reduzierten prokalzifizierenden Zusätzen (H) im Vergleich zur vollen Dosis (V) exprimiert wurden. Der Versuch des Organismus, eine Inflammation zu unterdrücken, ist mittels eines verstärkten gegenregulatorischen Prozesses insbesondere in frühen Stadien der Degeneration, wie sie eher unter den niedrigeren Dosen prokalzifizierender Zusätze zu beobachten ist, zu erwarten. Ob diese Beobachtung jedoch als gegenregulatorischer Mechanismus des Rattenorganismus zur Unterdrückung der Entwicklung einer Atherosklerose zu werten ist, bleibt Spekulation.

5.2. Alimentäre Induktion der Aortenklappendegeneration

Im folgenden Abschnitt soll diskutiert werden, in wieweit die erzielten pathologischen Veränderungen den Prozessen der humanen Aortenklappendegeneration, sowohl im Rahmen der Entwicklung einer Aortenklappensklerose als auch im Rahmen der kalzifizierenden Degeneration von Bioprothesen, ähneln.

5.2.1. Kalzifizierung

Der zentrale Aspekt der Aortenklappensklerose ist die Kalzifizierung des Klappengewebes, die zu einer Versteifung der Segel und einer konsekutiven Verringerung der Klappenöffnungsfläche mit Entwicklung und später auch progressiven Erhöhung eines transvalvulären Druckgradienten führt. Auch im Rahmen der Degeneration von Herzklappenimplantaten spielt die Kalzifizierung eine entscheidende Rolle [23]. Um dem Fokus der Untersuchung auf der Kalzifizierung gerecht zu werden, wurde diese analog zu den Aortenpräparaten umfassend betrachtet. Dies erfolgte mittels einer semiquantitativen Auswertung der nach von Kossa gefärbten Aortenklappenpräparate. Vor allem Vitamin-D-abhängig war eine ausgeprägte Kalzifizierung in den Präparaten des Aortenklappenrings nachzuweisen. Dabei ging eine starke Kalzifizierung auch immer mit einer

Mikrokalzifizierung der Klappensegel einher. Die Kalzifizierung zeigte sich zu früheren Explantationszeitpunkten verstärkt in den kommissurennahen Klappenansatzbereichen an der Basis der Aortenklappensegel. Diese Beobachtung deckt sich mit den pathologischen Veränderungen, die in Patienten beobachtet werden, die aufgrund einer Aortenklappenstenose einen Aortenklappenersatz erhalten. Die Betonung der Aortenklappenbasis zum Beginn der Kalzifizierung kann durch einen niedrigen Wandabschubspannung und hohe Flussturbulenzen in diesem Bereich erklärt werden [99], [100] und wurde auch von Drolet et al. in einem Kaninchenmodell unter Vitamin D und Cholesterin beobachtet [164].

5.2.2. Remodeling

Ähnlich wie bei der Betrachtung der Aortenpräparate zeigt die Movat Pentachrom Färbung auch bei den Präparaten des Aortenklappenrings keine grundlegende Umverteilung der Qualitäten des Gewebes. Auffällig war in dieser histologischen Färbung jedoch eine vermehrte Grünfärbung in den stark kalzifizierten Aortenklappenkommissuren. Diese zeigt eine vermehrte Ansammlung von Proteoglykanen an, was für einen gewissen Gewebsumbau spricht. Hekimian et al. kamen mittels einer Alzianblaufärbung in Kaninchen nach Zufütterung von Vitamin D und Cholesterin zu ähnlichen Ergebnissen mit einem Anstieg der Proteoglykane [163].

Eine endotheliale Verletzung mit folgender Expression von Adhäsionsmolekülen gilt als erster Schritt in der kardiovaskulären Kalzifizierung [73]. Auch im Rahmen der Immunantwort, die zum Versagen von Bioprothesen führt, gehen die histologischen Befunde mit einem Endothelzelluntergang der entsprechenden Areale einher [133]. In den Tieren, die durch eine extrem starke Kalzifizierung auffielen, konnte an Stellen fortgeschrittener Läsionen inklusive der Endothelschicht der Kommissuren und der Sinuswand auf Höhe der Aortenwurzel eine hyperplastische Neointima mit phänotypisch spindelförmigen Zellen beobachtet werden. Es ist eine bekannte Reaktion des Gewebes auf eine endotheliale Verletzung, das Gewebe in Form einer Hyperplasie der Intima durch eine Proliferation spindelförmiger, α -smooth-muscle-actin-positiver Zellen an den entsprechenden Stellen umzubauen [71]. In den Aorten der Ratten waren trotz höherer Dosen Vitamin D und Cholesterin vergleichbare Phänomene im Gegensatz zu den kontrovers diskutierten Beobachtungen von Hekimian et al. in Kaninchen nicht nachweisbar [163].

Ebenso wie in der Entwicklung einer Atherosklerose wird auch in der Degeneration von Aortenklappen insbesondere einer vermehrten Expression der beiden Proteasen MMP-2 und -9, die auch von den valvulären interstitiellen Zellen exprimiert werden, eine zentrale Rolle in dem zur valvulären Degeneration gehörenden Matrixremodeling zugeschrieben [103], [107]. Die Ergebnisse der *in situ* Zymographie des Aortenklappenrings deckten sich mit diesen Grundlagen und auch mit den Ergebnissen der Gefäßpräparate, da sie eine Kolo-kalisation einer vermehrten MMP-Aktivität mit einer starken Kalzifizierung visualisierten. Auch diese vermehrte Proteasenaktivität trat betont in der Basis der Aortenklappensegel auf. Die verstärkte MMP-Aktivität scheint insbesondere die Ursache für die Degradation und Fragmentation elastischer Fasern zu sein [109]. Sie trägt durch eine Induktion von Kalziumablagerungen vor allem auf dem fragmentierten Elastin auch zu einer Mineralisation der Klappe bei. Diesen Beobachtungen gleichend wurde auch in explantierten Bioprothesen eine vermehrte MMP-Aktivität festgestellt, die bei der Matrixdegeneration, sowie der Degeneration von Kollagenfasern und darauf folgendem Riss der Klappensegel der Prothese mitwirkt [143].

Im Gegensatz zur Kalzifizierungsanalyse zeigte sich die Auswertung der Aktivität der MMP mittels der relativen Fluoreszenz-Intensität in der *in situ* Zymographie des Aortenklappenansatzes im direkten Vergleich mit der *Aorta ascendens*, wenn auch nicht signifikant, schwächer ausgeprägt. Dies ist allerdings durch eine eher homogene Verteilung der Aktivität über die Gefäßwand des gesamten Gefäßes im Gegensatz zu punktuell verstärkter Aktivität in den Kommissuren des Aortenklappenrings begründet, was in der Mittleren Graustufe in Relation zur Gesamtfläche weniger ins Gewicht fiel. Aus diesem Grund ist diese Diskrepanz in der Bewertung eher zu vernachlässigen.

5.2.3. Lipidmetabolismus und -ablagerungen

Ein ungünstiges Lipoproteinprofil begünstigt die Entstehung sowohl einer Aortenklappensklerose als auch einer Atherosklerose [2]. In der Serumanalyse zeigten alle Tiere mit einem Cholesterinzusatz im Futter ein erhöhtes LDL/HDL-Verhältnis. Auch das metabolische Syndrom mit einem gestörten Kohlenhydratstoffwechsel, einer Hypertonie und einer Adipositas zusätzlich zur Dyslipoproteinämie gilt als Risikofaktor für die kardiovaskuläre Degeneration und die beschleunigte Degeneration von Bioprothesen [55], [131]. Von induzierten Stoffwechselveränderungen im Sinne eines metabolischen Syndroms kann jedoch nicht ausgegangen werden. Dies zeigt sich anhand des Gewichtsverlaufes, der Auswertungen der Serumglukosewerte und der nicht signifikanten Hochregulation des Gens für den Rezeptor glykierter Endprodukte (RAGE) in der PCR im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Ein gemeinsames Merkmal von Aortenklappensklerose und Atherosklerose ist eine subendotheliale Lipideinlagerung, die durch das induzierte ungünstige Lipoproteinprofil begünstigt wird [61], [64]. In Assoziation zu einer starken Kalzifizierung sind mit Betonung der Aortenklappenbasis phänotypisch lipidähnliche Vakuolen aufgefallen. Die Oil Red O Fettfärbung bestätigte die Vermutung einer Lipidablagerung. Sowohl die Lokalisation der Lipidablagerungen an der Aortenklappenbasis, an der ein Eindringen von Plasmalipoproteinen durch die Strömungsverhältnisse begünstigt wird, als auch eine Assoziation mit den für eine Kalzifizierung prädestinierten Regionen sind in der humanen Aortenklappenstenose in frühen bis weit fortgeschrittenen Stadien bekannt [88], [89]. Ähnliche Veränderungen wurden auch in anderen Tierstudien mit einer hohen Dosis Cholesterin im Futterzusatz beobachtet [94], [167], [168], [170], [171], [181].

5.2.4. Osteochondrogene Transformation

Im Übergangsbereich zwischen Lipidvakuolen und Regionen verstärkter Kalzifizierung fielen zu fortgeschrittenen Zeitpunkten auch Zellen mit einem chondrozytären Phänotypen auf. Diese zeigten sich in der Syndecan-3-Immunfluoreszenz positiv. Syndecan-3 stellt einen wichtigen Biomarker der frühen chondrozytären Differenzierung dar. Er wird während der proliferativen Phase und der Reifung der Chondrozyten hochreguliert [120]. Es ist bekannt, dass sich Syndecan-3 im Rahmen der chondrogenen Transformation auch im Interstitium nachweisen lässt, wie wir es beobachteten. Diese Annahme einer chondrogenen Transformation deckt sich mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen der PCR des Aortengewebes.

Alle diese Veränderungen, von den interfibrillären Lipidablagerungen über die chondrozytäre Differenzierung bis hin zur osteochondrogenen Transformation interstitieller Zellen mit Kalzifizierung, sind als Schlüsselmechanismen der humanen Aortenklappensklerose und vaskulären Degeneration bekannt [96]. Auch bei explantierten Bioprothesen sind

Lipidablagerungen und eine kolokalisierte Mineralisation in den Aortenklappenkommissuren als zentrale Prozesse im Rahmen der kalzifizierenden Degeneration identifiziert worden [142], [143]. Auch im Rahmen der vorliegenden Studie können die Frage nicht abschließend beantworten, ob diese Prozesse unabhängige Ereignisse im Rahmen der Aortenklappendegeneration oder interaktive Eigenschaften eines biologischen Programms sind, dessen pathophysiologischer Trigger bisher unbekannt ist.

5.2.5. Inflammation und Zelluntergang

Ebenso wie in der Entwicklung einer Atherosklerose wird der Aktivierung von Makrophagen und Mastzellen auch in der Entwicklung der Aortenklappensklerose eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Kalzifizierung zugeschrieben [77], [79], [80]. Bereits in frühen Stadien der Aortenklappendegeneration wird ein entzündliches Infiltrat beobachtet [74]. Auch für den Degenerationsprozess von Bioprothesen sind Immunprozesse verantwortlich. Es wurden Makrophageninvasionen in der Nähe von Rissen und Perforationen in Bioprothesen beobachtet [141] sowie vermehrte Lymphozytenansammlungen in geschädigtem Allograftgewebe gefunden [133], [134]. Nichtsdestotrotz ist die Entzündung nur ein Aspekt unter mehreren im Prozess der humanen Aortenklappendegeneration. Auch wenn das Ausmaß des entzündlichen Infiltrates mit der Krankheitsaktivität zu korrelieren scheint, tritt ein solches Infiltrat bei weitem nicht in jedem möglichen Verlauf einer Aortenklappensklerose auf, und die Korrelation wurde als nur gering beschrieben [78]. In Übereinstimmung damit konnte in der vorliegenden Studie auch in den Präparaten des Aortenklappenansatzringes und der Aortenklappensegel keinerlei inflammatorisches Infiltrat erfasst werden, weder mittels konventioneller histologischer Methoden, noch mittels der CD3- oder CD68-Immunfluoreszenz. Auch von Shuvy et al. wurden in Ratten nur vereinzelt Makrophagen nach einer Hochdosis-Phosphat-Fütterung in einem von ihnen entwickelten Niereninsuffizienzmodell beobachtet [173]. In Kaninchen hingegen wurde ein entzündliches Infiltrat in den Aortenklappen mehrerer Tiere nach atherogener Diät erwähnt [94], [165], [166], [170], [181]. Diese Diskrepanz passt zu der Hypothese verstärkter gegenregulatorischer, die Inflammation supprimierender Prozesse in Ratten. Sie kann jedoch auch einfach dadurch zustande kommen, dass die Degeneration der Rattenaortenklappe bisher nicht ausreichend beschrieben wurde und eine ausgeprägte Entzündungsreaktion in dem vorliegenden Futtermodell kein ausschlaggebender Trigger ist. Der chronische Prozess eines moderaten entzündlichen Gewebsumbaus, wie er mit den Ergebnissen der PCR des Aortengewebes vereinbar ist, kann durch seinen Einfluss jedoch durchaus zu einer Progression der Aortenklappendegeneration beitragen [96].

Um eine Aussage über den nitrosativen Stress und die von reaktiven Nitrogenspezies induzierte Apoptose zu treffen, der in der Progression der Atherosklerose und Aortenklappensklerose eine wichtige Rolle zugeschrieben wird, wurde der nitrosative Stress mittels einer Anti-3-Nitrotyrosin-Immunfluoreszenz dargestellt. Diese Färbung zeigte sich in der prokalzifizierenden Futtergruppe mit der vollen Dosis aller Zusatzstoffe (V) zu allen Explantationszeitpunkten positiv. Kolokalisiert zu kalzifizierten Arealen nahm die Anzahl der Zellen, die unter nitrosativem Stress standen, mit einem späteren Explantationszeitpunkt zu. Diese Beobachtungen passen zu vorherigen Studien, die zeigten, dass NO-Donatoren, welche Antagonisten zu reaktiven Sauerstoff- und Nitrogenspezies darstellen, protektiv gegen eine chondroosteogene Transformation und Kalzifizierung wirken [67] und eine erhöhte Gewebsresistenz gegen NO beziehungsweise eine

verminderte Gewebsantwort auf NO mit einer Progression der Aortenklappensklerose assoziiert ist [69], [70].

5.2.6. Funktionelle Einschränkung

Die Symptomatik einer Aortenklappenstenose entsteht durch die Verringerung der Öffnungsfläche in Folge der Sklerosierung und Verdickung der Klappensegel. Die entsprechenden funktionellen pathophysiologischen Folgen sind sehr gut über eine Echokardiographie beurteilbar [65]. Sie beinhalten einen erhöhten Druckgradienten und damit eine erhöhte Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe sowie eine daraus resultierende konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie. Bei einer Dekompensation des Befundes kommt es zu einer Linksherzinsuffizienz, was sich in einer Dilatation und in einem verminderten Auswurf des linken Ventrikels sowie einer verminderten Verkürzung des Herzmuskels in der Systole im Vergleich zur Diastole äußert.

Es zeigte sich während des Beobachtungszeitraumes in keiner Futtergruppe ein Anhalt für eine systolische Funktionsreduktion oder eine linksventrikuläre Dilatation. Eine dekompensierte Aortenklappenstenose oder eine Linksherzinsuffizienz kann somit ausgeschlossen werden. Anhand der Erhöhung des Druckgradienten über der Aortenklappe kann jedoch von einer erzielten funktionellen Stenosierung der Aortenklappe im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgegangen werden.

5.3. Vergleich der Futterzusätze

Es wurde bisher herausgestellt, dass es gelungen ist, durch die verschiedenen prokalzifizierenden Futtermischungen eine akzelerierte kardiovaskuläre Kalzifizierung mit einigen Merkmalen der humanen kardiovaskulären Degeneration zu induzieren. Im Folgenden muss begutachtet werden, welche Unterschiede die verschiedenen Futterzusammensetzungen in der Ausprägung der induzierten Veränderungen erzielten. Dazu werden zunächst die drei Futterzusätze Vitamin D, Cholesterin und Dikalziumphosphat getrennt voneinander betrachtet und im Anschluss die passendste Kombination für die zuvor aufgeführten Zwecke diskutiert.

5.3.1. Vitamin D

In den meisten der Untersuchungen lassen sich die verschiedenen Futtergruppen anhand der Ergebnisse in 2 Hauptgruppen unterscheiden: Gruppen mit der vollen Dosis Vitamin D₃ und Gruppen mit reduzierter Dosis oder ohne Vitamin D₃. Diese Ergebnisse geben einen deutlichen Anhalt dafür, dass unter den drei betrachteten Futterzusätzen der einflussreichste begünstigende Faktor für eine kalzifizierende Degeneration das Vitamin D ist.

Vitamin D wird über die Nahrung aufgenommen oder (im vorliegenden Tierversuch vernachlässigbar) endogen unter Einfluss ultravioletter Strahlung in der Haut synthetisiert und in der Niere aktiviert. Die biologisch aktive Form kann in der Niere nur bei einer suffizienten Nierenfunktion aus dem oral aufgenommenen Vitamin D₃ gebildet werden. Im vorliegenden Versuch kann anhand der erhobenen Kreatinin-Werte von einer normalen Nierenfunktion ausgegangen werden. Vitamin D hat physiologischerweise eine wichtige Funktion in der endokrinologischen Beeinflussung der Mineralisation des Skeletts inne. Es hebt über eine Förderung der Kalzium-Reabsorption der Nieren und eine Kalzium- und Phosphatresorption im Darm sowohl die Serumkalzium- als auch die Serumphosphatspiegel. Es wird angenommen, dass einerseits hohe Vitamin-D-Spiegel über die dadurch vermittelte Hyperphosphatämie und

Hyperkalzämie auch zentral zu einer ekto- (einschließlich vaskulärer) Kalzifizierung beitragen, dass aber andererseits moderate Vitamin D-Dosen über eine Modulation der Immunantwort protektive Effekte gegenüber der vaskulären Kalzifizierung haben können [159].

Alle Gruppen mit der vollen Dosis Vitamin D₃ zeigten einen deutlich höheren Serumkalziumspiegel als diejenigen ohne Vitamin D₃. Die Gruppe ohne Vitamin D₃, aber mit den prokalzifizierenden Zusätzen Cholesterin und Dikalziumphosphat, zeigte einen Serumkalziumwert, der annähernd mit dem der Kontrollgruppe übereinstimmte. Auch in der Gruppe mit der reduzierten Vitamin-D₃-Dosis (H) war eine deutliche Erhöhung des Serumkalziums zu beobachten. Diese Serumwerte implizieren, dass der Einfluss des Vitamin D auf den Kalziumspiegel wesentlich bedeutender ist als die eigentliche Kalziumphosphataufnahme. Dies schlug sich auch in der folgenden Kalzifizierung der Organe nieder. Die Organe der Tiere mit der vollen Dosis Vitamin D₃ im Futter zeigten eine eindeutig stärkere Kalzifizierung als jene mit reduzierter Vitamin-D₃-Dosis oder ohne Vitamin D₃. Dies ließ sich im Von-Kossa-Score zu allen Zeitpunkten beobachten. Diese Beobachtungen galten sowohl für die Kalzifizierung der Aortenwand als auch für die Aortenklappenregion. Die Ergebnisse der Tiere mit reduzierten Dosen (H) zeigten, dass dabei die Ausprägung der Kalziumablagerung direkt mit der Vitamin-D₃-Dosis assoziiert war. Auch die Präparate dieser Tiere mit reduzierten Dosen der prokalzifizierenden Zusätze zeigten eine deutlichere Neigung zur Kalzifizierung im Vergleich mit den Futtergruppen ohne VD-Zusatz, wobei sich die Kalzifizierung in dieser Gruppe eher als langsam progrediente Mikrokalzifizierung darstellte. Eine funktionelle Einschränkung im Sinne einer Aortenklappenstenosierung ist jedoch auch bei diesen Tieren nach 12 Wochen Fütterung induziert worden, wie die Echokardiographie herausstellen konnte.

Auch durch Roosens et al. sowie Ngo et al. wurden an Ratten und Kaninchen eine dosisabhängige Kalzifizierung der Aortenklappen und der *Aorta ascendens* durch eine reine Vitamin-D-Supplementation beschrieben [166], [175]. Unter Berücksichtigung der gefressenen Futtermenge der Tiere und des Körpergewichts war in der vorliegenden Studie jedoch im Vergleich mit den Daten der Futterstudie von Ngo et al. eine deutlich höhere Vitamin-D-Dosis im Futter nötig, um in den Ratten ein mit den Kaninchen vergleichbares Ausmaß der Kalzifizierung nach 8 Wochen zu beobachten. Dies ist ein erneuter Hinweis auf die größere Resistenz von Ratten gegenüber einer kardiovaskulären Degeneration. Ngo et al. konnten ebenfalls unter reinem Vitamin-D-Zusatz ohne Cholesterin nach 8 Wochen Lipidvakuolen im Aortenklappenansatz von Kaninchen nachweisen. Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Studie an Ratten nicht bestätigt.

Ebenfalls zeigte sich in Abhängigkeit vom Grad der Kalzifizierung und damit von der Vitamin-D-Dosis ein niedrigstufiger entzündlicher Gewebsumbau und das *Remodeling* des Gewebes. So konnten insbesondere bei den Tieren der Futtergruppen mit der vollen Dosis Vitamin D in den Regionen der stärksten Kalzifizierung die MMP-Hochregulation, die neointimale Hyperplasie mit phänotypisch spindelförmigen Zellen, die Areale mit vitalen Desmin- und α -SMA-negativen Zellen in der Aortenwand sowie anhand der chondrozytären, Syndecan-3-positiven Zellen und der Hochregulation der Biomarker für eine enchondrale Ossifikation in der PCR eine osteogene Transformation beobachtet werden. Die zuvor erwähnten vergleichbaren Studien von Roosens et al. sowie Ngo et al. an Kaninchen und Ratten betrachteten den Gewebsumbau im Sinne einer typischen Folge einer Verletzung nicht [166], [175], wobei Ngo et al. einen Makrophagennachweis im Sinne eines Entzündungsprozesses beschrieben.

Leider ging eine starke Kalzifizierung bei den Tieren mit der vollen Dosis Vitamin D₃ auch mit einer Verschlechterung des klinischen Bildes der Tiere einher. So zeigten insbesondere diese Tiere einen reduzierten Allgemeinzustand und nach etwa 8 Wochen beginnend eine zunehmend versteifte Wirbelsäulenkyphose, die eine deutliche Einschränkung des Bewegungsausmaßes zur Folge hatte. Auch bei der Betrachtung der gefressenen Futtermenge und des Körpergewichts fällt die Vitamin-D-abhängige Verschlechterung des klinischen Bildes auf. Es zeigte sich hier ebenso ein starker Zusammenhang mit der Vitamin-D-Dosis: Während man bei den Tieren ohne oder mit reduziertem Vitamin-D-Zusatz über den gesamten Beobachtungszeitraum eine gleichbleibende Nahrungsaufnahme und eine konstante Gewichtszunahme wie in der Kontrollgruppe beobachten konnte, zeigten die Tiere mit der vollen Dosis Vitamin D₃ einen deutlichen Abwärtstrend in der gefressenen Futtermenge einen niedrigeren Gewichtszuwachs, der nach etwa 8 Wochen ebenfalls einen Abwärtstrend zeigte. Die Herzgewichte der Tiere zeigten wegen des geringen Organgewichtes und der schwierigen Vergleichbarkeit durch die individuelle Freipräparation weniger signifikant, entwickelten sich aber mit derselben Tendenz wie die Körpergewichte.

Dass die Induktion eines degenerativen Prozesses auch eine gewisse Verschlechterung des klinischen Bildes mit sich bringt, ist vorhersehbar. Allerdings sollte zur weitestmöglichen Schonung des Versuchstieres der Beobachtungszeitraum mit einer deutlichen Einschränkung des Allgemeinzustandes möglichst kurz gehalten werden. Insbesondere die übermäßige Kalzifizierung außerhalb des kardiovaskulären Systems, beispielsweise im Skelett, stellt eine deutliche Einschränkung für ein Versuchstier dar. Deshalb ist ein sehr langer Beobachtungszeitraum unter einem hoch dosierten Vitamin-D-Futterzusatz zu vermeiden.

5.3.2. Cholesterin

Ein erhöhtes LDL/HDL-Verhältnis ist ein wichtiger Aspekt der kalzifizierenden Degeneration des kardiovaskulären Systems des Menschen. Da die alimentäre Induktion einer kardiovaskulären Degeneration auf der vermehrten Exposition durch bekannte Risikofaktoren beruht und ein ungünstiges Lipoproteinprofil zu diesen Risikofaktoren zählt, ist auch ein hochdosierter Cholesterinzusatz in zahlreichen Futterstudien zur Degeneration von Aortenklappe und Gefäßen in Kaninchen verwendet worden.

In der Serumanalyse zeigten alle Tiere mit einem Cholesterinzusatz im Futter einen erhöhten Serumcholesterinspiegel und ein erhöhtes LDL/HDL-Verhältnis, also ein ungünstigeres Lipoproteinprofil. Die Triglyceride im Serum zeigten sich durch die höhere Cholesterinaufnahme nicht betroffen. Passend zu den Beobachtungen von Drolet et al. [164], die einen zusätzlichen Serumcholesterinanstieg unter einem Vitamin-D-Zusatz zum Cholesterin offenbarten, induzierte auch ein Futterzusatz ohne Cholesterin, aber mit hochdosiertem Vitamin D zu allen Zeitpunkten erhöhte Gesamtcholesterinwerte. Allerdings zeigte diese Gruppe ein niedrigeres LDL, was in einem deutlich günstigeren LDL/HDL-Verhältnis resultierte. Insbesondere die Kombination aus Vitamin D und Cholesterin zeigte sich bezogen auf ein ungünstiges LDL/HDL-Verhältnis wirkungsvoll, was auch Tang et al. zuvor postulierten [176].

In einigen Futterstudien ist an Kaninchen gezeigt worden, dass eine Hyperlipidämie nicht nur in der Lage ist, eine Aufnahme der Lipide in das Aortenklappengewebe und eine subendotheliale Ablagerung von Lipoproteinen zu fördern [167], [168]. Sie scheint in Kaninchenaortenklappen zudem fähig, einen pathologischen Gewebsumbau mit einer vermehrten Apoptoserate, einem inflammatorischen Prozess und Zeichen für eine osteochondrogene Transformation zu induzieren

[94], [169]. Auch in der Aorta von Kaninchen konnten über einen Nahrungszusatz mit Cholesterin der Atherosklerose ähnliche Läsionen provoziert werden [170]. Allerdings zeigten die Gewebe der hypercholesterinämischen Tiere in diesen Studien keine Neigung zu einer verstärkten Kalzifizierung.

In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigte sich in den Organen der Ratten der Gruppe III unter einer hohen Dosis Cholesterin, aber ohne Vitamin D, keine signifikante Kalzifizierung. Auch in der Futtergruppe ohne Cholesterin zeigte sich keine wesentliche Verringerung der Kalzifizierung im Vergleich mit anderen Vitamin-D-haltigen Gruppen. Ebenso überschatteten die Effekte des Vitamin-D-Zusatzes diejenigen des Cholesterins in der Ausprägung des konsekutiven pathologischen Gewebsumbaus. Ein hochdosierter Cholesterinzusatz scheint zudem in Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Einfluss auf das Wachstum, die gefressene Futtermenge, den Gewichtszuwachs oder das klinische Bild der Versuchstiere zu haben. Selbst die Lipidvakuolen im Aortenklappenansatz fielen in der Gruppe mit hochdosiertem Cholesterin, aber ohne Vitamin D, zu späteren Beobachtungszeitpunkten nicht ins Gewicht.

Jedoch scheint insbesondere die Kombination von Vitamin D und Cholesterin wirkungsvoll in der Akzeleration einer kalzifizierenden kardiovaskulären Degeneration. Bereits seit Jahrzehnten dient eine Kombination von Vitamin D und Cholesterin als Atherosklerosemodell in Kaninchen [162]. In den Organen von Ratten wurde die prokalzifizierende Wirkung der Kombination Cholesterin und Vitamin D ebenfalls beobachtet: Tang et al. zeigten eine Induktion von Kalziumablagerungen in den Arterienwänden der Tiere in größerem Ausmaß als unter einem alleinigen Futterzusatz von Vitamin D [176]. Auch in der vorliegenden Studie zeigt die *in situ* Zymographie der Aorten, welche die *Remodeling*-Aktivität veranschaulicht, die höchsten Werte der MMP-Aktivität in den Tieren der Gruppen mit einer Kombination aus Vitamin D und Cholesterin. Ebenso persistieren die Lipidablagerungen und die chondrozytären Zellen in der Basis der Aortenklappensegel nur in diesen Gruppen. In den anderen Futtergruppen fielen sie zum frühen Beobachtungszeitpunkt nach 4 Wochen auf, verschwanden aber zu den späteren Zeitpunkten. Diese Beobachtungen passen zu den Veränderungen, die bereits Hass et al. Anfang der 1960er Jahre unter einem Futterzusatz von Vitamin D und Cholesterin in den Arterien von Kaninchen beschrieben [162].

Die Wirkung einer Kombination von Vitamin D und Cholesterin in Bezug auf eine funktionelle Einschränkung wurde kürzlich von Hekimian et al. angezweifelt, nachdem sie zwar eine Kalzifizierung der Aorta ascendens induzieren konnten und eine Verdickung der Aortenklappensegel sowie einen gewissen Gewebsumbau nachweisen konnten, aber auch nach dreimonatiger Fütterung von Kaninchen weder eine Aortenklappenkalzifizierung noch eine funktionelle Einschränkung in der Echokardiographie nachweisen konnten [163]. Jedoch erwies sich die Kombination in widersprechenden Studien an Kaninchen mit einem gleich langen Beobachtungszeitraum auch in funktioneller Hinsicht als wirkungsvoll: Drolet et al. beobachteten echokardiographisch eine Erhöhung des transvalvulären Druckgradienten und eine Herabsetzung der Öffnungsfläche der Aortenklappe. Beide Parameter fielen hier eindrucksvoller aus als unter einem reinen Vitamin-D- oder einem reinen Cholesterin-Zusatz [164], [165]. In Einklang damit konnte in der vorliegenden Studie an Ratten zum Explantationszeitpunkt nach 3 Monaten sogar eine noch größere Erhöhung des Druckgradienten über der Aortenklappe nachgewiesen werden.

5.3.3. Dikalziumphosphat

Kalzium- und Phosphatlevel im Serum sind über ein gemeinsames Löslichkeitsprodukt eng miteinander verbunden. Insbesondere erhöhte Serum-Phosphatlevel gelten deshalb als mitverantwortlich für eine vermehrte Kalzifizierung [157]. Eine Hyperphosphatämie gilt als Stimulus sowohl für eine Mineralisation glatter Muskelzellen in den Gefäßwänden als auch für eine Kalzifizierung der Aortenklappenregion [124], [158]. Shuvy et al. zeigten, dass sich eine Hochdosis-Phosphat-Fütterung auch im Tierversuch als wirksam in der Induktion einer Aortenklappenkalzifizierung erweist [173].

Passend zu diesen Grundlagen steigerte ein Kalziumphosphatzusatz zusätzlich zu der Kombination aus Vitamin D und Cholesterin die Kalziumablagerungen an der Aortenklappe und der Aortenwand erneut. Auch in der Quantifizierung der Gewebs-*Remodeling*-Aktivität der Aortenklappenregion durch die *in situ* Zymographie zeigte sich der Kalziumphosphatzusatz als wirkungsvoll in der erneuten Steigerung der Werte. Diese Beobachtungen passen auch zu den Ergebnissen von Wu-Wong et al., die *in vitro* die kalzifizierenden Effekte einer Kombination aus Phosphat und Vitamin-D-Analoga zeigen konnten [174]. Im direkten Vergleich wurden jedoch auch die prokalzifizierenden Effekte des Kalziumphosphates von denen des Vitamin D übertroffen. Auch in der Analyse des Serumkalziumspiegels zeigte sich der Zusatz des Dikalziumphosphates gegenüber den Wirkungen des Vitamin D als zweitrangig. Der Kalziumphosphatzusatz zeigte jedoch auch in der Serumanalyse Effekte. So konnte durch den Zusatz zu der Kombination aus Vitamin D und Cholesterin eine weitere Steigerung des LDL/HDL Verhältnisses erzielt werden.

5.3.4. Auswahl der passenden Futtergruppe

Es wurde bisher dargestellt, dass die induzierten Effekte der prokalzifizierenden Futterzusätze in Ratten dem Vergleich mit humanen degenerativen Prozessen des kardiovaskulären Systems und der Degeneration von Bioprothesen standhalten, auch wenn sie in einigen Punkten kein hundertprozentiges Abbild darstellen. Des Weiteren wurden die Unterschiede in der Ausprägung der induzierten Effekte zwischen den verschiedenen Futtergruppen und -bestandteilen einander gegenübergestellt. Im Folgenden muss aus den vorliegenden Daten die zu bevorzugende Futtermischung für den genannten Zweck - die alimentäre Induktion einer kalzifizierenden Aortenklappensklerose in Ratten und eine akzelerierte kardiovaskuläre Degeneration - herausgestellt werden. Die weiteren zuvor genannten Ansprüche an das zu entwickelnde Modell sind eine Darstellung kontrollierter Kalzifizierungsprozesse in kurzen Zeiträumen, zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse und eine weitestmögliche Schonung des Versuchstieres. Anhand der hohen Versuchstierzahl von 102 Tieren, der eindeutigen Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den Futtergruppen und der Kontrollgruppe sowie den häufig hoch signifikanten Ergebnissen kann von zuverlässig reproduzierbaren Ergebnissen ausgegangen werden.

Die Kombination einer hohen Dosis aller drei betrachteter proatherogener und prokalzifizierender Futterzusätze eignet sich sehr gut zur Induktion einer raschen und ausgeprägten kardiovaskulären Kalzifizierung mit einigen Merkmalen der humanen degenerativen Prozesse. Leider ging die starke Kalzifizierung in den Tieren mit der vollen Dosis der prokalzifizierenden Zusätze, die sich deutlich von den Tieren der anderen Futtergruppen abhob, zu späteren Beobachtungszeitpunkten auch mit einer Verschlechterung des klinischen Bildes der Tiere einher. Die Futterzusätze mit hohen Dosen Vitamin D beeinflussten nicht nur das kardiovaskuläre System, sondern resultierten durch die übermäßige Kalzifizierung auch in einer physischen Einschränkung und einem Verlust von Körpergewicht nach 8-12 Wochen. Deshalb sollten Futtermischungen mit einer so hohen Vitamin-

D-Dosis nicht in Studien mit längeren Verlaufskontrollen verwendet werden. Für Studien mit einem Beobachtungszeitraum, der sich über mehr als 8-12 Wochen erstreckt, oder Versuchen, in denen die kalzifizierenden Aspekte der kardiovaskulären Degeneration nicht im Fokus stehen beziehungsweise in denen es nicht primär um eine Implantatdegeneration geht, sind eher reduzierte Dosen der Futterzusätze Vitamin D, Cholesterin und Kalziumphosphat zu wählen.

Auch die Tiere mit reduzierten Dosen der prokalzifizierenden Zusätze (H mit 150.000 IE/kg Vitamin D, 0,75 % Dikalziumphosphat und 1 % Cholesterin) zeigten eine deutliche Neigung zur Kalzifizierung im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Kalzifizierung stellte sich in dieser Gruppe eher als langsam progrediente Mikrokalzifizierung der Aortenklappenregion und der großen Gefäße dar. Dies wird aus den Ergebnissen der von Kossa Färbung nach 12 Wochen Fütterung ersichtlich. Durch die langsamere Progression der Kalzifizierung werden ein physiologisches somatisches Wachstum und eine unauffällige klinische Erscheinung der Versuchstiere ermöglicht. Die gefressenen Futtermengen entsprachen ebenfalls denen der Kontrollgruppe. Auch wenn die Aorten dieser Futtergruppe in der μ CT-Quantifizierung nach 12 Wochen im Vergleich zur Volldosis-Gruppe durch ein deutlich niedrigeres Kalzifizierungsvolumen auffielen, erwies sich auch die Kombination der reduzierten Dosen der prokalzifizierenden Zusätze als funktionell wirksam. Die Erhöhung des transvalvulären Druckgradienten in der Gruppe mit reduzierten Futterzusätzen überstieg sogar die Werte der Hochdosisgruppe. Auch fiel insbesondere in dieser Futtergruppe eine Erhöhung der Entzündungsparameter auf. Diese Futtermischung mit einer Kombination reduzierter Dosen von Vitamin D, Cholesterin und Kalziumphosphat erfüllt alle genannten Voraussetzungen für Studien mit längeren Beobachtungszeiträumen, die sich über mehr als 8-12 Wochen erstrecken.

5.3.5. Ausblick

Durch das entwickelte Futtermodell ergibt sich die Möglichkeit, kardiovaskuläre Implantate in kurzen Beobachtungszeiträumen zu bewerten. Es erfüllt alle Anforderungen, um in Zukunft neue Ansätze bei der Entwicklung von kardiovaskulären Prothesen *in vivo* vergleichen zu können. Die Eignung des Modells in diesem Zusammenhang konnte bereits unter Beweis gestellt werden: In einer ergänzenden Studie wurde die prokalzifizierende Kombination der Hochdosis-Futtergruppe dazu verwendet, kryokonservierte und dezellularisierte Aortenkonduitimplantate miteinander zu vergleichen und die prokalzifizierenden metabolischen Bedingungen auf das *Remodeling* der Aortenkonduits zu testen [178]. Das Futtermodell erwies sich so als geeignet, in einem kurzen Beobachtungszeitraum die Überlegenheit der dezellularisierten Implantate mit einer geringeren Implantatkalzifizierung, einer geringeren osteochondrogenen Transformation, einer geringeren neointimalen Hyperplasie und einer geringeren inflammatorischen Reaktion zu unterstreichen. Weitere *in vivo* Studien mit modifizierten kardiovaskulären Implantaten werden in unserer Arbeitsgruppe bearbeitet.

Darüber hinaus kann das Modell als hilfreiches Werkzeug dienen, die eigentlichen zur Kalzifizierung von Implantaten führenden Prozesse näher zu untersuchen. Der folgende Schritt zur Modelloptimierung wäre ein Vergleich der Effekte verschiedener prokalzifizierender Futterzusätze in verschiedenen Dosierungen auf die Implantatdegeneration *in vivo*. Studien, die diese pathophysiologischen Prozesse fokussieren, können von der Induktion der prodegenerativen metabolischen Bedingungen über das Futter profitieren. In der Folge ist das Futtermodell auch für die Testung potenziell protektiver Maßnahmen gegenüber der Implantatdegeneration anhand

eines *in vivo* Versuches mit dem gleichen Implantat und den verschiedenen zu testenden therapeutischen Maßnahmen sinnvoll einsetzbar.

Zusätzlich zu der bisherigen ausführlichen Bewertung der verschiedenen alimentär induzierten Effekte ist auch in der Zukunft eine noch weitere systemische Begutachtung dieser Effekte mit einer ausgedehnteren Methodik denkbar. Beispielsweise konnten, wie bereits zuvor ausgeführt, frühe Stadien der Kalzifizierung im nativen μ CT nicht erfasst werden, was sich auch in der großen Differenz in der Quantifizierung zwischen Volldosis-Futtergruppe und der Futtergruppe mit reduzierten Futterzusätzen nach 12 Wochen niederschlug. Hier ist eine anschließende Bewertung mit fluoreszierenden Bisphosphonaten und Nanopartikeln zur Erfassung von Mikrokalzifizierungen und einer beginnenden Inflammation möglich [180]. Ein weiterer Ansatzpunkt ist eine Spezifizierung der *in situ* Zymographie. Da insbesondere die MMPs -2 und -9 in der kardiovaskulären Kalzifizierung zentral zu sein scheinen [102], [105], [106], [109], [110], wäre es eine sinnvolle Fragestellung, die Aktivität der einzelnen Proteasen unter dem Futterzusatz zu differenzieren und die Aussage der *in situ* Zymographie so weiter zu präzisieren.

Der praktische Nutzen des entwickelten Modells beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Untersuchung der Degeneration kardiovaskulärer Prothesen oder deren Testung. Es kann auch dazu beitragen, Krankheiten wie die Aortenklappensklerose und auch die Atherosklerose besser verstehen und bewerten zu können, denn das Modell bietet die Möglichkeit, auch pathologische Prozesse an nativen Organen wie der Aortenklappe und der Aorta an Ratten zu induzieren und sogar einzelne Aspekte der Degeneration zu beeinflussen und somit systematisch untersuchen zu können. Bisher existierte kein tiefgehend und systematisch erforschtes Futtermodell zur kalzifizierenden Degeneration von Rattenaortenklappen. Dies ist durch das entwickelte Verfahren ermöglicht worden. Es kann beispielsweise eingesetzt werden, um sich der Beantwortung der Frage zu nähern, welche Faktoren die Auslöser und die Trigger einer osteochondrogenen Transformation sind und helfen, die Pathophysiologie dieser Prozesse besser zu verstehen. Ein tieferes Verständnis der molekularen Kaskade, die zu einer Aortenklappensklerose führt, kann auch in Bezug auf die Entwicklung neuer Behandlungsoptionen vorteilhaft sein, indem Schlüsselpunkte entlang der Kaskade modifiziert werden. Das neu entwickelte Futtermodell könnte eine verbesserte Bewertung dieser zukünftigen Behandlungsmöglichkeiten ermöglichen.

Selbstverständlich bietet auch dieses gute Modell noch Potential zur Optimierung. Eine weitere Ausarbeitung des funktionellen Charakters einer Aortenklappenstenose ist besonders wertvoll für eine weite Bandbreite an Studien zur präventiven und therapeutischen Studien in Bezug auf eine kardiale kalzifizierende Degeneration.

Der Fokus während der Modellentwicklung lag auf der Betrachtung der induzierten pathophysiologischen Prozesse im Herzklappenapparat und in den großen Arterien. Auch die Untersuchung der Veränderungen in weiteren Geweben und Organen ist für das Verständnis der durch das prodegenerative Futter induzierten Kalzifizierung wichtig. Typische kalzifizierungsanfällige Organe stellen zum Beispiel das Stützsystem und die harnableitenden Organe dar. So tritt auch im Rahmen einer Niereninsuffizienz eine nennenswerte Kalzifizierung auf. In Studien mit einem anderen Hauptfokus als der vorliegenden Untersuchung, könnte eine Aussage über die induzierten Veränderungen in diesen Organen sehr interessant werden.

5.4. Limitationen

Das entwickelte Modell der akzelerierten kardiovaskulären Kalzifizierung ist eingeschränkt durch die anatomischen Verhältnisse und die Physiologie der Versuchstiere. Es ist bekannt, dass Ratten, ähnlich wie auch Mäuse, eine gewisse natürliche Resistenz gegenüber der Entwicklung einer Atherosklerose aufweisen und weniger anfällig für eine kardiovaskuläre Degeneration sind als der Mensch. Während diese Prozesse im Menschen eine weit verbreitete Zivilisationskrankheit darstellen, entwickeln kleine Nager die typische Krankheitsmorphologie nicht spontan. Deshalb sind hohe Dosen prokalzifizierender und atherogener Futterzusätze notwendig, um sie zu induzieren. Dadurch wird das Ausmaß, in dem die resultierenden Veränderungen die metabolischen Bedingungen der humanen kardiovaskulären Erkrankungen darstellen, limitiert. Dies ist sichtbar an der Diskrepanz im Verteilungsmuster der Kalzifizierung in den Arterien, nicht nur auf mikroskopischer Ebene mit einer Betonung der Media mehr als der Intima wie beim Menschen, sondern auch auf makroskopischer Ebene in Betrachtung der Kalzifizierungsverteilung über die verschiedenen Aortenregionen hinweg im μ CT. Da die induzierten Bedingungen die Komplexität der degenerativen Kalzifizierung, wie sie in der humanen Atherosklerose bekannt ist, nur imitieren und nicht vollständig darstellen können, ist die direkte Schlussfolgerung von der Ratte auf den Menschen begrenzt.

5.5. Schlussfolgerungen

Durch den Vergleich verschiedener Kombinationen der Futterzusätze Vitamin D, Cholesterin und Dikalziumphosphat wurde ein Futtermodell entwickelt, das in der Lage ist, *in vivo* im Rattenorganismus prodegenerative metabolische Veränderungen zu schaffen und eine akzelerierte, kalzifizierende kardiovaskuläre Degeneration in Ratten zu induzieren.

Die vorgestellten Daten zeigen, dass eine Fütterung mit einer hohen Dosis Vitamin D (300.000 IE/kg) eine Hyperkalzämie sowie eine Hypercholesterinämie begünstigt und eine rasche Kalzifizierung am Aortenklappenansatz, in der Aortenklappe und in den Gefäßstrukturen im systemischen Kreislauf von Ratten induzieren kann. Die Futterzusätze Cholesterin und Kalziumphosphat sind zu dem genannten Zweck im direkten Vergleich zweitrangig. Auch das *Remodeling* des Gewebes ist hauptsächlich abhängig von der Vitamin-D-Dosis. Futterzusätze mit einer Kombination von Vitamin D und Cholesterin (2 %) steigern den Effekt sogar noch. Sie bewirken zusätzlich eine Erhöhung des LDL/HDL-Verhältnisses und eine anhaltende subendotheliale Ablagerung von Lipoproteinen in den Aortenklappenansätzen. Beides sind wichtige Aspekte der kalzifizierenden Degeneration des kardiovaskulären Systems des Menschen. Die zusätzliche Beigabe von Dikalziumphosphat (1,5 %) hat den Effekt einer weiteren Steigerung des LDL/HDL-Verhältnisses. Sie bewirkt ebenso eine weitere Steigerung der Kalziumablagerungen an der Aortenklappe und in der Aortenwand sowie eine noch weiter vermehrte Gewebs-*Remodeling*-Aktivität. Diese Futterzusammensetzung ist aufgrund einer Verschlechterung des klinischen Befundes der Versuchstiere und einer Einschränkung des somatischen Wachstums nach 8-12 Wochen allerdings nicht für längere Beobachtungszeiträume von mehr als 12 Wochen zu empfehlen.

Für Studien mit einem Beobachtungszeitraum, der sich über mehr als 12 Wochen erstreckt, oder Versuchen, in denen die kalzifizierenden Aspekte der kardiovaskulären Degeneration nicht im Vordergrund stehen beziehungsweise in denen es nicht primär um eine Implantatdegeneration geht, sind eher reduzierte Dosen der Futterzusätze Vitamin D, Cholesterin und Kalziumphosphat

zu bevorzugen. Auch die Tiere mit reduzierten Dosen der prokalzifizierenden Zusätze (H mit 150.000 IE/kg Vitamin D, 0,75 % Dikalziumphosphat und 1 % Cholesterin) zeigen eine deutliche Neigung zur Kalzifizierung, die sich eher als langsam progrediente Mikrokalzifizierung der Aortenklappenregion und der großen Gefäße darstellt. Diese reduzierten Dosen prokalzifizierender Futterzusätze sind in der Lage, funktionelle Einschränkungen im Sinne einer Aortenklappenstenose und einen niedrigstufigen entzündlichen Gewebsumbau zu induzieren.

Die facettenreichen, durch die prokalzifizierenden Futterzusätze induzierten Veränderungen in nativen Ratten unterscheiden sich in einigen Punkten von den humanen Pathologien, beispielsweise im Verteilungsmuster der Kalzifizierung in den großen Arterien. Allerdings halten sie dem Vergleich mit humanen degenerativen Prozessen des kardiovaskulären Systems und der Degeneration von Bioprothesen im Menschen stand. Die extremen prodegenerativen Bedingungen des Modells stellen eine gute Grundlage zur weiteren Erforschung degenerativer Prozesse *in vivo* dar. Dieser ausbalancierte diätische Trigger kommt zudem ohne die genetische Veränderung von Versuchstieren aus und ermöglicht kurze Beobachtungszeiträume.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2014, „Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2013“, Bd. Fachserie 12 Reihe 4, Nov. 2014.
- [2] B. F. Stewart, D. Siscovick, B. K. Lind, J. M. Gardin, J. S. Gottdiener, V. E. Smith, D. W. Kitzman, und C. M. Otto, „Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 29, Nr. 3, S. 630–634, März 1997.
- [3] B. Iung, „A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease“, *European Heart Journal*, Bd. 24, Nr. 13, S. 1231–1243, Juli 2003.
- [4] A. Funkat, A. Beckmann, J. Lewandowski, M. Frie, M. Ernst, W. Schiller, J. Gummert, und J. Cremer, „Cardiac Surgery in Germany during 2013: A Report on Behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery“, *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, Juli 2014.
- [5] M. Lindroos, M. Kupari, J. Heikkilä, und R. Tilvis, „Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 21, Nr. 5, S. 1220–1225, Apr. 1993.
- [6] J. Soler-Soler, „VALVE DISEASE: Worldwide perspective of valve disease“, *Heart*, Bd. 83, Nr. 6, S. 721–725, Juni 2000.
- [7] A. J. Dare, J. P. Veinot, W. D. Edwards, H. D. Tazelaar, und H. V. Schaff, „New observations on the etiology of aortic valve disease: a surgical pathologic study of 236 cases from 1990“, *Hum. Pathol.*, Bd. 24, Nr. 12, S. 1330–1338, Dez. 1993.
- [8] V. T. Nkomo, J. M. Gardin, T. N. Skelton, J. S. Gottdiener, C. G. Scott, und M. Enriquez-Sarano, „Burden of valvular heart diseases: a population-based study“, *The Lancet*, Bd. 368, Nr. 9540, S. 1005–1011, Sep. 2006.
- [9] Statistisches Bundesamt, Berlin 2009, „Bevölkerung Deutschlands bis 2060, 12. Koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung“ .
- [10] W. G. Daniel, H. Baumgartner, C. Gohlke-Bärwolf, P. Hanrath, D. Horstkotte, K. C. Koch, A. Mügge, H. J. Schäfers, und F. A. Flachskampf, „Klappenvitien im Erwachsenenalter“, *Clinical Research in Cardiology*, Bd. 95, Nr. 11, S. 620–641, Nov. 2006.
- [11] Authors/Task Force Members, A. Vahanian, O. Alfieri, F. Andreotti, M. J. Antunes, G. Baron-Esquivias, H. Baumgartner, M. A. Borger, T. P. Carrel, M. De Bonis, A. Evangelista, V. Falk, B. Iung, P. Lancellotti, L. Pierard, S. Price, H.-J. Schafers, G. Schuler, J. Stepinska, K. Swedberg, J. Takkenberg, U. O. Von Oppell, S. Windecker, J. L. Zamorano, M. Zembala, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), J. J. Bax, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, B. A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P. A. Sirnes, M. Tendera, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, Document Reviewers, B. A. Popescu, L. Von Segesser, L. P. Badano, M. Bunc, M. J. Claeys, N. Drinkovic, G. Filippatos, G. Habib, A. P. Kappetein, R. Kassab, G. Y. H. Lip, N. Moat, G. Nickenig, C. M. Otto, J. Pepper, N. Piazza, P. G. Pieper, R. Rosenhek, N. Shuka, E. Schwammenthal, J. Schwitter, P. T. Mas, P. T. Trindade, und T. Walther, „Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)“, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Bd. 42, Nr. 4, S. S1–S44, Okt. 2012.
- [12] S. H. Rahimtoola, „Current Evaluation and Management of Patients With Mitral Stenosis“, *Circulation*, Bd. 106, Nr. 10, S. 1183–1188, Sep. 2002.
- [13] H. M. Connolly, J. K. Oh, T. A. Orszulak, S. L. Osborn, V. L. Roger, D. O. Hodge, K. R. Bailey, J. B. Seward, und A. J. Tajik, „Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis With Severe Left Ventricular Dysfunction: Prognostic Indicators“, *Circulation*, Bd. 95, Nr. 10, S. 2395–2400, Mai 1997.
- [14] H. M. Connolly, J. K. Oh, H. V. Schaff, V. L. Roger, S. L. Osborn, D. O. Hodge, und A. J. Tajik, „Severe Aortic Stenosis With Low Transvalvular Gradient and Severe Left Ventricular

- Dysfunction : Result of Aortic Valve Replacement in 52 Patients“, *Circulation*, Bd. 101, Nr. 16, S. 1940–1946, Apr. 2000.
- [15] A. Vahanian, O. Alfieri, N. Al-Attar, M. Antunes, J. Bax, B. Cormier, A. Cribier, P. De Jaegere, G. Fournial, A. P. Kappetein, J. Kovac, S. Ludgate, F. Maisano, N. Moat, F. Mohr, P. Nataf, L. Piérard, J. L. Pomar, J. Schofer, P. Tornos, M. Tuzcu, B. van Hout, L. K. Von Segesser, T. Walther, European Association of Cardio-Thoracic Surgery, European Society of Cardiology, und European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions, „Transcatheter valve implantation for patients with aortic stenosis: a position statement from the European Association of Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) and the European Society of Cardiology (ESC), in collaboration with the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI)“, *Eur. Heart J.*, Bd. 29, Nr. 11, S. 1463–1470, Juni 2008.
- [16] R. A. Nishimura, C. M. Otto, R. O. Bonow, B. A. Carabello, J. P. Erwin, R. A. Guyton, P. T. O’Gara, C. E. Ruiz, N. J. Skubas, P. Sorajja, T. M. Sundt, J. D. Thomas, und American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, „2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 63, Nr. 22, S. 2438–2488, Juni 2014.
- [17] S. H. Rahimtoola, „Choice of Prosthetic Heart Valve in Adults“, *Journal of the American College of Cardiology*, Bd. 55, Nr. 22, S. 2413–2426, Juni 2010.
- [18] J. M. Brennan, F. H. Edwards, Y. Zhao, S. O’Brien, M. E. Booth, R. S. Dokholyan, P. S. Douglas, E. D. Peterson, und DEClIDE AVR (Developing Evidence to Inform Decisions about Effectiveness–Aortic Valve Replacement) Research Team, „Long-term safety and effectiveness of mechanical versus biologic aortic valve prostheses in older patients: results from the Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Surgery National Database“, *Circulation*, Bd. 127, Nr. 16, S. 1647–1655, Apr. 2013.
- [19] K. Hammermeister, G. K. Sethi, W. G. Henderson, F. L. Grover, C. Oprian, und S. H. Rahimtoola, „Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 36, Nr. 4, S. 1152–1158, Okt. 2000.
- [20] K. Golczyk, M. Kompis, L. Englberger, T. P. Carrel, und M. Stalder, „Heart valve sound of various mechanical composite grafts, and the impact on patients’ quality of life“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 19, Nr. 2, S. 228–232, März 2010.
- [21] M. Ruel, A. Kulik, F. D. Rubens, P. Bédard, R. G. Masters, A. L. Pipe, und T. G. Mesana, „Late incidence and determinants of reoperation in patients with prosthetic heart valves“, *Eur J Cardiothorac Surg*, Bd. 25, Nr. 3, S. 364–370, März 2004.
- [22] F. El-Ahdab, D. K. Benjamin, A. Wang, C. H. Cabell, V. H. Chu, M. E. Stryjewski, G. R. Corey, D. J. Sexton, L. B. Reller, und V. G. Fowler, „Risk of endocarditis among patients with prosthetic valves and *Staphylococcus aureus* bacteremia“, *Am. J. Med.*, Bd. 118, Nr. 3, S. 225–229, März 2005.
- [23] F. J. Schoen und R. J. Levy, „Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention“, *The Annals of Thoracic Surgery*, Bd. 79, Nr. 3, S. 1072–1080, März 2005.
- [24] D. R. Clarke, D. N. Campbell, A. R. Hayward, und D. A. Bishop, „Degeneration of aortic valve allografts in young recipients“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 105, Nr. 5, S. 934–941; discussion 941–942, Mai 1993.
- [25] A. C. Yankah, V. Alexi-Meskishvili, Y. Weng, K. Schorn, P. E. Lange, und R. Hetzer, „Accelerated degeneration of allografts in the first two years of life“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 60, Nr. 2 Suppl, S. S71–76; discussion 576–577, Aug. 1995.
- [26] J. Ennker, A. Albert, und I. C. Ennker, „Stentless aortic valves. Current aspects“, *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth*, Bd. 4, Nr. 2, S. 77–82, 2012.

- [27] E. R. Nowicki, G. B. Pettersson, N. G. Smedira, E. E. Roselli, E. H. Blackstone, und B. W. Lytle, „Aortic allograft valve reoperation: surgical challenges and patient risks“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 86, Nr. 3, S. 761–768.e2, Sep. 2008.
- [28] N. G. Smedira, E. H. Blackstone, E. E. Roselli, C. C. Laffey, und D. M. Cosgrove, „Are allografts the biologic valve of choice for aortic valve replacement in nonelderly patients? Comparison of explantation for structural valve deterioration of allograft and pericardial prostheses“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 131, Nr. 3, S. 558–564.e4, März 2006.
- [29] I. El-Hamamsy, L. Clark, L. M. Stevens, Z. Sarang, G. Melina, J. J. M. Takkenberg, und M. H. Yacoub, „Late outcomes following freestyle versus homograft aortic root replacement: results from a prospective randomized trial“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 55, Nr. 4, S. 368–376, Jan. 2010.
- [30] J. G. Byrne, K. Rezai, J. A. Sanchez, R. A. Bernstein, E. Okum, M. Leacche, J. M. Balaguer, S. Prabhakaran, C. R. Bridges, und R. S. D. Higgins, „Surgical management of endocarditis: the society of thoracic surgeons clinical practice guideline“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 91, Nr. 6, S. 2012–2019, Juni 2011.
- [31] N. T. Kouchoukos, P. Masetti, N. J. Nickerson, C. F. Castner, W. D. Shannon, und V. G. Dávila-Román, „The Ross procedure: long-term clinical and echocardiographic follow-up“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 78, Nr. 3, S. 773–781; discussion 773–781, Sep. 2004.
- [32] V. M. Montori und H. H. Ting, „Sharing Decision Making About Cardiac Surgery: Improving the Quality of the Decision to Undergo or Forego Surgery“, *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*, Bd. 2, Nr. 6, S. 519–521, Nov. 2009.
- [33] M. W. A. van Geldorp, W. R. Eric Jamieson, A. P. Kappetein, J. Ye, G. J. Fradet, M. J. C. Eijkemans, G. L. Grunkemeier, A. J. J. C. Bogers, und J. J. M. Takkenberg, „Patient outcome after aortic valve replacement with a mechanical or biological prosthesis: Weighing lifetime anticoagulant-related event risk against reoperation risk“, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Bd. 137, Nr. 4, S. 881–886.e5, Apr. 2009.
- [34] I. Vesely, „Heart valve tissue engineering“, *Circ. Res.*, Bd. 97, Nr. 8, S. 743–755, Okt. 2005.
- [35] O. E. Teebken, T. Kofidis, P. Akhyari, und A. Haverich, „[Tissue engineering: in vitro creation of tissue substitutes]“, *Zentralbl Chir*, Bd. 132, Nr. 3, S. 236–246, Juni 2007.
- [36] P. Akhyari, P. Minol, A. Assmann, M. Barth, H. Kamiya, und A. Lichtenberg, „[Tissue engineering of heart valves]“, *Chirurg*, Bd. 82, Nr. 4, S. 311–318, Apr. 2011.
- [37] S. P. Hoerstrup, R. Sodian, S. Daebritz, J. Wang, E. A. Bacha, D. P. Martin, A. M. Moran, K. J. Guleserian, J. S. Sperling, S. Kaushal, J. P. Vacanti, F. J. Schoen, und J. E. Mayer, „Functional living trileaflet heart valves grown in vitro“, *Circulation*, Bd. 102, Nr. 19 Suppl 3, S. III44–49, Nov. 2000.
- [38] T. Shinoka, „Tissue engineered heart valves: autologous cell seeding on biodegradable polymer scaffold“, *Artif Organs*, Bd. 26, Nr. 5, S. 402–406, Mai 2002.
- [39] U. A. Stock, M. Nagashima, P. N. Khalil, G. D. Nollert, T. Herden, J. S. Sperling, A. Moran, J. Lien, D. P. Martin, F. J. Schoen, J. P. Vacanti, und J. E. Mayer, „Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 119, Nr. 4 Pt 1, S. 732–740, Apr. 2000.
- [40] H. Baraki, I. Tudorache, M. Braun, K. Höffler, A. Görler, A. Lichtenberg, C. Bara, A. Calistru, G. Brandes, M. Hewicker-Trautwein, A. Hilfiker, A. Haverich, und S. Cebotari, „Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model“, *Biomaterials*, Bd. 30, Nr. 31, S. 6240–6246, Okt. 2009.
- [41] P. Akhyari, H. Kamiya, P. Gwanmesia, H. Aubin, R. Tschierschke, S. Hoffmann, M. Karck, und A. Lichtenberg, „In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position“, *Eur J Cardiothorac Surg*, Bd. 38, Nr. 5, S. 539–546, Nov. 2010.
- [42] R. L. Knight, C. Booth, H. E. Wilcox, J. Fisher, und E. Ingham, „Tissue engineering of cardiac valves: re-seeding of acellular porcine aortic valve matrices with human mesenchymal progenitor cells“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 14, Nr. 6, S. 806–813, Nov. 2005.

- [43] A. Lichtenberg, S. Cebotari, I. Tudorache, G. Sturz, M. Winterhalter, A. Hilfiker, und A. Haverich, „Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 15, Nr. 2, S. 287–293; discussion 293–294, März 2006.
- [44] A. Lichtenberg, I. Tudorache, S. Cebotari, M. Suprunov, G. Tudorache, H. Goerler, J.-K. Park, D. Hilfiker-Kleiner, S. Ringes-Lichtenberg, M. Karck, G. Brandes, A. Hilfiker, und A. Haverich, „Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions“, *Circulation*, Bd. 114, Nr. 1 Suppl, S. I559–565, Juli 2006.
- [45] A. Lichtenberg, I. Tudorache, S. Cebotari, S. Ringes-Lichtenberg, G. Sturz, K. Hoeffler, C. Hurschler, G. Brandes, A. Hilfiker, und A. Haverich, „In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions“, *Biomaterials*, Bd. 27, Nr. 23, S. 4221–4229, Aug. 2006.
- [46] S. P. Hoerstrup, A. Kadner, S. Melnitchouk, A. Trojan, K. Eid, J. Tracy, R. Sodian, J. F. Visjager, S. A. Kolb, J. Grunenfelder, G. Zund, und M. I. Turina, „Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells“, *Circulation*, Bd. 106, Nr. 12 Suppl 1, S. I143–150, Sep. 2002.
- [47] L. Dainese, A. Guarino, I. Burba, G. Esposito, G. Pompilio, G. Polvani, und A. Rossini, „Heart valve engineering: decellularized aortic homograft seeded with human cardiac stromal cells“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 21, Nr. 1, S. 125–134, Jan. 2012.
- [48] R. Sodian, P. Schaefermeier, S. Abegg-Zips, W. M. Kuebler, M. Shakibaei, S. Daebritz, J. Ziegelmueller, C. Schmitz, und B. Reichart, „Use of human umbilical cord blood-derived progenitor cells for tissue-engineered heart valves“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 89, Nr. 3, S. 819–828, März 2010.
- [49] A. Assmann, C. Delfs, H. Munakata, F. Schiffer, K. Horstkötter, K. Huynh, M. Barth, V. R. Stoldt, H. Kamiya, U. Boeken, A. Lichtenberg, und P. Akhyari, „Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating“, *Biomaterials*, Bd. 34, Nr. 25, S. 6015–6026, Aug. 2013.
- [50] F. D. A. da Costa, A. C. B. A. Costa, R. Prestes, A. C. Domanski, E. M. Balbi, A. D. A. Ferreira, und S. V. Lopes, „The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 90, Nr. 6, S. 1854–1860, Dez. 2010.
- [51] K. J. Zehr, M. Yagubyan, H. M. Connolly, S. M. Nelson, und H. V. Schaff, „Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: postoperative immunoreactivity and early results“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 130, Nr. 4, S. 1010–1015, Okt. 2005.
- [52] S. Goldstein, D. R. Clarke, S. P. Walsh, K. S. Black, und M. F. O’Brien, „Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 70, Nr. 6, S. 1962–1969, Dez. 2000.
- [53] S. Cebotari, A. Lichtenberg, I. Tudorache, A. Hilfiker, H. Mertsching, R. Leyh, T. Breyman, K. Kallenbach, L. Maniuc, A. Batrinac, O. Repin, O. Maliga, A. Ciubotaru, und A. Haverich, „Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells“, *Circulation*, Bd. 114, Nr. 1 Suppl, S. I132–137, Juli 2006.
- [54] A. Böning, R. H. Boedeker, U. P. Rosendahl, B. Niemann, S. Haberer, P. Roth, und J. a. C. Ennker, „Long-term results of mechanical and biological heart valves in dialysis and non-dialysis patients“, *Thorac Cardiovasc Surg*, Bd. 59, Nr. 8, S. 454–459, Dez. 2011.
- [55] M. Briand, P. Pibarot, J.-P. Després, P. Voisine, J. G. Dumesnil, F. Dagenais, und P. Mathieu, „Metabolic syndrome is associated with faster degeneration of bioprosthetic valves“, *Circulation*, Bd. 114, Nr. 1 Suppl, S. I512–517, Juli 2006.
- [56] W. G. Goodman, G. London, K. Amann, G. A. Block, C. Giachelli, K. A. Hruska, M. Ketteler, A. Levin, Z. Massy, D. A. McCarron, P. Raggi, C. M. Shanahan, N. Yorioka, und Vascular Calcification Work Group, „Vascular calcification in chronic kidney disease“, *Am. J. Kidney Dis.*, Bd. 43, Nr. 3, S. 572–579, März 2004.
- [57] E. Neven und P. C. D’Haese, „Vascular calcification in chronic renal failure: what have we learned from animal studies?“, *Circ. Res.*, Bd. 108, Nr. 2, S. 249–264, Jan. 2011.

- [58] P. Simon, M. T. Kasimir, G. Seebacher, G. Weigel, R. Ullrich, U. Salzer-Muhar, E. Rieder, und E. Wolner, „Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients“, *Eur J Cardiothorac Surg*, Bd. 23, Nr. 6, S. 1002–1006; discussion 1006, Juni 2003.
- [59] A. Assmann, P. Akhyari, C. Delfs, U. Flögel, C. Jacoby, H. Kamiya, und A. Lichtenberg, „Development of a growing rat model for the in vivo assessment of engineered aortic conduits“, *J. Surg. Res.*, Bd. 176, Nr. 2, S. 367–375, Aug. 2012.
- [60] H. Munakata, A. Assmann, B. Poudel-Bochmann, K. Horstkötter, H. Kamiya, Y. Okita, A. Lichtenberg, und P. Akhyari, „Aortic conduit valve model with controlled moderate aortic regurgitation in rats: a technical modification to improve short- and long-term outcome and to increase the functional results“, *Circ. J.*, Bd. 77, Nr. 9, S. 2295–2302, 2013.
- [61] W. Piper, *Innere Medizin*, 2. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer, 2013.
- [62] W. Siegenthaler und H. E. Blum, *Klinische Pathophysiologie*, 9. Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 2006.
- [63] N. M. Rajamannan, B. Gersh, und R. O. Bonow, „Calcific aortic stenosis: from bench to the bedside—emerging clinical and cellular concepts“, *Heart*, Bd. 89, Nr. 7, S. 801–805, Juli 2003.
- [64] S. Xu, A. C. Liu, und A. I. Gotlieb, „Common pathogenic features of atherosclerosis and calcific aortic stenosis: role of transforming growth factor-beta“, *Cardiovasc. Pathol.*, Bd. 19, Nr. 4, S. 236–247, Aug. 2010.
- [65] C. M. Otto, A. S. Pearlman, und C. L. Gardner, „Hemodynamic progression of aortic stenosis in adults assessed by Doppler echocardiography“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 13, Nr. 3, S. 545–550, März 1989.
- [66] E. Poggianti, L. Venneri, V. Chubuchny, Z. Jambrik, L. A. Baroncini, und E. Picano, „Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 41, Nr. 1, S. 136–141, Jan. 2003.
- [67] J. A. Kennedy, X. Hua, K. Mishra, G. A. Murphy, A. C. Rosenkranz, und J. D. Horowitz, „Inhibition of calcifying nodule formation in cultured porcine aortic valve cells by nitric oxide donors“, *Eur. J. Pharmacol.*, Bd. 602, Nr. 1, S. 28–35, Jan. 2009.
- [68] R. Wallin, N. Wajih, G. T. Greenwood, und D. C. Sane, „Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy“, *Med Res Rev*, Bd. 21, Nr. 4, S. 274–301, Juli 2001.
- [69] A. L. Sverdlov, D. T. M. Ngo, W. P. A. Chan, Y. Y. Chirkov, B. J. Gersh, J. J. McNeil, und J. D. Horowitz, „Determinants of aortic sclerosis progression: implications regarding impairment of nitric oxide signalling and potential therapeutics“, *Eur. Heart J.*, Bd. 33, Nr. 19, S. 2419–2425, Okt. 2012.
- [70] Y. Y. Chirkov, A. S. Holmes, S. R. Willoughby, S. Stewart, und J. D. Horowitz, „Association of aortic stenosis with platelet hyperaggregability and impaired responsiveness to nitric oxide“, *Am. J. Cardiol.*, Bd. 90, Nr. 5, S. 551–554, Sep. 2002.
- [71] L.-N. Zhang, J. F. Parkinson, C. Haskell, und Y.-X. Wang, „Mechanisms of intimal hyperplasia learned from a murine carotid artery ligation model“, *Curr Vasc Pharmacol*, Bd. 6, Nr. 1, S. 37–43, Jan. 2008.
- [72] A. C. Thomas und J. H. Campbell, „Smooth muscle cells of injured rat and rabbit arteries in culture: contractile and cytoskeletal proteins“, *Atherosclerosis*, Bd. 154, Nr. 2, S. 291–299, Feb. 2001.
- [73] S. E. P. New und E. Aikawa, „Cardiovascular calcification: an inflammatory disease“, *Circ. J.*, Bd. 75, Nr. 6, S. 1305–1313, 2011.
- [74] C. M. Otto, J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, A. M. Gown, und K. D. O’Brien, „Characterization of the early lesion of ‚degenerative‘ valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies“, *Circulation*, Bd. 90, Nr. 2, S. 844–853, Aug. 1994.
- [75] M. Jeziorska, C. McCollum, und D. E. Woolley, „Calcification in atherosclerotic plaque of human carotid arteries: associations with mast cells and macrophages“, *J. Pathol.*, Bd. 185, Nr. 1, S. 10–17, Mai 1998.

- [76] S. E. P. New, C. Goettsch, M. Aikawa, J. F. Marchini, M. Shibasaki, K. Yabusaki, P. Libby, C. M. Shanahan, K. Croce, und E. Aikawa, „Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques“, *Circ. Res.*, Bd. 113, Nr. 1, S. 72–77, Juni 2013.
- [77] J. Hjortnaes, J. Butcher, J.-L. Figueiredo, M. Riccio, R. H. Kohler, K. M. Kozloff, R. Weissleder, und E. Aikawa, „Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation“, *Eur. Heart J.*, Bd. 31, Nr. 16, S. 1975–1984, Aug. 2010.
- [78] N. Coté, A. Mahmut, Y. Bosse, C. Couture, S. Pagé, S. Trahan, M.-C. Boulanger, D. Fournier, P. Pibarot, und P. Mathieu, „Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease“, *Inflammation*, Bd. 36, Nr. 3, S. 573–581, Juni 2013.
- [79] J. J. Kaden, R. Kiliç, A. Sarikoç, S. Hagl, S. Lang, U. Hoffmann, M. Brueckmann, und M. Borggrefe, „Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic valve myofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification“, *Int. J. Mol. Med.*, Bd. 16, Nr. 5, S. 869–872, Nov. 2005.
- [80] Y. Tintut, J. Patel, F. Parhami, und L. L. Demer, „Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway“, *Circulation*, Bd. 102, Nr. 21, S. 2636–2642, Nov. 2000.
- [81] N. Saito, K. A. Pulford, J. Breton-Gorius, J. M. Massé, D. Y. Mason, und E. M. Cramer, „Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 139, Nr. 5, S. 1053–1059, Nov. 1991.
- [82] E. R. Andreeva, I. M. Pugach, und A. N. Orekhov, „Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro“, *Atherosclerosis*, Bd. 135, Nr. 1, S. 19–27, Nov. 1997.
- [83] L. Antonioli, P. Pacher, E. S. Vizi, und G. Haskó, „CD39 and CD73 in immunity and inflammation“, *Trends Mol Med*, Bd. 19, Nr. 6, S. 355–367, Juni 2013.
- [84] S. Deaglio und S. C. Robson, „Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity“, *Adv. Pharmacol.*, Bd. 61, S. 301–332, 2011.
- [85] F. Bönner, N. Borg, S. Burghoff, und J. Schrader, „Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury“, *PLoS ONE*, Bd. 7, Nr. 4, S. e34730, 2012.
- [86] H. F. Hoff, W. A. Bradley, C. L. Heideman, J. W. Gaubatz, M. D. Karagas, und A. M. Gotto, „Characterization of low density lipoprotein-like particle in the human aorta from grossly normal and atherosclerotic regions“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 573, Nr. 2, S. 361–374, Mai 1979.
- [87] C. Buono, J. J. Anzinger, M. Amar, und H. S. Kruth, „Fluorescent pegylated nanoparticles demonstrate fluid-phase pinocytosis by macrophages in mouse atherosclerotic lesions“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 119, Nr. 5, S. 1373–1381, Mai 2009.
- [88] K. D. O’Brien, D. D. Reichenbach, S. M. Marcovina, J. Kuusisto, C. E. Alpers, und C. M. Otto, „Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of ‘degenerative’ valvular aortic stenosis“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 16, Nr. 4, S. 523–532, Apr. 1996.
- [89] M. Olsson, J. Thyberg, und J. Nilsson, „Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 19, Nr. 5, S. 1218–1222, Mai 1999.
- [90] J. A. Ardans, A. P. Economou, J. M. Martinson, M. Zhou, und L. M. Wahl, „Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinase-1 and -9 by activated monocytes“, *J. Leukoc. Biol.*, Bd. 71, Nr. 6, S. 1012–1018, Juni 2002.
- [91] D. Mohty, P. Pibarot, J.-P. Després, C. Côté, B. Arsenaault, A. Cartier, P. Cosnay, C. Couture, und P. Mathieu, „Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 28, Nr. 1, S. 187–193, Jan. 2008.

- [92] C. Côté, P. Pibarot, J.-P. Després, D. Mohty, A. Cartier, B. J. Arsenault, C. Couture, und P. Mathieu, „Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis“, *Heart*, Bd. 94, Nr. 9, S. 1175–1180, Sep. 2008.
- [93] M. B. Rabuş, N. Kayalar, B. Sareyyüpoğlu, A. Erkin, K. Kirali, und C. Yakut, „Hypercholesterolemia association with aortic stenosis of various etiologies“, *J Card Surg*, Bd. 24, Nr. 2, S. 146–150, Apr. 2009.
- [94] N. M. Rajamannan, M. Subramaniam, M. Springett, T. C. Sebo, M. Niekrasz, J. P. McConnell, R. J. Singh, N. J. Stone, R. O. Bonow, und T. C. Spelsberg, „Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve“, *Circulation*, Bd. 105, Nr. 22, S. 2660–2665, Juni 2002.
- [95] Y. Tintut, Z. Alfonso, T. Saini, K. Radcliff, K. Watson, K. Boström, und L. L. Demer, „Multilineage potential of cells from the artery wall“, *Circulation*, Bd. 108, Nr. 20, S. 2505–2510, Nov. 2003.
- [96] N. M. Rajamannan, „Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Bd. 298, Nr. 1, S. H5–15, Jan. 2010.
- [97] M. Togashi, K. Tamura, Y. Masuda, und Y. Fukuda, „Comparative study of calcified changes in aortic valvular diseases“, *J Nippon Med Sch*, Bd. 75, Nr. 3, S. 138–145, Juni 2008.
- [98] Y. V. Bobryshev, R. S. Lord, und B. A. Warren, „Calcified deposit formation in intimal thickenings of the human aorta“, *Atherosclerosis*, Bd. 118, Nr. 1, S. 9–21, Nov. 1995.
- [99] S. T. Gould, S. Sriganapalan, C. A. Simmons, und K. S. Anseth, „Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease“, *Circ. Res.*, Bd. 113, Nr. 2, S. 186–197, Juli 2013.
- [100] S. Lehoux, Y. Castier, und A. Tedgui, „Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces“, *J. Intern. Med.*, Bd. 259, Nr. 4, S. 381–392, Apr. 2006.
- [101] E. R. Mohler, M. K. Chawla, A. W. Chang, N. Vyavahare, R. J. Levy, L. Graham, und F. H. Gannon, „Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 8, Nr. 3, S. 254–260, Mai 1999.
- [102] P. M. Taylor, P. Batten, N. J. Brand, P. S. Thomas, und M. H. Yacoub, „The cardiac valve interstitial cell“, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Bd. 35, Nr. 2, S. 113–118, Feb. 2003.
- [103] E. Rabkin, M. Aikawa, J. R. Stone, Y. Fukumoto, P. Libby, und F. J. Schoen, „Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves“, *Circulation*, Bd. 104, Nr. 21, S. 2525–2532, Nov. 2001.
- [104] M. H. Tayebjee, G. Y. H. Lip, und R. J. MacFadyen, „Matrix metalloproteinases in coronary artery disease: clinical and therapeutic implications and pathological significance“, *Curr. Med. Chem.*, Bd. 12, Nr. 8, S. 917–925, 2005.
- [105] N. Vyavahare, P. L. Jones, S. Tallapragada, und R. J. Levy, „Inhibition of matrix metalloproteinase activity attenuates tenascin-C production and calcification of implanted purified elastin in rats“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 157, Nr. 3, S. 885–893, Sep. 2000.
- [106] M. Bailey, S. Pillarisetti, P. Jones, H. Xiao, D. Simionescu, und N. Vyavahare, „Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification“, *Cardiovasc. Pathol.*, Bd. 13, Nr. 3, S. 146–155, Juni 2004.
- [107] V. K. Krishnamurthy, A. M. Opoka, C. B. Kern, F. Guilak, D. A. Narmoneva, und R. B. Hinton, „Maladaptive matrix remodeling and regional biomechanical dysfunction in a mouse model of aortic valve disease“, *Matrix Biol.*, Bd. 31, Nr. 3, S. 197–205, Apr. 2012.
- [108] N. Joghetaei, P. Akhyari, B. H. Rauch, P. Cullen, A. Lichtenberg, M. Rudelius, J. Pelisek, und R. Schmidt, „Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and membrane type 1-matrix metalloproteinase are expressed on tissue macrophages in calcific aortic stenosis and induce transmigration in an artificial valve model“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 142, Nr. 1, S. 191–198, Juli 2011.
- [109] I. Perrotta, E. Russo, C. Camastra, G. Filice, G. Di Mizio, F. Colosimo, P. Ricci, S. Tripepi, A. Amorosi, F. Triumbari, und G. Donato, „New evidence for a critical role of elastin in

- calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review“, *Histopathology*, Bd. 59, Nr. 3, S. 504–513, Sep. 2011.
- [110] Z. Li, L. Li, H. R. Zielke, L. Cheng, R. Xiao, M. T. Crow, W. G. Stetler-Stevenson, J. Froehlich, und E. G. Lakatta, „Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 148, Nr. 1, S. 121–128, Jan. 1996.
- [111] I. M. Loftus, A. R. Naylor, S. Goodall, M. Crowther, L. Jones, P. R. Bell, und M. M. Thompson, „Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption“, *Stroke*, Bd. 31, Nr. 1, S. 40–47, Jan. 2000.
- [112] N. Zempo, N. Koyama, R. D. Kenagy, H. J. Lea, und A. W. Clowes, „Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 16, Nr. 1, S. 28–33, Jan. 1996.
- [113] H. Wang, C. Liu, Y. Song, D. Gordon, M. Z. Alavi, und S. Moore, „Expression of metalloproteinases and its inhibitor in later stage of rabbit neointima development“, *Int. J. Mol. Med.*, Bd. 7, Nr. 1, S. 105–112, Jan. 2001.
- [114] C. S. Lim, S. Kiriakidis, A. Sandison, E. M. Paleolog, und A. H. Davies, „Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall“, *J. Vasc. Surg.*, Bd. 58, Nr. 1, S. 219–230, Juli 2013.
- [115] K. Schmid, W. O. McSharry, C. H. Pameijer, und J. P. Binette, „Chemical and physicochemical studies on the mineral deposits of the human atherosclerotic aorta“, *Atherosclerosis*, Bd. 37, Nr. 2, S. 199–210, Okt. 1980.
- [116] K. Boström, K. E. Watson, W. P. Stanford, und L. L. Demer, „Atherosclerotic calcification: relation to developmental osteogenesis“, *Am. J. Cardiol.*, Bd. 75, Nr. 6, S. 88B–91B, Feb. 1995.
- [117] K. E. Watson, K. Boström, R. Ravindranath, T. Lam, B. Norton, und L. L. Demer, „TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 93, Nr. 5, S. 2106–2113, Mai 1994.
- [118] N. M. Rajamannan, M. Subramaniam, D. Rickard, S. R. Stock, J. Donovan, M. Springett, T. Orszulak, D. A. Fullerton, A. J. Tajik, R. O. Bonow, und T. Spelsberg, „Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype“, *Circulation*, Bd. 107, Nr. 17, S. 2181–2184, Mai 2003.
- [119] E. R. Mohler, F. Gannon, C. Reynolds, R. Zimmerman, M. G. Keane, und F. S. Kaplan, „Bone formation and inflammation in cardiac valves“, *Circulation*, Bd. 103, Nr. 11, S. 1522–1528, März 2001.
- [120] A. Shimazu, H. D. Nah, T. Kirsch, E. Koyama, J. L. Leatherman, E. B. Golden, R. A. Kosher, und M. Pacifici, „Syndecan-3 and the control of chondrocyte proliferation during endochondral ossification“, *Exp. Cell Res.*, Bd. 229, Nr. 1, S. 126–136, Nov. 1996.
- [121] Y. Sun, C. H. Byon, K. Yuan, J. Chen, X. Mao, J. M. Heath, A. Javed, K. Zhang, P. G. Anderson, und Y. Chen, „Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification“, *Circ. Res.*, Bd. 111, Nr. 5, S. 543–552, Aug. 2012.
- [122] E. R. O’Brien, M. R. Garvin, D. K. Stewart, T. Hinohara, J. B. Simpson, S. M. Schwartz, und C. M. Giachelli, „Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques“, *Arterioscler. Thromb.*, Bd. 14, Nr. 10, S. 1648–1656, Okt. 1994.
- [123] C. M. Giachelli, N. Bae, M. Almeida, D. T. Denhardt, C. E. Alpers, und S. M. Schwartz, „Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 92, Nr. 4, S. 1686–1696, Okt. 1993.
- [124] C. M. Giachelli, M. Y. Speer, X. Li, R. M. Rajachar, und H. Yang, „Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin“, *Circ. Res.*, Bd. 96, Nr. 7, S. 717–722, Apr. 2005.
- [125] E. R. Mohler, L. P. Adam, P. McClelland, L. Graham, und D. R. Hathaway, „Detection of osteopontin in calcified human aortic valves“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 17, Nr. 3, S. 547–552, März 1997.

- [126] K. D. O'Brien, J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, M. Ferguson, C. Giachelli, C. E. Alpers, und C. M. Otto, „Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions“, *Circulation*, Bd. 92, Nr. 8, S. 2163–2168, Okt. 1995.
- [127] P. Ducy, C. Desbois, B. Boyce, G. Pinero, B. Story, C. Dunstan, E. Smith, J. Bonadio, S. Goldstein, C. Gundberg, A. Bradley, und G. Karsenty, „Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice“, *Nature*, Bd. 382, Nr. 6590, S. 448–452, Aug. 1996.
- [128] C. M. Shanahan, N. R. Cary, J. C. Metcalfe, und P. L. Weissberg, „High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 93, Nr. 6, S. 2393–2402, Juni 1994.
- [129] A. E. Jiménez-Corona, S. Damián-Zamacona, A. Pérez-Torres, A. Moreno, und J. Mas-Oliva, „Osteopontin upregulation in atherogenesis is associated with cellular oxidative stress triggered by the activation of scavenger receptors“, *Arch. Med. Res.*, Bd. 43, Nr. 2, S. 102–111, Feb. 2012.
- [130] Y. Lei, A. Sinha, N. Nosoudi, A. Grover, und N. Vyavahare, „Hydroxyapatite and calcified elastin induce osteoblast-like differentiation in rat aortic smooth muscle cells“, *Exp. Cell Res.*, Bd. 323, Nr. 1, S. 198–208, Apr. 2014.
- [131] G. Nollert, J. Miksch, E. Kreuzer, und B. Reichart, „Risk factors for atherosclerosis and the degeneration of pericardial valves after aortic valve replacement“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 126, Nr. 4, S. 965–968, Okt. 2003.
- [132] R. S. Farivar und L. H. Cohn, „Hypercholesterolemia is a risk factor for bioprosthetic valve calcification and explantation“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 126, Nr. 4, S. 969–975, Okt. 2003.
- [133] M. K. Green, M. D. Walsh, A. Dare, P. G. Hogan, X. M. Zhao, I. H. Frazer, A. S. Bansal, und M. F. O'Brien, „Histologic and immunohistochemical responses after aortic valve allografts in the rat“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 66, Nr. 6 Suppl, S. S216–220, Dez. 1998.
- [134] J. F. Legare, T. D. Lee, K. Creaser, und D. B. Ross, „T lymphocytes mediate leaflet destruction and allograft aortic valve failure in rats“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 70, Nr. 4, S. 1238–1245, Okt. 2000.
- [135] P. Hogan, L. Duplock, M. Green, S. Smith, K. L. Gall, I. H. Frazer, und M. F. O'Brien, „Human aortic valve allografts elicit a donor-specific immune response“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 112, Nr. 5, S. 1260–1266; discussion 1266–1267, Nov. 1996.
- [136] M. J. P. Welters, F. B. S. Oei, M. D. Witvliet, L. M. B. Vaessen, A. H. Cromme-Dijkhuis, A. J. J. C. Bogers, W. Weimar, und F. H. J. Claas, „A broad and strong humoral immune response to donor HLA after implantation of cryopreserved human heart valve allografts“, *Hum. Immunol.*, Bd. 63, Nr. 11, S. 1019–1025, Nov. 2002.
- [137] K. Z. Konakci, B. Bohle, R. Blumer, W. Hoetzenecker, G. Roth, B. Moser, G. Boltz-Nitulescu, M. Gorlitzer, W. Klepetko, E. Wolner, und H. J. Ankersmit, „Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery“, *Eur. J. Clin. Invest.*, Bd. 35, Nr. 1, S. 17–23, Jan. 2005.
- [138] A. Mangold, T. Szerafin, K. Hoetzenecker, S. Hacker, M. Lichtenauer, T. Niederpold, S. Nickl, M. Dworschak, R. Blumer, J. Auer, und H. J. Ankersmit, „Alpha-Gal specific IgG immune response after implantation of bioprostheses“, *Thorac Cardiovasc Surg*, Bd. 57, Nr. 4, S. 191–195, Juni 2009.
- [139] C. S. Park, S.-S. Park, S. Y. Choi, S. H. Yoon, W.-H. Kim, und Y. J. Kim, „Anti alpha-gal immune response following porcine bioprosthesis implantation in children“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 19, Nr. 1, S. 124–130, Jan. 2010.
- [140] M. S. Sacks und F. J. Schoen, „Collagen fiber disruption occurs independent of calcification in clinically explanted bioprosthetic heart valves“, *J. Biomed. Mater. Res.*, Bd. 62, Nr. 3, S. 359–371, Dez. 2002.
- [141] M. Grabenwöger, M. Grimm, E. Eybl, M. Kadletz, M. Havel, P. Köstler, H. Plenck, P. Böck, und E. Wolner, „New aspects of the degeneration of bioprosthetic heart valves after long-term implantation“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 104, Nr. 1, S. 14–21, Juli 1992.

- [142] T. Bottio, G. Thiene, E. Pettenazzo, P. Ius, U. Bortolotti, G. Rizzoli, C. Valfré, D. Casarotto, und M. Valente, „Hancock II bioprosthesis: a glance at the microscope in mid-long-term explants“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 126, Nr. 1, S. 99–105, Juli 2003.
- [143] R. Shetty, P. Pibarot, A. Audet, R. Janvier, F. Dagenais, J. Perron, C. Couture, P. Voisine, J. P. Després, und P. Mathieu, „Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves“, *Eur. J. Clin. Invest.*, Bd. 39, Nr. 6, S. 471–480, Juni 2009.
- [144] F. R. Kapourchali, G. Surendiran, L. Chen, E. Uitz, B. Bahadori, und M. H. Moghadasian, „Animal models of atherosclerosis“, *World J Clin Cases*, Bd. 2, Nr. 5, S. 126–132, Mai 2014.
- [145] S. H. Zhang, R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, und N. Maeda, „Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E“, *Science*, Bd. 258, Nr. 5081, S. 468–471, Okt. 1992.
- [146] A. S. Plump, J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin, und J. L. Breslow, „Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells“, *Cell*, Bd. 71, Nr. 2, S. 343–353, Okt. 1992.
- [147] Y. Nakashima, A. S. Plump, E. W. Raines, J. L. Breslow, und R. Ross, „ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree“, *Arterioscler. Thromb.*, Bd. 14, Nr. 1, S. 133–140, Jan. 1994.
- [148] C. J. Hartley, A. K. Reddy, S. Madala, B. Martin-McNulty, R. Vergona, M. E. Sullivan, M. Halks-Miller, G. E. Taffet, L. H. Michael, M. L. Entman, und Y. X. Wang, „Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Bd. 279, Nr. 5, S. H2326–2334, Nov. 2000.
- [149] R. Coleman, T. Hayek, S. Keidar, und M. Aviram, „A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice“, *Acta Histochem.*, Bd. 108, Nr. 6, S. 415–424, 2006.
- [150] K. Tanaka, M. Sata, D. Fukuda, Y. Suematsu, N. Motomura, S. Takamoto, Y. Hirata, und R. Nagai, „Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 46, Nr. 1, S. 134–141, Juli 2005.
- [151] M. Guerraty und E. R. Mohler Iii, „Models of aortic valve calcification“, *J. Investig. Med.*, Bd. 55, Nr. 6, S. 278–283, Sep. 2007.
- [152] Y.-C. Chen, A. V. Bui, J. Diesch, R. Manasseh, C. Hausding, J. Rivera, I. Haviv, A. Agrotis, N. M. Htun, J. Jowett, C. E. Hagemeyer, R. D. Hannan, A. Bobik, und K. Peter, „A novel mouse model of atherosclerotic plaque instability for drug testing and mechanistic/therapeutic discoveries using gene and microRNA expression profiling“, *Circ. Res.*, Bd. 113, Nr. 3, S. 252–265, Juli 2013.
- [153] J. F. Deniset, P. K. M. Cheung, E. Dibrov, K. Lee, S. Steigerwald, und G. N. Pierce, „Chlamydomonas pneumoniae infection leads to smooth muscle cell proliferation and thickening in the coronary artery without contributions from a host immune response“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 176, Nr. 2, S. 1028–1037, Feb. 2010.
- [154] X. Ren, Q. Wei, H. Shao, Z. Sun, und N. Liu, „A rat model of diabetic artery calcification“, *J. Endocrinol. Invest.*, Bd. 35, Nr. 5, S. 497–503, Mai 2012.
- [155] S. B. Andrus, L. C. Fillios, G. V. Mann, und F. J. Stare, „Experimental production of gross atherosclerosis in the rat“, *J. Exp. Med.*, Bd. 104, Nr. 4, S. 539–554, Okt. 1956.
- [156] Z. Záhor und V. Czabanová, „Experimental atherosclerosis of the heart valves in rats following a long-term atherogenic regimen“, *Atherosclerosis*, Bd. 27, Nr. 1, S. 49–57, Mai 1977.
- [157] G. A. Block, T. E. Hulbert-Shearon, N. W. Levin, und F. K. Port, „Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study“, *Am. J. Kidney Dis.*, Bd. 31, Nr. 4, S. 607–617, Apr. 1998.
- [158] J. P. Linefsky, K. D. O’Brien, R. Katz, I. H. de Boer, E. Barasch, N. S. Jenny, D. S. Siscovick, und B. Kestenbaum, „Association of serum phosphate levels with aortic valve sclerosis and

- annular calcification: the cardiovascular health study“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 58, Nr. 3, S. 291–297, Juli 2011.
- [159] M. Rodriguez, J. M. Martinez-Moreno, M. E. Rodríguez-Ortiz, J. R. Muñoz-Castañeda, und Y. Almaden, „Vitamin D and vascular calcification in chronic kidney disease“, *Kidney Blood Press. Res.*, Bd. 34, Nr. 4, S. 261–268, 2011.
- [160] B. Paigen, B. Y. Ishida, J. Verstuyft, R. B. Winters, und D. Albee, „Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice“, *Arteriosclerosis*, Bd. 10, Nr. 2, S. 316–323, Apr. 1990.
- [161] M. Mehrabian, L. L. Demer, und A. J. Lusis, „Differential accumulation of intimal monocyte-macrophages relative to lipoproteins and lipofuscin corresponds to hemodynamic forces on cardiac valves in mice“, *Arterioscler. Thromb.*, Bd. 11, Nr. 4, S. 947–957, Aug. 1991.
- [162] G. M. Hass, R. E. Trueheart, und A. Hemmens, „Experimental athero-arteriosclerosis due to calcific medial degeneration and hypercholesteremia“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 38, S. 289–323, März 1961.
- [163] G. Hekimian, S. Passefort, L. Louedec, X. Houard, M.-P. Jacob, A. Vahanian, J.-B. Michel, und D. Messika-Zeitoun, „High-cholesterol + vitamin D2 regimen: a questionable in-vivo experimental model of aortic valve stenosis“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 18, Nr. 2, S. 152–158, März 2009.
- [164] M.-C. Drolet, M. Arsenault, und J. Couet, „Experimental aortic valve stenosis in rabbits“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 41, Nr. 7, S. 1211–1217, Apr. 2003.
- [165] M.-C. Drolet, J. Couet, und M. Arsenault, „Development of aortic valve sclerosis or stenosis in rabbits: role of cholesterol and calcium“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 17, Nr. 4, S. 381–387, Juli 2008.
- [166] D. T. M. Ngo, I. Stafford, D. J. Kelly, A. L. Sverdlov, R. D. Wuttke, H. Weedon, A. K. Nightingale, A. C. Rosenkranz, M. D. Smith, Y. Y. Chirkov, J. A. Kennedy, und J. D. Horowitz, „Vitamin D(2) supplementation induces the development of aortic stenosis in rabbits: interactions with endothelial function and thioredoxin-interacting protein“, *Eur. J. Pharmacol.*, Bd. 590, Nr. 1–3, S. 290–296, Aug. 2008.
- [167] E. Vasile und F. Antohe, „An ultrastructural study of beta-very low density lipoprotein uptake and transport by valvular endothelium of hyperlipidemic rabbits“, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, Bd. 23, Nr. 2, S. 279–287, Apr. 1991.
- [168] P. Nievelstein-Post, G. Mottino, A. Fogelman, und J. Frank, „An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit“, *Arterioscler. Thromb.*, Bd. 14, Nr. 7, S. 1151–1161, Juli 1994.
- [169] N. M. Rajamannan, G. Sangiorgi, M. Springett, K. Arnold, T. Mohacsi, L. G. Spagnoli, W. D. Edwards, A. J. Tajik, und R. S. Schwartz, „Experimental hypercholesterolemia induces apoptosis in the aortic valve“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 10, Nr. 3, S. 371–374, Mai 2001.
- [170] M. Cimini, D. R. Boughner, J. A. Ronald, L. Aldington, und K. A. Rogers, „Development of aortic valve sclerosis in a rabbit model of atherosclerosis: an immunohistochemical and histological study“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 14, Nr. 3, S. 365–375, Mai 2005.
- [171] Z. Zeng, P. Nievelstein-Post, Y. Yin, K.-M. Jan, J. S. Frank, und D. S. Rumschitzki, „Macromolecular transport in heart valves. III. Experiment and theory for the size distribution of extracellular liposomes in hyperlipidemic rabbits“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Bd. 292, Nr. 6, S. H2687–2697, Juni 2007.
- [172] P. J. Dolphin, „Serum and hepatic nascent lipoproteins in normal and hypercholesterolemic rats“, *J. Lipid Res.*, Bd. 22, Nr. 6, S. 971–989, Aug. 1981.
- [173] M. Shuvy, S. Abedat, R. Beerli, H. D. Danenberg, D. Planer, I. Z. Ben-Dov, K. Meir, J. Sosna, und C. Lotan, „Uraemic hyperparathyroidism causes a reversible inflammatory process of aortic valve calcification in rats“, *Cardiovasc. Res.*, Bd. 79, Nr. 3, S. 492–499, Aug. 2008.
- [174] J. R. Wu-Wong, W. Noonan, J. Ma, D. Dixon, M. Nakane, A. L. Bolin, K. A. Koch, S. Postl, S. J. Morgan, und G. A. Reinhart, „Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification“, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bd. 318, Nr. 1, S. 90–98, Juli 2006.

- [175] B. Roosens, S. Droogmans, J. Hostens, J. Somja, E. Delvenne, S. Hernot, G. Bala, C. Degallier, V. Caveliers, P. Delvenne, T. Lahoutte, G. Van Camp, und B. Cosyns, „Integrated backscatter for the in vivo quantification of supraphysiological vitamin D(3)-induced cardiovascular calcifications in rats“, *Cardiovasc. Toxicol.*, Bd. 11, Nr. 3, S. 244–252, Sep. 2011.
- [176] F. T. Tang, S. R. Chen, X. Q. Wu, T. Q. Wang, J. W. Chen, J. Li, L. P. Bao, H. Q. Huang, und P. Q. Liu, „Hypercholesterolemia accelerates vascular calcification induced by excessive vitamin D via oxidative stress“, *Calcif. Tissue Int.*, Bd. 79, Nr. 5, S. 326–339, Nov. 2006.
- [177] F. Gremse, C. Grouls, M. Palmowski, T. Lammers, A. de Vries, H. Gröll, M. Das, G. Mühlenbruch, S. Akhtar, A. Schober, und F. Kiessling, „Virtual elastic sphere processing enables reproducible quantification of vessel stenosis at CT and MR angiography“, *Radiology*, Bd. 260, Nr. 3, S. 709–717, Sep. 2011.
- [178] A. Assmann, K. Zwirnmann, F. Heidelberg, F. Schiffer, K. Horstkötter, H. Munakata, F. Gremse, M. Barth, A. Lichtenberg, und P. Akhyari, „The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model“, *Biomaterials*, Bd. 35, Nr. 26, S. 7416–7428, Aug. 2014.
- [179] M. E. DeBakey, G. M. Lawrie, und D. H. Glaeser, „Patterns of atherosclerosis and their surgical significance“, *Ann. Surg.*, Bd. 201, Nr. 2, S. 115–131, Feb. 1985.
- [180] E. Aikawa, M. Nahrendorf, J.-L. Figueiredo, F. K. Swirski, T. Shtatland, R. H. Kohler, F. A. Jaffer, M. Aikawa, und R. Weissleder, „Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo“, *Circulation*, Bd. 116, Nr. 24, S. 2841–2850, Dez. 2007.
- [181] H. M. Kwon, B. K. Lee, D. Kim, B. K. Hong, K. H. Byun, J. S. Kna, I. J. Kim, S. H. Oh, und H. S. Kim, „Experimental hypercholesterolemia induces ultrastructural changes in the elastic laminae of rabbit aortic valve“, *Yonsei Med. J.*, Bd. 39, Nr. 4, S. 345–354, Aug. 1998.

7. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Artur Lichtenberg danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertationsschrift sowie für die Bereitstellung der Experimentalgrundlagen.

Herrn PD Dr. Payam Akhyari danke ich für die aufmerksame und ausgesprochen engagierte Koordination der Versuche, das Vermitteln wissenschaftlicher Arbeitsgrundlagen sowie die fortwährende motivierende Begleitung.

Herrn PD Dr. Alexander Assmann danke ich für die exzellente Betreuung der Arbeit, die Anleitung der Experimente und die andauernde, verlässliche und geduldige Unterstützung bei der Vollendung dieser Arbeit.

Allen wissenschaftlichen Mitarbeitern, einschließlich Forschungsrotanden und *Postdocs* der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie, insbesondere Frau Dr. Mareike Barth und Frau Ph.D. Bhawana Poudel-Bochmann danke ich für die labortechnische Einarbeitung und für die Unterstützung in den Versuchsdurchführungen.

Herrn Dr. Hiroshi Munakata danke ich für die professionelle und zuverlässige Unterstützung bei der Explantation der Versuchsorgane sowie die Durchführung der Echokardiographie. ありがとうございます.

Frau Gisela Müller und Frau Franziska Schiffer danke ich für die Etablierungsarbeit und die Hilfe bei der Durchführung der PCR.

Herrn Dipl.-Inf. Felix Gremse vom Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung des Universitätsklinikums Aachen danke ich für die Bereitstellung der apparativen Technik und die Unterstützung bei der Durchführung des μ CT.

Frau Dr. Carmen Barthuber vom Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik danke ich für die Durchführung der Serumanalysen.

Frau Katrin Ziel danke ich für die Hilfestellung bei der Erstellung der Skizzen zur Veranschaulichung der histologischen Schnittführung und der Auswertung der Von-Kossa-Färbung.

Allen Mitdoktoranden der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie, insbesondere Herrn Christofer Delfs und Frau Kim Horstkötter möchte ich für die gute, produktive und unterhaltsame Zusammenarbeit im Labor danken.

Meinen Eltern verdanke ich mehr, als ich in diesem Rahmen auszudrücken vermag. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit möchte ich ihnen insbesondere für die anhaltende, unnachgiebige und bedingungslose Unterstützung in allen Belangen danken.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

01.02.2017, Kai Zwirnmann