

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

Komparative Evaluation der Statinwirkung auf dezellularisierte Aorten-Konduits im prokalzifizierenden Ratten-Härtemodell

Dissertation

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

Vorgelegt von

Kim Alexandra Horstkötter

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Alexander Assmann

Zweitgutachter: PD Dr. med. Florian Simon

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Simvastatin does not diminish the in vivo degeneration of decellularized aortic conduits.

Assmann A, Horstkötter K, Munakata H, Schiffer F, Delfs C, Zwirnmann K, Barth M, Akhyari P, Lichtenberg A.

J Cardiovasc Pharmacol. 2014 Oct;64(4):332-42. doi: 10.1097/FJC.000000000000123.

PMID: 24887683

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in Industrienationen bei beiden Geschlechtern die mit Abstand häufigste Todesursache dar, wobei häufig Veränderungen an den Herzklappen auftreten, die zu Insuffizienzen oder Stenosen führen. In fortgeschrittenen Stadien entsteht bei vielen valvulären Pathologien eine Indikation zum Klappenersatz, wofür aktuell mechanische und biologische Ersatzklappen zur Verfügung stehen. Beide Arten des prothetischen Klappenersatzes haben ihre Vor- bzw. Nachteile; daher kann keine von ihnen als der ideale Klappenersatz angesehen werden. Eine neue Art des Klappenersatzes stellt eine dezellularisierte Klappe eines Spender-Lebewesens dar, wobei eine Rezellularisierung nach Implantation durch körpereigene Zellen erfolgt.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen einer Simvastatin-Gabe auf dezellularisierte und anschließend heterotop reimplantierte Aortenkonduits. In diesem Tierversuchsmodell wurden Wistar-Ratten verwendet, die begleitend eine prokalzifizierende Diät erhielten. Die postoperative Analyse der explantierten Konduits erfolgte nach 4 und nach 12 Wochen primär mittels histologischer, laborchemischer und PCR-analytischer Auswertung. Schwerpunkte lagen dabei auf der Beobachtung der Reendothelialisierung, der Inflammation und der kalzifizierenden Degeneration unter Medikation.

In dieser Arbeit konnte unter Simvastatintherapie eine signifikante Erniedrigung der IL-6-Expression nachgewiesen werden, bei anderen Entzündungsmarkern fand sich jedoch keine signifikante Reduktion. Die reine Dezellularisierung der Konduits scheint bereits zu einer solchen Minimierung der Inflammationsprozesse zu führen, dass die tatsächliche anti-entzündliche Wirkung des Simvastatins in diesem Modell keine Rolle spielt. Simvastatin konnte in dieser Arbeit weder die Geschwindigkeit der Rezellularisierung der Konduits beeinflussen noch die überschießende Bildung einer hyperplastischen Neointima signifikant reduzieren. Auch zeigte die Simvastatin-Therapie keine relevante Verbesserung der - durch die prokalzifizierende Spezialdiät induzierte - Degeneration der kardiovaskulären Implantate. Diese Ergebnisse werden auch in aktuellen klinischen Studien widerspiegelt, die für zelluläre Bioprothesen belegen, dass durch eine Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern die progrediente, kalzifizierende Degeneration von Klappenprothesen nicht verlangsamt wird.

Die Entwicklung einer nicht-degenerierenden Bioprothese steht weiterhin im Fokus vieler Studien. Insbesondere lokale Maßnahmen, beispielsweise verschiedene lumenale Beschichtungen, scheinen zu einer Beschleunigung der Reendothelialisierung und zur gleichzeitigen Reduktion der Degeneration und neointimalen Hyperplasie zu führen und eine potenzielle Lösung darzustellen.

Abstract

In developed countries, cardiovascular disease is the most common cause of death among both sexes. Heart valve pathologies lead to stenoses or insufficiencies, advanced stages of which frequently require surgical or interventional treatment using either biological or mechanical valve prostheses. Both types of prostheses do have their limitations, which makes none of them an ideal solution. Decellularized valves of donor animals may represent an alternative approach exhibiting high biocompatibility and allowing for host cell population. Nevertheless, these valves also undergo slowly progressing degeneration.

The objective of this work was the examination of the impact of simvastatin treatment on inflammation, degeneration and reendothelialization of decellularized aortic conduits *in vivo*. For this purpose, we used a heterotopic rat implantation model of accelerated cardiovascular calcification caused by procalcific diet. Postoperative analysis was conducted after 4 and 12 weeks using histology, quantitative real-time PCR and calcium quantification assays.

After 12 weeks, we observed a significant reduction of the interleukin-6 expression ($p < 0.05$), while other markers of inflammation were not significantly reduced. Using decellularization of conduits as a first step may lower the inflammatory processes to a minimum thereby masking potentially anti-inflammatory effects of simvastatin. Furthermore, simvastatin did neither affect the speed of conduit reendothelialization nor decelerate the process of hyperplastic neointima formation. At last, simvastatin had no effect on the calcifying degeneration of cardiovascular implants caused by procalcific diet.

These findings are in line with recent clinical studies which presume no effect of simvastatin administration on the degeneration of biological valvular prostheses. Current and future studies focus on local treatment and modification of biological grafts to further improve their biocompatibility, and thus inhibit their degeneration and failure.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	mg	Milligramm
ALP	Alkaline Phosphatase	MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
AS	Aortenklappenstenose	min	Minute(n)
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>	ml	Milliliter
BGW	Bindegewebe	µl	Mikroliter
°C	Grad Celcius	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
CD	<i>clusters of differentiation</i>	mmol	Millimol
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure	MMP	Matrix-Metalloprotease
CRP	C-reaktives Protein	m/s	Meter pro Sekunde
DANN	Desoxyribonukleinsäure	n	<i>number</i>
DZ	Kontrollgruppe	Nm	Nanometer
EDS	Endsystolisches Volumen	NRW	Nordrhein-Westfalen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	n.s.	Nicht signifikant
EDV	Enddiastolisches Volumen	NYHA	New York Heart Association
EF	Ejektionsfraktion	OCN	Osteopontin
EKG	Elektrokardiographie	OP	Operation
et al.	et alii (und andere)	OPG	Osteoprotegerin
g	Gramm	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
G	Gauge	PCR	Polymerase- Kettenreaktion
HDL	<i>high-density-lipoprotein</i>	PERV	<i>porcine endogenous retro-virus</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin	RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl- Coenzym-A	RNA	Ribonukleinsäure
ICR	Intercostalraum	Rpm	Umdrehungen pro Minute
IE	Internationale Einheiten	RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>

IL	Interleukin	S	Statingruppe
IU	<i>international unit</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
Kg	Kilogramm	SMA	<i>smooth muscle actin</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit	TE	Tissue Engineering
KÖF	Klappenöffnungsfläche	TNF	Tumornekrosefaktor
l	Liter	VIC	Valvuläre interstitielle Zellen
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz	vgl.	vergleiche
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>	Vmax	Maximale Geschwindigkeit
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser	vWF	von-Willebrand-Faktor

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	1
1.2 Erworbene Vitien	2
1.2.1 Aortenklappenstenose	3
1.3 Der prothetische Klappenersatz	4
1.4 Anforderungen an künstliche Herzklappen	6
1.5 Tissue Engineering.....	6
1.5.1 Dezellularisierung	7
1.5.2 Bisherige Veröffentlichungen zu diesem Thema	9
1.6 Simvastatin und Cholesterin	10
1.7 Modelletablierung	12
1.8 Fragestellung der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Material	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Antikörper	17
2.1.2.1 Primärantikörper	17
2.1.2.2 Sekundärantikörper	17
2.1.3 Primer	18
2.1.4 Gebrauchslösungen	19
2.1.5 Geräte und Gebrauchswaren	20
2.1.6 Versuchstiere	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Studiendesign	23
2.2.2 Operationen	23

2.2.2.1 Entnahme des nativen Konduits	23
2.2.3 Dezellularisierung	24
2.2.4 Generierung einer Aortenklappen-Insuffizienz	24
2.2.5 Echokardiografie	25
2.2.6 Implantation des dezellularisierten Konduits	25
2.2.7 Abschließende Explantation der Konduits	26
2.2.8 Vorbereitung für Histologie.....	26
2.2.9 Vorbereitung für PCR.....	27
2.2.10 Vorbereitung für Calcium-Kit	27
2.2.11 Histologie.....	27
2.2.11.1 Schneideprotokoll.....	27
2.2.11.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
2.2.11.3 Bestimmung des Intima-Media-Index.....	28
2.2.11.4 Movat-Pentachrom-Färbung.....	28
2.2.11.5 Von-Kossa-Färbung	29
2.2.11.6 Entwicklung eines Verkalkungs-Scores	30
2.2.11.7 In-situ-Enzymographie.....	31
2.2.11.8 Quantifizierung der MMP-Aktivität	32
2.2.11.9 Immunhistologie	32
2.2.12 Quantitative Real-Time-PCR.....	33
2.2.12.1 RNA-Isolation	33
2.2.12.2 Reverse Transkription	34
2.2.12.3 Real-Time-PCR.....	34
2.2.12.4 Relative Quantifizierung.....	35
2.2.13 Calcium-Assay.....	35
2.2.14 Blutserum-Analysen.....	36
2.2.15 Statistik	36
3 ERGEBNISSE	37
3.1 Erfolg der Dezellularisierung.....	37

3.2 Erfolg der Statingabe.....	37
3.3 Strukturelle Veränderung der Konduits.....	38
3.3.1 Nach 4 Wochen.....	38
3.3.2 Nach 12 Wochen.....	39
3.3.3 Quantifizierung der Intimahyperplasie.....	40
3.3.4 Immunhistologische Qualifizierung.....	42
3.3.5 Qualifizierung mittels Real-Time-PCR.....	44
3.3.6 Qualifizierung mittels in-situ-Enzymographie.....	47
3.4 Verkalkung der Konduits.....	49
3.4.1 Von-Kossa-Färbung.....	49
3.4.2 Verkalkungs-Score.....	51
3.4.3 Calcium-Assay.....	53
3.4.4 Auswertung der Blutwerte.....	54
3.4.5 Auswertung der Real-Time-PCR.....	55
4 DISKUSSION.....	57
4.1 Rezellularisierung.....	57
4.2 Inflammation.....	59
4.3 Kalzifizierende Degeneration der Konduits.....	60
4.4 Einordnung in klinischen Zusammenhang.....	63
4.5 Limitationen dieser Arbeit.....	66
Literaturverzeichnis.....	67
Danksagung.....	76

1 EINLEITUNG

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Als kardiovaskuläre Erkrankungen werden alle Erkrankungen zusammengefasst, die das Herz und/oder das Gefäßsystem betreffen bzw. von diesem ausgehen.

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellten im Jahr 2014 bei beiden Geschlechtern die mit Abstand häufigste Todesursache dar (Quelle: Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2015). Unterteilt man dabei die Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen weiter, sind die chronische ischämische Herzkrankheit (20,7%), der akute Myokardinfarkt (14,3%) und die Herzinsuffizienz (13,2%) die führenden Ursachen.

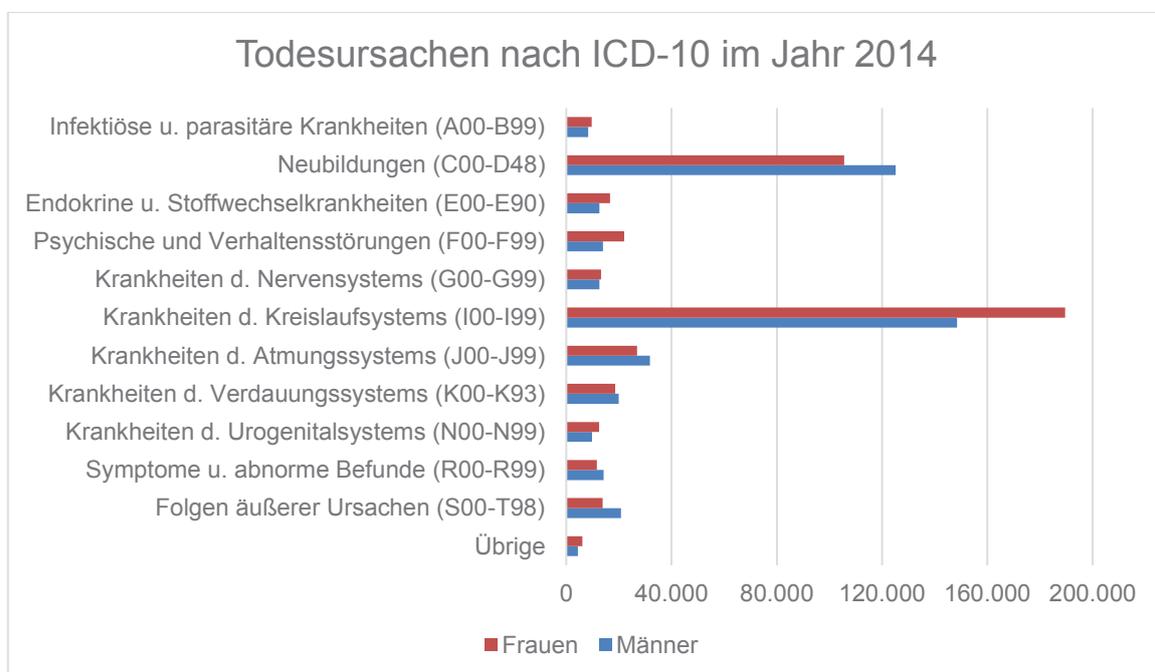


Abb. 1: Todesursachen nach ICD-10 (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2015)

Weitaus geringer war der Anteil der Todesfälle durch bösartigen Neubildungen oder Infektionen. Bereits diese Verteilung zeigt, welch großen Stellenwert die Herz-Kreislauf-Erkrankungen in unserer heutigen Gesellschaft einnehmen.

Eine wichtige Ursache für Entstehung kardiovaskuläre Erkrankungen stellt die Atherosklerose dar. Die Atherosklerose wird umgangssprachlich oft auch Arterienverkalkung oder Arterienverhärtung genannt und setzt sich aus den altgriechischen Wörtern *artería* (Arterie) und *sklerós* (hart) zusammen. Es handelt sich hierbei um eine Systemerkrankung, die die Arterien betrifft und mit einer fortschreitenden Verhärtung der Gefäßwand einhergeht. Dies führt nicht nur zu einer verminderten Elastizität, sondern auch zu einer zunehmenden

Verlegung des Gefäßlumens.

Die Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose sind vielfältig.

Ursächlich sind aber vor allen Dingen Faktoren, die in unserer modernen Zivilisation begründet liegen, wie zum Beispiel Übergewicht, erhöhte Blutfettwerte und Bluthochdruck, aber auch der Konsum von Alkohol und Nikotin können das Risiko für die Entstehung einer Atherosklerose erhöhen. Chronische Erkrankungen der Nieren oder der Schilddrüse, Diabetes, Gicht und auch das Vorliegen einer rheumatoiden Arthritis können die Entstehung ebenfalls begünstigen. Neben diesen beeinflussbaren Risikofaktoren, gibt es noch einige Parameter, die zwar mit einem erhöhten Risiko behaftet sind, aber nicht verändert werden können. Dazu gehören das Alter, das männliche Geschlecht und eine genetische Veranlagung.

Die Pathogenese der Atherosklerose ist noch nicht abschließend geklärt. Aktuell finden sich aber vor allem zwei Hypothesen, die versuchen die Entstehung zu erklären.

Nach der Response-to-injury-Hypothese von Ross (Ross, Glomset, and Harker 1977) kann es bei einer vorgeschädigten Intima zu einer Einwanderung von LDL-Cholesterin kommen. Als Ursachen der Endothelschädigung gibt Ross beispielsweise Traumen, mechanische Verletzungen, Bluthochdruck oder Schädigungen durch bakterielle Toxine, Viren oder Antigen-Antikörper-Komplexe an. Im Rahmen von oxidativem Stress kommt es dann zu einer Oxidation des LDLs und zur anschließenden Phagozytose durch Makrophagen. Die Überladung der Makrophagen führt letztendlich zu deren Nekrose unter Bildung von sogenannten Schaumzellen. Durch die Nekrose kommt es zu einer Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes, was die Bildung von atherosklerotischen Plaques noch verstärkt. Insgesamt liegt ein *circulos vitiosus* vor, da die Plaques die Strömungsverhältnisse und die endotheliale Dysfunktion noch weiter verschlechtern.

Bei der Lipoprotein-induced-atherosclerosis-Hypothese von Goldstein kommt es durch Aufnahme des chemisch modifizierten LDLs durch die Makrophagen und deren Untergang zur Bildung von Schaumzellen. Hierbei wird nicht die Endothelverletzung, sondern hauptsächlich das durch Oxidation veränderte LDL als Ursache der Plaqueentstehung angesehen (Brown et al. 1980).

1.2 Erworbene Vitien

Prinzipiell kann sich eine Herzklappenerkrankung als Insuffizienz, also als eine Schlussunfähigkeit, oder als Verengung, auch Stenose genannt, manifestieren. Aber auch kombinierte Vitien sind möglich.

Als Ursache für Klappenstenosen sind an erster Stelle degenerative Prozesse anzusehen, aber auch postentzündliche Verwachsungen können zu einer Stenosierung führen.

Anhand der verbliebenen Klappenöffnungsfläche und dem Gradienten über der Klappe kann eine Stenose in leicht-, mittel- oder hochgradig unterteilt werden.

Auch Klappeninsuffizienzen entstehen am ehesten degenerativ oder postentzündlich. Der Schweregrad wird hier anhand des Refluxes über der Klappe eingeteilt.

Nach der *New York Heart Association* (NYHA) lassen sich die Vitien in 4 Stadien unterteilen. Die Einteilung erfolgt anhand der subjektiven Beschwerden des Patienten.

Stadium I	Keine Beschwerden
Stadium II	Beschwerden bei stärkerer körperlicher Belastung
Stadium III	Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung
Stadium IV	Beschwerden in Ruhe

Tabelle 1: NYHA-Stadieneinteilung

1.2.1 Aortenklappenstenose

Die Aortenklappenstenose stellt bei Patienten über 65 Jahren den häufigsten Klappenfehler dar. Die häufigste Ursache ist die kalzifizierende Aortenklappenstenose. Hierbei handelt es sich um einen degenerativen Prozess, der hauptsächlich bei älteren Patienten zu finden ist. Bei jüngeren Patienten liegt meist eine angeborene oder rheumatische Aortenklappenstenose vor.

Bei der Aortenklappenstenose ist die Klappenöffnungsfläche vermindert und führt so zu einer Behinderung des Blutstroms durch die Klappe. Hämodynamische Auswirkungen finden sich jedoch erst bei einer Verkleinerung der Öffnungsfläche um etwa die Hälfte. Bei einer geringgradigen Aortenklappenstenose bleiben Patienten oft über Jahre beschwerdefrei.

Patienten mit höhergradigen Stenosen fallen meist durch eingeschränkte Belastbarkeit, Atemnot oder pektanginöse Beschwerden auf.

	KÖF (cm²)	KÖF/BSA	Mittlere Δp (mmHg)	Vmax (m/s)
Leichtgradige AS	> 1,5	> 1,0	< 25	< 3,0
Mittelgradige AS	1,0 - 1,5	0,6 – 1,0	25 - 50	3,0 – 4,0
Schwere AS	< 1,0	< 0,6	> 50	> 4,0

Tabelle 2: Einteilung des Schweregrades der Aortenklappenstenose (AS);

KÖF: Klappenöffnungsfläche in cm², KÖF/BSA: Klappenöffnungsfläche zu Körperoberfläche, mittlere Δp: mittlerer Druckgradient in mmHg, Vmax: maximale transvalvuläre Flussgeschwindigkeit in m/s

Durch die Verengung der Klappenöffnungsfläche kommt es zu einer Druckbelastung des linken Ventrikels. Anfangs kann durch vermehrte Herzarbeit mit Generierung eines höheren systolischen Ventrikeldruckes das Herz-Zeit-Volumen noch aufrechterhalten werden, doch früher oder später kommt es primär zu einer Störung der diastolischen Ventrikelfunktion, was

wiederum über einen Blutrückstau in die Lunge zu Leistungsminderung und Dyspnoe führt. Die durch die Druckbelastung entstehende konzentrische Linksherzhypertrophie führt zudem zu einem erhöhten myokardialen Sauerstoffbedarf, der pektanginöse Beschwerden auslösen kann, wenn er über den Blutfluss nicht mehr zu decken ist. Aber das reduzierte Herz-Zeit-Volumen kann auch zerebrale Minderperfusionsen auslösen, welche dann bei körperlicher Belastung zu Symptomen wie Schwindel und Kopfschmerzen führen können.

Zur Diagnose einer Aortenklappenstenose tragen sowohl die anamnestisch erhobenen Befunde, als auch die körperliche und apparative Untersuchung bei. Der größte diagnostische Stellenwert kommt jedoch der Echokardiographie zu. Bereits auskultatorisch kann sich eine Aortenklappenstenose als raues, spindelförmiges Systolikum mit punctum maximum im 2. ICR rechts parasternal zeigen. Bei höhergradigen Stenosen finden sich auch oft EKG-Veränderungen wie beispielsweise ein Linkslagetyp oder Linksherzhypertrophiezeichen wie etwa ein positiver Sokolow-Lyon-Index. Über eine transthorakale oder transösophageale Echokardiographie lässt sich die Stenose sicher diagnostizieren und genauer quantifizieren. Der Druckgradient über der Klappe und die Klappenöffnungsfläche lassen sich berechnen. Ebenso lassen sich Größe und Funktion der Vorhöfe und Ventrikel in dieser Untersuchung beurteilen.

Unbehandelt können Aortenklappenstenosen zu Herzrhythmusstörungen, Linksherzinsuffizienz und plötzlichem Herztod führen. Insbesondere symptomatische Patienten zeigen eine schlechte Prognose mit einer 1-Jahres-Überlebensrate von ca. 50% (Carabello 2011). Daher ist eine effiziente Therapie unabdingbar. Als Therapieoptionen existieren momentan die Ballondilatation, der prothetische Klappenersatz sowie eine medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz.

Im Folgenden soll der Fokus auf den Ersatz mittels Klappenprothesen gelegt werden.

1.3 Der prothetische Klappenersatz

Eine symptomatische Klappenerkrankung mit progredientem Beschwerdebild stellt eine Indikation zum Klappenersatz dar. Aktuell lassen sich die Klappenprothesen in hauptsächlich zwei große Gruppen unterteilen: den mechanischen und den biologischen Klappenersatz.



Abb. 2: Mechanische Doppelflügel-Klappe
(mit freundlicher Genehmigung von *St. Jude Medical* o. J.)



Abb. 3: Biologische Herzklappenprothese
(mit freundlicher Genehmigung von *St. Jude Medical* o. J.)

Mechanische Herzklappen kommen in den unterschiedlichsten Formen vor. Zu den häufigsten gehört die Doppelflügelklappe (siehe Abb. 2), aber auch Kippscheibenventil- und Kugelventilprothesen existieren. Alle mechanischen Prothesen verursachen ein mehr oder weniger stark auskultatorisch hörbares Klick-Geräusch („Prothesen-Klick“), welches beim Schluss der Klappe durch das Aufeinanderprallen der Metallelemente entsteht (Golczyk et al. 2010). Mechanische Klappen sind lange haltbar, was sie besonders für junge Patienten attraktiv macht. Durch ein hohes Thromboembolierisiko ist eine lebenslange orale Antikoagulation erforderlich, welche ihrerseits wiederum die Gefahr für Blutungskomplikationen erhöht. Das jährliche Risiko einen embolischen oder hämorrhagischen Zwischenfall zu erleiden liegt unter mechanischen Klappenprothesen bei 2-4% (Chikwe, Filsoufi, and Carpentier 2010). Ebenso wurde unter mechanischen Klappen über eine erhöhte Anfälligkeit für Endokard-Infektionen berichtet (El-Ahdab et al. 2005).

Biologische Klappenprothesen (siehe Abb. 3) stammen entweder aus tierischem Gewebe, meist Schweine- oder Rinderklappen, oder von menschlichen Spendern.

Insgesamt können vier Arten von Implantaten unterschieden werden:

- Xenografts, die von anderen Lebewesen stammen (beispielsweise biologische Klappenprothesen von Schweinen oder Rindern)
- Allografts oder Homografts, die von der gleichen Spezies stammen (Klappenprothesen von Leichenspendern oder von Herztransplantationen)
- Autografts, die vom Patienten selbst stammen (beispielsweise bei der Ross-Operation, bei welcher die autologe Pulmonal-Klappe als Aortenklappen-Ersatz verwendet wird (J. W. Brown et al. 2006))
- Isografts, die von genetisch identischen Individuen stammen (eineiige Zwillinge)

Biologische Xeno-Klappen müssen vor Implantation zur Reduktion von Immunreaktionen behandelt werden, wobei u.a. Aldehyde zum Einsatz kommen. Das Klappengewebe wird anschließend auf ein Gerüst aufgebracht, kann aber auch gerüstfrei implantiert werden. Im Gegensatz zu den mechanischen Prothesen ist die Thrombogenität bei den biologischen

Klappen gering. Eine orale Antikoagulation wird lediglich in den ersten 3 Monaten postoperativ empfohlen, wobei die Meinungen in der Literatur hierzu differieren, sodass einige herzchirurgische Zentren gänzlich auf effektive orale Antikoagulation verzichten. Biologische Prothesen bieten zwar eine höhere Biokompatibilität, neigen jedoch auch zu Degeneration und Verkalkungen und haben daher eine geringere Haltbarkeitsdauer (Vesely 2005). Meist ist bei jungen Menschen nach 5-10 Jahren eine Reoperation nötig, während ältere Menschen aufgrund eines schwächeren Immunsystems häufig eine längere Kompetenzdauer biologischer Klappenimplantate aufweisen. Diese Eigenschaften machen biologische Herzklappen insbesondere für ältere Patienten oder für Patienten mit Kontraindikationen für eine Antikoagulationstherapie zur ersten Wahl für den Herzklappenersatz.

1.4 Anforderungen an künstliche Herzklappen

Da beide Arten des prothetischen Klappenersatzes ihre Vorteile bzw. Nachteile haben, kann keine von ihnen als der ideale Klappenersatz angesehen werden.

Die „perfekte Herzklappe“ sollte möglichst unbegrenzt verfügbar, lange haltbar, gut gewebeverträglich und kostengünstig sein. Zudem sollte sie einfach und möglichst risikoarm implantiert werden können. Die künstliche Klappe sollte den Blutfluss nicht behindern, den Klappenring vollständig abdichten und keine Regurgitation zulassen. Ebenso sollte das Infektions- und das Thromboembolierisiko möglichst gering sein, sodass eine orale Antikoagulation nur kurzfristig verabreicht werden muss oder sogar ganz darauf verzichtet werden kann. Die ideale Klappe sollte zudem auf Veränderungen der Gegebenheiten eingehen können, wie zum Beispiel ein Mitwachsen der Klappe bei Kindern.

Allerdings steht bisher keine Herzklappenprothese zur Verfügung, welche all diese Eigenschaften in sich vereinen kann und in Funktion und Haltbarkeit mit natürlichen Klappen zu vergleichen ist. Diese Lücke versuchen wir aktuell mittels *Tissue Engineering* zu schließen.

1.5 Tissue Engineering

Der Begriff *Tissue Engineering* (TE) stammt aus dem Englischen und bedeutet wörtlich so viel wie Gewebekonstruktion und bildet eine Schnittstelle zwischen der Medizin und dem Ingenieurwesen. Unter TE versteht man zumeist die Herstellung eines implantierbaren Gewebes, das im Empfängerorganismus entweder als Ersatz für ein defektes Gewebe oder zur Regeneration dessen dienen kann. Als Grundlage für die herzustellenden Gewebe dienen Gerüste, die mit Zellen besiedelt werden. Solche Gerüste können entweder aus (abbaubaren) Polymeren, die nach und nach durch ein neuentstehendes physiologisches

Gewebe ersetzt werden (Hoerstrup et al. 2000), aus extrazellulären Proteinen, wie zum Beispiel Kollagen oder Fibrin (Weber et al. 2015), oder aus dezellularisierten, primär nativen Geweben bestehen (Boccafoschi et al. 2015). Die zelluläre Besiedlung der Gerüste kann *in vivo*, also direkt im Empfängerorganismus (Akhyari et al. 2010), oder *in vitro* unter Laborbedingungen, wörtlich im "Reagenzglas", erfolgen (Schenke-Layland et al. 2003). Im Falle der *in-vitro*-Besiedlung ist zu bedenken, dass nur autologe oder autologisierte Zellen im späteren Empfänger keine Immunantwort provozieren.

Für die Versuche dieser Arbeit wurden ausschließlich dezellularisierte Homografts verwendet.

1.5.1 Dezellularisierung

Unter Dezellularisierung versteht man die Entfernung aller zellulären Bestandteile eines Präparates, unter Entstehung einer bindegewebigen, zellfreien Matrix. Ziel ist eine schonende Dezellularisierung, die möglichst viele Zellen entfernt, dabei aber die strukturelle Stabilität der Matrix nicht beeinträchtigt. Vorteile dieses Verfahrens sind die reduzierte immunologische Reaktion des Empfängers infolge fehlender zellulärer Antigene auf den Gerüsten, die potenzielle Neubesiedlung des zellfreien Matrixgerüsts durch körpereigene Zellen bis zur Entstehung eines neuen funktionellen Gewebes, sowie das potenzielle Mitwachsen des Implantats.

Zur Dezellularisierung stehen chemische, biologische und physikalische Verfahren zur Verfügung. Die Wahl der richtigen Dezellularisierungsmethode ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig: unter anderem müssen die Zelldichte, die Gewebsdicke und der Lipidanteil berücksichtigt und die Methode dahingehend individuell angepasst werden.

Zu den chemischen Möglichkeiten gehören Säuren und Basen, Detergenzien, hyper- und hypotone Lösungen, sowie verschiedene Alkohole. Säuren, wie beispielsweise die zur Desinfektion eingesetzte Peroxyessigsäure, sind in der Lage Nukleinsäurereste zu entfernen, ohne die extrazelluläre Matrixstruktur stark zu beschädigen (Hodde et al. 2007). Hyper- und hypotone Lösung können direkt über osmotische Effekte zu einer Zellyse führen (C. C. Xu, Chan, and Tirunagari 2007). Bei der detergenzien-basierten Dezellularisierung werden bevorzugt Triton X-100 und SDS eingesetzt. Beide Mittel sind in der Lage, Zellreste auch aus dichteren Geweben herauszulösen (M. T. Kasimir et al. 2003). Alkohole und Acetone eignen sich gut, um Lipide aus dem Gewebe zu lösen.

Biologische Methoden lassen sich in enzymatische und nicht-enzymatische Verfahren weiter unterteilen. Zur enzymatischen Dezellularisierung werden meist Trypsin und Nucleasen verwendet, aber je nach Zellart können auch Kollagenasen und Lipasen zum Einsatz kommen. Trypsin kann theoretisch auch als eigenständiges Dezellularisationsmittel

eingesetzt werden, aber da die Dezellularisierung nur langsam erfolgt und die Matrixschädigung derweil immer weiter zunimmt, wird es meistens in kombinierten Protokollen direkt zu Beginn eingesetzt, um die Eindringtiefe nachfolgender Detergenzien zu verbessern. Auch Desoxyribonukleasen (DNasen) und Ribonukleasen (RNasen) können den Dezellularisierungsvorgang ergänzen, indem sie Nukleinsäure-Reste weiter abbauen (Yang et al. 2010). Zur Dezellularisierung xenogenen Gewebes können zusätzlich auch α -Galaktosidasen zum Einsatz kommen, da sie in der Lage sind, die immunologisch bedeutsamen Zelloberflächen-Antigene (α -Gal-Epitope) zu eliminieren (Park et al. 2014). Bei der nicht-enzymatischen Dezellularisierung können beispielsweise Chelat-Bildner wie EDTA zum Einsatz kommen, wobei jedoch die alleinige Verwendung von EDTA nicht ausreichend zu sein scheint, um das Gewebe von allen Zellen zu befreien und daher häufig in Kombination mit Enzymen oder Detergenzien verwendet wird (Wainwright et al. 2010). Ebenso scheint EDTA auch die Struktur der extrazellulären Matrix negativ zu beeinflussen (Hopkinson et al. 2008).

Physikalisch können beispielsweise Temperatur und Druck zum Einsatz kommen, um eine Dezellularisierung des Gewebes zu erreichen. So kann ein hoher hydrostatischer Druck verwendet werden, um die Zellen eines Gewebes zu zerstören. Die verbliebenen Reste müssen dann lediglich noch aus dem Gewebe gewaschen werden (Hashimoto et al. 2010). Auch durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen kann es zu einer Lyse der Zellen kommen, jedoch müssen auch hier die verbliebenen Zellreste in nachfolgenden Schritten entfernt werden. Ein weiterer Vorteil der Kryopreservation liegt in der reduzierten Immunantwort und geringerer Leukozyteninfiltration (Lehr et al. 2011).

Meyer et al. haben in ihrer Arbeit detergenzien-basierte, enzymatische und osmotische Dezellularisationsmethoden an Rattenkonduits *in vivo* und *in vitro* verglichen. Das verwendete detergenzien-basierte Protokoll beinhaltete verschiedene Schritte mit Triton X-100, hyper- und hypotonem Tris-Puffer, Waschgänge mit RNase, DNase, sowie PBS und Penicillin-Streptomycin-Lösung. Das osmotische Verfahren war ähnlich aufgebaut, jedoch ohne die Zugabe von Triton X-100. Die enzymatische Dezellularisation erfolgte mittels Trypsin und PBS.

Das detergenzien-basierte Protokoll führte zu einer nahezu vollständigen Zellentfernung und einer reduzierten Immunogenität (Reduktion von MHC-Antigenen und T-Zell-Infiltrationen). Die extrazelluläre Matrix wurde dabei kaum beschädigt.

Bei fehlender Zugabe von Triton X-100 wurden oberflächliche Zellen ebenso gut entfernt, jedoch waren in tieferen Schichten noch Zellreste vorhanden. Es kam zwar zu einer Reduktion der MHC-Antigene, jedoch andererseits zu einem nicht-signifikanten Anstieg der T-Zell-Infiltration.

Die Trypsin-Behandlung führte zu einer fast vollständigen Dezellularisation mit einer massiven Schädigung der Matrixstruktur (Meyer et al. 2006).

Abgeleitet von diesen Ergebnissen scheint ein detergenzien-basiertes Dezellularisierungs-Protokoll die Ansprüche an Zellentfernung, Matrixerhalt und Immunreduktion am besten zu erfüllen. In dieser Arbeit fand jedoch SDS anstelle von Triton X-100 Verwendung.

In Abhängigkeit der Methoden kommt es zu einer unterschiedlich starken Schädigung der Proteinstruktur der Matrix (M. T. Kasimir et al. 2003), die die chirurgische Implantation erschweren und den hämodynamischen Anforderungen im Organismus nicht standhalten kann.

Auch kann durch die Dezellularisierung möglicherweise nicht jede Immunreaktion verhindert werden, was vor insbesondere bei xenogenen Spenderprothesen ein Problem darstellen kann, beispielsweise durch das Vorkommen spezifischer α -Gal-Epitope. Ein weiteres Problem von Xenografts stellt die Übertragung von Krankheiten dar, zum Beispiel durch das PERV (*porcine endogenous retro-virus*) von Schweinen auf den Menschen (Prabha and Verghese 2008). Ebenso ist zu bedenken, dass trotz der Ähnlichkeit auch anatomische Unterschiede in der Klappenarchitektur zwischen menschlicher und tierischer Herzklappe vorliegen.

Daher spricht vieles für die Verwendung dezellularisierter Allografts, die mit ihrer besseren Immunhistokompatibilität und ausbleibenden Antigenreaktionen, passenderen Klappenarchitektur sowie der fehlenden Übertragung von xenogenen Krankheiten, als idealer Klappenersatz überzeugen können. Problematisch stellt sich die begrenzte Verfügbarkeit dar, die aktuell noch den breiten Einsatz im Bereich des *Tissue Engineering* verhindert.

1.5.2 Bisherige Veröffentlichungen zu diesem Thema

Positive Ergebnisse bei reimplantierten dezellularisierten Homografts konnten im Großtiermodell bereits erreicht werden (Baraki et al. 2009). Hier wurden ovine Aortenkonduits detergenzien-basiert dezellularisiert und anschließend allogenen reimplantiert (n=12). Als Kontrollgruppe dienten native allogene Konduits (n=6). Nach 3 und 9 Monaten wurden die Konduits explantiert und histologisch untersucht: es zeigten sich keinerlei inflammatorische Prozesse und lediglich zwei der Konduits zeigten eine minimale Degeneration. Funktionell konnte keine Regurgitation oder Insuffizienz nachgewiesen werden.

In der Kontrollgruppe imponierte die Aortenwand verdickt und degenerativ verändert, ebenso zeigte sich eine funktionelle Insuffizienz. Im Großtiermodell nach Baraki überzeugen die dezellularisierten allogenen Konduits durch ihre bessere Funktionalität, Haltbarkeit und reduzierte immunologische Reaktion. Ebenso konnte eine vielsprechende Reendothelialisierung in den zuvor dezellularisierten Konduits nachgewiesen werden.

Auch Numata et al. zeigten in ihrem Modell, dass dezellularisierte Allografts im Gegensatz zu ausschließlich kryokonservierten Konduits eine verminderte Inflammation (keine T-Lymphozyten oder Makrophagen) aufweisen. Funktionell und makroskopisch waren die beiden Gruppen jedoch vergleichbar. (Numata et al. 2004)

Aber auch einige Arbeiten mit weniger erfolgreichen Ansätzen wurden bereits publiziert. So publizierten Simon et al. bereits 2003 den Misserfolg ihrer dezellulierten Schweineherzklappen, Synergraft™ genannt: Männliche Kindern im Alter zwischen 2,5 und 11 Jahren (n=4) erhielten einen pulmonalen Klappenersatz mittels Synergraft™. Zwei Kinder starben 6 Wochen bzw. 1 Jahr nach der Implantation und zeigten postmortal eine massive Entzündungsreaktion sowie Degeneration der implantierten Klappe. Ein drittes Kind starb nach einer Woche an einer Ruptur des Implantats. Dem letzten Kind wurde anschließend die Klappe prophylaktisch am zweiten postoperativen Tag entfernt (Simon et al. 2003). Als vermutliche Ursache für die frühe Degeneration der Implantate wurde eine unzureichende Entfernung zellulärer Antigene im Rahmen der Dezellularisierung gefunden (Kasimir et al. 2006). Dies verdeutlicht die Bedeutung eines effektiven Dezellularisierungsverfahrens. Selbst eine adäquate Dezellularisierung kann das Problem des „körperfremden“ Implantats nicht gänzlich lösen, sodass immer von einer, wenn auch geringen, Immunantwort ausgegangen werden muss. Eine schnelle Rebesiedlung der zellfreien Prothesen mit autologen Zellen ist daher ein wichtiger Aspekt zur Erhöhung der Haltbarkeit der Implantate. Darüber hinaus könnten anti-degenerative Substanzen, also Stoffe, die z.B. anti-inflammatorisch wirken oder einer Kalzifizierung vorbeugen, die Überlebensdauer der Prothesen noch weiter verbessern.

1.6 Simvastatin und Cholesterin

Die progrediente Degeneration und Neigung zu Entzündungsreaktionen stellen aktuell die limitierenden Faktoren implantierter Allografts dar, die zu einem beschleunigten Funktionsverlust der Klappe führen können. Daher bedarf es einer Intervention, um die Inflammation und damit auch die kalzifizierende Degeneration zu reduzieren.

Eventuell stellt das Medikament Simvastatin hierbei eine Einsatzmöglichkeit dar, da dessen anti-degenerative und anti-kalzifizierende Effekte einen positiven Einfluss auf die arterielle Verkalkung haben können. Auch eine plaquestabilisierende und anti-inflammatorische Wirkung konnte bereits für die Atherosklerose nachgewiesen werden (Nezić et al. 2009; Bea et al. 2002).

In einer Studie von Dimitrow et al. wurde die Statinwirkung auf die arterielle Verkalkung untersucht. Bei 33 Patienten mit und ohne vorbestehende Atherosklerose wurden unter anderem die Konzentration der Kalzifizierungsmarker Osteopontin und Osteoprotegerin vor

und nach Gabe von 20 mg Atorvastatin bestimmt. Die Patienten zeigten anschließend signifikant verminderte Plasmakonzentrationen von Osteoprotegerin, was die Hypothese einer positiven Wirkung von Statinen auf die Verkalkung von Arterien unterstützt (Dimitrow, Jawień, and Gackowski 2011).

Simvastatin ist eigentlich ein Arzneimittel, das vorwiegend zur Senkung von Blutfettwerten eingesetzt wird und zur Gruppe der HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffen gehört. HMG-CoA ist ein Zwischenprodukt in der Cholesterinsynthese. Durch die verminderte Bereitstellung von HMG-CoA nach Statingabe wird weniger körpereigenes Cholesterin produziert. Als Reaktion auf den Mangel werden vermehrt LDL-Rezeptoren exprimiert, die LDL-Cholesterin in die Zellen aufnehmen, wodurch der LDL-Spiegel im Blut sinkt.

LDL-Cholesterin (*low-density-cholesterin*) ist ein cholesterinreiches Lipoprotein, dessen Hauptaufgabe der Transport von Cholesterin aus der Leber in extrahepatisches Gewebe darstellt. Nach der Aufnahme von LDL in die Zellen wird das Cholesterin freigesetzt und gespeichert. Physiologisch stellt Cholesterin einen wichtigen Bestandteil der Zellmembranlipide dar und wird zudem für die Synthese von Vitaminen, Gallensäuren und Hormonen benötigt.

Wird jedoch mehr Cholesterin produziert als für physiologische Vorgänge benötigt wird, kommt es zu einer Hypercholesterinämie. Hiervon spricht man ab einem Serum-Gesamt-Cholesterinwert von 200 mg/dl. Die Hypercholesterinämie gilt als einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose.

Die Statintherapie und ihre Auswirkungen auf kardiovaskuläre Erkrankungen, LDL-Konzentrationen und Plaquezusammensetzung sind Bestandteil vieler aktueller Studien.

In einer Metaanalyse von Banach et al. wurden neun verschiedene Studien mit insgesamt 830 Patienten unter Statintherapie hinsichtlich der Wirkung auf arteriosklerotische Plaques verglichen. Es zeigte sich unter Statingabe eine signifikante Reduktion der Plauegröße (Banach et al. 2015).

Die medikamentöse Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern ist seit Jahren Teil der leitliniengerechten Therapie bei Atherosklerose. Diverse großangelegte Studien zeigen ein reduziertes Risiko für die Entwicklung von KHK, Myokardinfarkten oder Schlaganfällen unter regelmäßiger Statintherapie (Heart Protection Study Collaborative Group 2002; Baigent et al. 2005). Der positive Effekt von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern auf die Progression der kalzifizierenden Aortenklappendegeneration ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt.

Farivar und Cohn zeigten 2003, dass auch eine Beziehung zwischen Hypercholesterinämie und Aortenklappenverkalkung besteht. In einer retrospektiven Kohortenstudie (n=144) wurde eine signifikant proportionale Beziehung zwischen Serum-Cholesterinwerten und

Klappenverkalkung belegt. Eine ebenfalls durchgeführte Fall-Kontroll-Studie mit 66 Patienten, die einen Klappenersatz erhalten hatten, ergab signifikant höhere Cholesterinkonzentrationen bei Patienten, denen die degenerierte Klappenprothese wieder entfernt werden musste, im Vergleich zu Patienten mit ähnlich langer Implantationsdauer ohne nötige Prothesenentfernung. Der Effekt einer Statingabe wurde in dieser Studie noch nicht untersucht (Farivar and Cohn 2003).

Mehrere Veröffentlichungen deuten aktuell darauf hin, dass die gleichzeitige Gabe von Statinen das Fortschreiten einer Klappenverkalkung verlangsamen kann (Antonini-Canterin et al. 2005; Rosenhek et al. 2004; Bellamy et al. 2002; Novaro et al. 2001). Eine andere Studie diskutiert die Idee, dass der medikamentöse Effekt auf die Klappenstenose möglicherweise auch stadienabhängig ist; so ließ sich nur bei leichteren Formen der Aortenklappenstenose durch Statingabe eine Progression verhindern (Antonini-Canterin et al. 2008). Cowell et al. kamen wiederum zu dem Ergebnis, dass die Gabe von Statinen das Fortschreiten einer Aortenklappenstenose weder verlangsamen, noch die bestehende Stenose reduzieren kann (Cowell et al. 2005).

Auch für den Effekt einer Statintherapie nach Implantation einer Klappenprothese liegen unterschiedliche Studienergebnisse vor. Eine Studie konnte zeigen, dass sich durch Statingabe die Degeneration von biologischen Klappenprothesen verlangsamen lässt (Antonini-Canterin et al. 2003). Auch Lorusso et al. zeigten in ihrem Tiermodell bei subkutaner Implantation von bovinen Klappengewebe und anschließender Gabe von Atorvastatin eine verminderte Degeneration des Implantats (Lorusso et al. 2010). Pullan et al. konnten zwar eine Reduktion der Mortalität durch Statintherapie nach Implantation von biologischen, jedoch nicht von mechanischen Klappenprothesen zeigen (Pullan et al. 2014). Eine andere Studie konnte wiederum keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Prothesendegeneration und postoperativer Therapie mit Lipidsenkern zeigen (Kulik et al. 2010).

Für den Einsatz von Statinen bei *tissue-engineerten* Prothesen, insbesondere bei dezellularisierten Prothesen, existieren bisher kaum brauchbare Studienergebnisse.

1.7 Modelletablierung

Für die Experimente dieser Arbeit wurde ein Kleintiermodell benötigt, das die *in vivo* Evaluation eines vollfunktionsfähigen kardiovaskulären Implantats ermöglicht, sowie insbesondere eine Untersuchung der Einflüsse des systemisch applizierten Statins auf die Degeneration der Prothese erlaubt.

Hierfür wurde ein zuvor in unserer Arbeitsgruppe etabliertes Rattenmodell der heterotopen Implantation von Aortenkonduits verwendet (Assmann et al. 2012). Den Spender-Ratten

(200-250 g) wurde der Aortenbogen inklusive Aortenklappe explantiert, dieser wurde im Anschluss zur Reduktion von Immunreaktionen (Meyer et al. 2005), zum besseren Erhalt der Matrixstruktur und zur Verminderung der Thrombenbildung (Grauss et al. 2003) dezellularisiert.

Die Reimplantation des U-förmigen Konduits erfolgte hierbei heterotop an der infrarenalen Aorta durch zwei End-zu-Seit-Anastomosen. Die infrarenale Aorta zwischen den Anastomosen wurde ligiert (siehe Abb. 4). Eine anschließende Überwachung der Perfusion, mit besonderem Augenmerk auf die unteren Extremitäten, zeigte keine Komplikationen. Der Blutfluss über die transplantierte Klappe wurde ebenfalls mittels Doppler-Sonografie erfolgreich überprüft (Assmann et al. 2012).

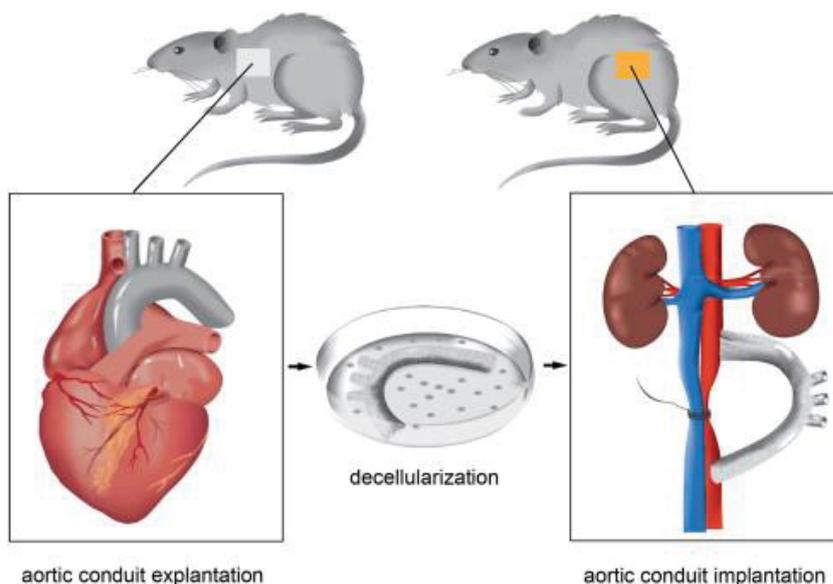


Abb. 4: Transplantations-Design nach Assmann et al. 2012 (mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health)

Dieses Modell wurde in ähnlicher Art und Weise bereits früher verwendet und ermöglicht eine vereinfachte Untersuchung einer vollfunktionsfähigen Klappe ohne die technisch kaum sicher durchführbare orthotope Implantation (Légaré et al. 2000). Ebenso lässt sich durch das Modell die Größendifferenz beheben, die bei Klappentransplantationen zwischen unterschiedlich schweren bzw. unterschiedlich großen Ratten auftritt und zu einer beschleunigten Fibrosierung sowie zu immunologischen Reaktionen gegenüber dem Implantat führen kann. Durch die heterotope Implantation konnte beides auf ein Minimum reduziert und eine sehr hohe Überlebensrate erreicht werden (Oei et al. 1999).

Um die Degenerationsneigung der Konduits in unserem Rattenmodell zu beschleunigen, verwendeten wir ein prokalzifizierendes Futter. Verschiedene Studien weisen aktuell darauf hin, dass die Gabe von Vitamin D und Cholesterin zu einer verstärkten Aortenklappenverkalkung mit histologischen und funktionalen Veränderungen führen kann

(Drolet et al. 2008; Ngo et al. 2008; Tang et al. 2006). Hoshina et al. zeigten, dass auch erhöhte Serum-Calcium- und Serum-Calciumphosphat-Werte in Zusammenhang mit einer schnelleren Progression einer Aortenklappenstenose stehen (Hoshina et al. 2012). Auch in einer anderen Studie wurden erhöhte Phosphat-Werte als möglicher Riskofaktor für die Entstehung und Progression einer Aortenklappenverkalkung beschrieben (Linefsky et al. 2011).

In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe wurden verschiedene Kombinationen und Konzentrationen von Vitamin D, Calciumphosphat und Cholesterin hinsichtlich ihrer prokalzifizierenden Eigenschaften untersucht. Hochdosiertes Vitamin D führte zu einer verstärkten Kalzifizierung der Aortenklappe. In Kombination mit Cholesterin kam es zusätzlich zu einer Hypercholesterinämie mit vermehrten Lipidablagerungen an den Gefäßen. Die Zugabe von Calciumphosphat erhöhte nochmals den LDL/HDL-Quotienten und verstärkte die Calciumablagerungen an der Aortenklappe (Assmann, Zwirnmann, et al. 2014).

In dieser Studie erhielten alle Empfängertiere von Versuchsbeginn an 300.000 IE/kg Vitamin D, 2% Cholesterin und 1,5% Calciumphosphat in einer Spezialdiät, welche *ad libitum* gefüttert wurde.

1.8 Fragestellung der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob Simvastatin einen positiven Einfluss auf die kalzifizierende Degeneration von dezellularisierten kardiovaskulären Prothesen haben kann. Die Untersuchung dieser Fragestellung fand in einem Rattenmodell der heterotopen Aortenkonduit-Implantation statt. Da die Degeneration dezellularisierter Klappen nur sehr gering ausgeprägt ist, wurde den Tieren zusätzlich ein pro-kalzifizierendes Härtefutter verabreicht, um die Degeneration und Kalzifizierung der implantierten Konduits zu beschleunigen.

Folgende Fragen sollen nun in dieser Arbeit beantwortet werden:

- Hat Simvastatin einen Einfluss auf die Reendothelialisierung?
- Kann Simvastatin die inflammatorische Reaktion positiv beeinflussen?
- Ist Simvastatin in der Lage, die kalzifizierende Degeneration zu reduzieren?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Alcianblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Aluminiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Betaisodona	Mundipharma Limburg an der Lahn, Deutschland
Brilliant Crocein R	Waldeck, Division Chroma Münster, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Calciumchloriddihydrat	Merck Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
DQ-Gelantine	Invitrogen Eugene, USA
EDTA	Merck Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck Darmstadt, Deutschland
Eosin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Zentralapotheke Universität Düsseldorf
Eisenchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd	Roth Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland

Häm Gill 3	Thermo Scientific Kalamazoo, USA
Heparin	Rotexmedica GmbH Trittau, Deutschland
Isofluran	Actaris Langenfeld, Deutschland
Isopropanol	Merck Darmstadt, Deutschland
Kaliumjodid	Roth Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Merck Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid-Injektionslösung	B Braun Melsungen, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Natriumlaurylsulfat	Roth Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Nuclear Fast Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Carlsbad, USA
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Ringerlösung	Jonosteril Fresenius Bad Homburg, Deutschland
RNAse-freies Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Safran du Gatinais	Waldeck, Division Chroma Münster, Deutschland
Säurefuchsin	Waldeck, Division Chroma Münster, Deutschland
Silbernitrat	Merck Darmstadt, Deutschland
Tissue Tek	Sakura Finetek Alphen aan den Rijn, Niederlande
Triton-X-100	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Trizol	Invitrogen Carlsbad, USA
Tween 20	Merck Darmstadt, Deutschland
Vectashield DAPI	Vector Labs Peterborough, England
Xylol	Prolabo Fontenay-Sous-Bois, Frankreich

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

rabbit anti-von-Willebrand-Faktor (vWF)	DAKO Hamburg, Deutschland
mouse anti-smooth-muscle-actin (SMA)	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Alexa488 goat anti-rabbit	Invitrogen Carlsbad, USA
Alexa488 goat anti-mouse	Invitrogen Carlsbad, USA

Alexa546 goat anti-rabbit

Invitrogen

Carlsbad, USA

Alexa546 goat anti-mouse

Invitrogen

Carlsbad, USA

2.1.3 Primer

Alle Primer

Invitrogen,

Carlsbad, USA

Primer-Name <i>(5'→ 3', f = forward, r = reverse)</i>	Primer-Sequenz
α-SMA-f	GCT CTG GTG TGT GAC AAT GG
α-SMA-r	CCC CAC ATA GCT GTC CTT TT
ALP-f	GCA CTC CCA CTA TGT CTG GAA
ALP-r	AGG GAA GGG TCA GTC AGG TT
BMP2-f	GCT CAG CTT CCA TCA CGA A
BMP2-r	AAG AAG CGT CGG GAA GTT TT
CD39-f	GGG CCT ATG GGT GGA TTA CT
CD39-r	CAA AGG TTG CCT GTT TCT GG
CD73-f	ACG TGT CCA TGT GCA TTG TAA
CD73-r	GGT TCT CCC AGG TGA TGG TA
IL1b-f	AGG ACC CAA GCA CCT TCT TT
IL1b-r	CAT CAT CCC ACG AGT CAC AG
IL6-f	ACC ACC CAC AAC AGA CCA GT
IL6-r	AGT GCA TCA TCG CTG TTC AT
OCN-f	AAG CAG GAG GGC AGT AAG GT

OCN-r	GTC CGC TAG CTC GTC ACA AT
OPG-f	GAG TGT GCG AAT GTG AGG AA
OPG-r	CAC CTG AGA AGA ACC CAT CC
OPN-f	AAG CCT GAC CCA TCT CAG AA
OPN-r	ATG GCT TTC ATT GGA GTT GC
RUNX2-f	GAT GAC ACT GCC ACC TCT GA
RUNX2-r	GAT GAA ATG CCT GGG AAC TG
TNFα-f	GCT CCC TCT CAT CAG TTC CA
TNFα-r	GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC
RAGE-f	TGA ACT CAC AGC CAA TGT CC
RAGE-r	TCA GAG GTT TCC CAT CCA AG

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primer

2.1.4 Gebrauchslösungen

Alcianblau-Lösung	1g Alcianblau ad 100ml Aqua bidest
Alkalischer Alkohol	40 ml 30% NH ₄ OH ad 360ml 96% Ethanol
Alkoholisches Hämatoxylin (2%)	10g Hämatoxylin ad 500ml 96% Ethanol
Bouin's Lösung	300ml Pikrinsäure 100ml Formaldehyd 37-40% 20 ml 100% Eisessig
Brilliant Crocein R Stock	4g Brilliant Crocein R ad 398ml Aqua bidest (pH 7,4)
Eisenchlorid	12,4g FeCl ₃ ·6H ₂ O 5 ml konz. HCl (32-37%) ad 500ml Aqua bidest (pH 7,4)
Detergenzien-basierte Dezell.-Lösung A	0,5% SDS, 0,5% Sodium Deoxycholat 0,05% NaN ₃

Detergenzien-basierte Dezell.-Lösung B	ad 1 l Aqua bidest (pH 7,4) 0,05% NaN ₃
Jodlösung	ad 1l Aqua bidest (pH 7,4) 10g Jod 20g Kaliumjodid ad 500ml Aqua bidest (pH 7,4)
Nuclear Fast Red Solution (0,1%)	0,1g Nuclear Fast Red 5g Aluminum Sulfat 100ml Aqua dest.
Phosphate Buffered Saline	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1l Aqua bidest (pH 7,4)
Säurefuchsin stock	0,5g Säurefuchsin 2,5ml 100% Eisessig ad 497,5ml Aqua bidest (pH 7,4)
Saffron du Gatinais	6g Saffran ad 100 ml Ethanol 100%
Tris-Puffer-Lösung (Calcium-Assay)	5ml 1M Tris-HCl, pH 7,0 ad 45 ml HPLC-grade Wasser
Tris-Puffer-Lösung (is-Enzymografie)	1,2g 50mM Tris-HCl pH 7,5 294g CaCl ₂ - Dihydrat 1,8g NaCl 10ml Triton X-100 ad 190ml Aquadest

2.1.5 Geräte und Gebrauchswaren

Abdecktücher	Foliodrape Hartman, Deutschland
Autoklav	System VX-95 Wettenberg, Deutschland
Calcium-Assay-Kit	Cayman Chemical Company Ann Harbor, USA
Chirurgische Instrumente	Aesculap Tuttlingen, Deutschland
DAKO Pen	DAKO Glostrup, Dänemark

Deckplättchen	Engelbrecht Edermünde, Deutschland
Eppendorf Rörchen	Scrensen BioScience Salt Lake City, USA
Falcon	Greiner Bio-One Kremsmünster, Österreich
Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
GraphPad Prism V5.04	GraphPad Software San Diego, USA
Histo-Kitt Eindeckmedium	Roth Karlsruhe, Deutschland
Incidur-Spray	Ecolab Wien, Österreich
Injektionskanüle	Terumo Leuven, Belgien
Kryostat	Applied Biosystems Darmstadt, Germany
Nagellack	dm-Drogeriemarkt Karlsruhe, Deutschland
Nahtmaterial	Ethicon Norderstedt, Deutschland
Objektträger	Marienfeld-Superior Lauda-Königshofen, Deutschland
OP-Mikroskop (Nikon C-W10xA/22)	Nikon GmbH Amsterdam, Niederlande
Pipetten	STARLAB GmbH Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH Wesseling-Berzdorf, Deutschland
RNA 6000 Nano-Kit	Agilent Technologies Santa Clara, USA
RNeasy Mini-Kit	Qiagen Hilden, Deutschland
Spektrometer (BioPhotometer plus)	Eppendorf GmbH Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Sterile Werkbank	Gelaire Sydney, Australien
Seldingerdraht (arteriell)	Vygen

Spritzen	Elouven, Frankreich B Braun Melsungen, Deutschland
Sterile Kompressen	Hartmann Heidelberg, Deutschland
Tierfutter (Statin)	ssniff-Spezialdiäten Soest, Deutschland
Ultraschallgerät Philips HD 11XE	Philips GmbH Hamburg, Deutschland
Venenverweilkatheter	B Braun Melsungen, Deutschland
Rasierer (Aesculap favorita II)	Aesculap Tuttlingen, Deutschland

2.1.6 Versuchstiere

Die Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten stammten aus der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf, Deutschland (Details s. Abschnitt 2.2)

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Ziel der Studie war es, die Auswirkungen einer systemischen Applikation des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers Simvastatin auf die kalzifizierende Degeneration dezellularisierter Aortenkonduits im heterotopen Ratten-Implantationsmodell zu untersuchen.

Um die Funktion der heterotopen Aortenklappe zu verbessern, wurde an Tag -14 eine Insuffizienz der nativen Aortenklappe des Empfängertieres erzeugt. An Tag 0 folgte die Implantation des dezellularisierten Aortenkonduits, welches nach 28 bzw. 84 Tagen im systemischen Blutkreislauf wieder explantiert wurde.

Um die Degenerationsprozesse im Organismus zu beschleunigen und somit eine Kalzifizierung der Implantate innerhalb weniger Wochen zu erzielen, wurden alle Empfängertiere (n=28) von Versuchsbeginn an (Tag -14) mit einer prokalzifizierenden Spezialdiät (300.000 IE/kg Vitamin D, 2% Cholesterin und 1,5% Calciumphosphat) *ad libitum* gefüttert. Tiere in der Therapiegruppe (n=14) erhielten zusätzlich 10 mg / kg KG Simvastatin (Gruppe S). Die Kontrollgruppe (n=14) wurde mit prokalzifizierender Spezialdiät ohne Simvastatin versorgt (Gruppe D).

2.2.2 Operationen

Alle Tierversuche erfolgten unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes sowie im Rahmen des vom LANUV NRW genehmigten Tierversuchsvorhabens mit dem Aktenzeichen 87-51.04.2010.A068.

2.2.2.1 Entnahme des nativen Konduits

Als Spender-Tiere (n=28) wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 200-250 g verwendet. Diese wurden in einer Glasglocke unter CO₂-Gabe eingeschläfert und anschließend thorakotomiert. Herz und *aorta thoracica* wurden vom umliegenden Gewebe getrennt und in Gänze entnommen.

Nach ante- und retrograder Spülung mit Phosphate-Buffered-Saline (PBS) und 12,5 IU/ml Heparin wurde unter einem Stereomikroskop (Nikon, Düsseldorf) bei 7- bis 10-facher Vergrößerung ein U-förmiges Aortenkonduit mit schmalem Myokardsaum präpariert. Die Koronararterien wurden mit einem nicht-resorbierbaren 8-0 Monofilament-Polypropylen-Faden ligiert und die supraaortalen Abgänge wurden geclippt.

2.2.3 Dezellularisierung

Die explantierten Aortenkonduits wurden mithilfe eines Detergenzien-basierten Protokolls (Akhyari et al. 2010) dezellularisiert. Das Protokoll setzt sich aus mehreren Wasch- und Spülvorgängen zusammen, welche alle auf einem Schüttler bei 220 Umdrehungen/min durchgeführt wurden.

Zunächst wurde mit 0,5% SDS + 0,5% Sodium Deoxycholat + 0,05% NaN₃ (in Aqua bidest) für 48 Stunden gewaschen, wobei die Lösung alle 12 Stunden gewechselt wurde.

Anschließend wurden die Konduits für 24 Stunden in 0,05% NaN₃ (in Aqua bidest) gewaschen. Zum Schluss folgten 3 Tage in PBS mit Penicillin/Streptomycin in einer 1:100 Verdünnung. Die Lösung wurde hierbei täglich gewechselt. Nach sechs Tagen war die Dezellularisierung abgeschlossen.

2.2.4 Generierung einer Aortenklappen-Insuffizienz

Als spätere Aortenkonduit-Empfänger (n=28) wurden männliche Wistar-Ratten (200-250 g) verwendet. Allen wurde 14 Tage vor der Implantation des Konduits interventionell eine Aortenklappen-Insuffizienz generiert. Dieses Modell wurde von unserer Arbeitsgruppe kürzlich publiziert (Munakata et al. 2013).

Dafür wurden die Tiere unter Isofluran-Kurzarkose (3 % in 100 % Sauerstoff) mittels einer 17G-Kanüle intubiert und unter permanenter Ventilation (80 maschinelle Beatmungshübe pro Minute) mit Isofluran-Gabe (2,0-2,5 % in 100 % Sauerstoff) narkotisiert. Halsbereich, Thorax und Abdomen wurden rasiert. Nach Desinfektion mit Betaisodona folgte ein Hautschnitt über der *Arteria carotis communis dextra*. Nach Freilegung derselben wurde ihr distaler Anteil mithilfe eines polyfilen 3-0 Vicryl-Fadens ligiert. Die Arterie wurde längs inzidiert und eine arterielle Kanüle wurde bis zum Aortenbogen vorgeschoben. Der korrekte Sitz des Katheters wurde sonographisch überprüft und die Ausgangs-Herzparameter (siehe auch 2.2.5.) wurden bestimmt.

Anschließend wurde mithilfe eines über den Katheter vorgeschobenen Drahtes die Aortenklappe perforiert. Der Erfolg dieser Maßnahme wurde direkt im Anschluss erneut durch Echokardiografie überprüft. Hierbei ließen sich neu aufgetretene Aortenklappen-Insuffizienzen vom Grad II-III zeigen.

Abschließend wurde der Katheter entfernt und auch der proximale Anteil mithilfe eines nicht-resorbierbaren 8-0 Monofilament Polypropylen-Fadens ligiert. Es folgten eine Hautnaht und die Extubation.

2.2.5 Echokardiografie

Für die transthorakale Echokardiografie, welche an den Tagen -14, 0, 28 und 84 stattfand, wurden die Ratten wie unter 2.2.4 beschrieben narkotisiert und thorakal rasiert. Mit einem 15 MHz Linearschallkopf, angeschlossen an ein Philips HDX11 Ultraschallgerät, wurden in der parasternalen Längsachse M-Mode-Sequenzen aufgenommen, mittels derer der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) gemessen sowie die Ejektionsfraktion (EF) über das enddiastolische (EDV) und das endsystolische Volumen (ESV) berechnet wurde: $EF = (EDV - ESV) / EDV$.

Darüber hinaus wurde die Schwere der Aortenklappeninsuffizienz dopplersonografisch bestimmt. Abschließend wurden die Tiere entweder extubiert, operiert oder getötet.

2.2.6 Implantation des dezellularisierten Konduits

Die heterotope Implantation dezellularisierter Aortenkonduits erfolgte in Anlehnung an (Assmann et al. 2012).

Hierfür wurden die aortenklappeninsuffizienten Empfänger-Ratten (n=28) an Tag 0 erneut mithilfe eines Venenverweilkatheters intubiert (siehe Abb. 5A) und unter permanenter Ventilation (80 maschinelle Beatmungshübe / min) mit Isofluran-Gabe (2,0-2,5% in 100% Sauerstoff) narkotisiert. Nach lokaler Rasur wurde die rechte *Vena jugularis interna* freipräpariert und ein zentralvenöser Katheter gelegt.

Nach Desinfektion mit Betaisodona erfolgte die mediane Laparotomie, ein Kleintier-Thorax-Sperrer wurde eingesetzt und die Darmschlingen wurden extraabdominal gelagert, um die Präparation des Retroperitoneums zu gewährleisten.

Die infrarenale Aorta wurde vorsichtig von der *Vena cava inferior* separiert. Anschließend wurde über den zentralen Venenkatheter ein Bolus von 300 IU/kg Heparin verabreicht und die infrarenale Aorta abgeklemmt. Das zuvor präparierte und dezellularisierte U-förmige Konduit wurde dann mit einem nicht-resorbierbaren 10-0 Monofilament-Polypropylen-Faden in End-zu-Seit-Technik an die infrarenale Aorta anastomosiert, wobei das klappentragende Ende des Konduits die proximale Anastomose bildete (siehe Abb. 5D). Zwischen den beiden Anastomosenähten wurde die untere Körperhälfte reperfundiert, um die Ischämie-Zeit deutlich unter 30 Minuten zu halten.

Schließlich wurde das native Aortenstück zwischen proximaler und distaler Anastomose ligiert, um den Blutfluss ausschließlich über das implantierte Konduit zu leiten. Nach erfolgter Anastomosierung wurden die Klemmen an der Aorta entfernt und die Reperfusion über das Implantat beobachtet.

Bei Anastomosen-Suffizienz konnte der Darm zurückverlagert und das Abdomen geschlossen werden. Schließlich folgte eine dopplersonografische Kontrolle der Konduit-Perfusion.

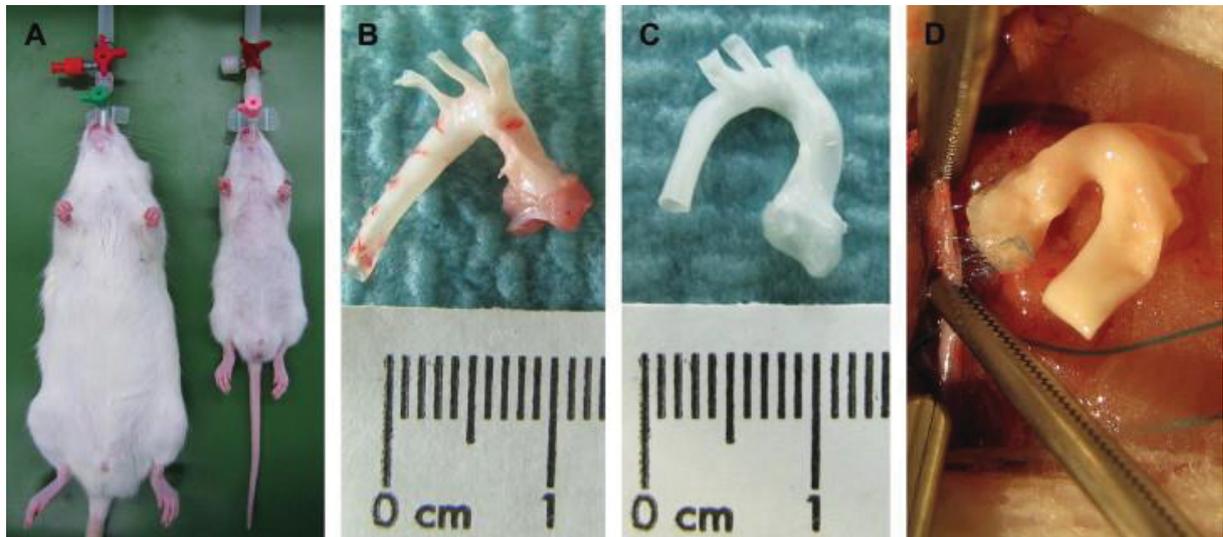


Abb. 5: Implantation des Konduits nach Assmann et al. 2012. (mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health)

Intubiertes Spender- (A, links) und Empfängertier (A, rechts), Konduit nach Explantation (B), Konduit nach Dezellularisierung (C), heterotope Implantation des Konduits (D)

2.2.7 Abschließende Explantation der Konduits

Die Explantation der Konduits erfolgte nach 4 (n=3 pro Gruppe) oder 12 Wochen (n=11 pro Gruppe). Dazu wurden die Tiere erneut unter Isofluran-Gabe anästhesiert.

Zunächst wurde die Ratte echokardiografiert und mittels Dopplersonographie (Philips HDX11) die Funktion der implantierten Aortenklappe beurteilt.

Danach erfolgte die Laparotomie und die Anastomosen wurden freigelegt. Die abdominale Aorta wurde proximal und distal der Anastomosen durchtrennt und das Konduit explantiert, wodurch die Ratte unter Vollnarkose an Ausblutung verstarb. Es folgte eine ante- und retrograde Spülung des Konduits mit PBS + 12,5 IU/ml Heparin sowie eine Teilung des Konduits in der Mitte des Bogens. So entstanden zwei Konduithälften: Ein proximaler Teil mit Aortenklappe (genannt Teil A) und ein distaler Teil ohne Klappe (genannt Teil B).

2.2.8 Vorbereitung für Histologie

Ein Teil der explantierten und gespülten Konduits (n=6 pro Gruppe) wurde in Tissue Tek zur Kryo-Konservierung eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden dann bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.9 Vorbereitung für PCR

Andere Konduits (n=5 pro Gruppe) wurden nach dem Spülvorgang in Eppendorf Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

2.2.10 Vorbereitung für Calcium-Kit

Zur Messung der Calcium-Konzentration wurden die explantierten Aortenkonduits (n=3 pro Gruppe) in PBS-Lösung mit 0,16 mg/ml Heparin gereinigt, getrocknet und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.11 Histologie

Die unbehandelten Objektträger wurden nach dem Schneiden bei -20°C gelagert.

2.2.11.1 Schneideprotokoll

Mithilfe eines Kryostats wurden die Gefrierblöcke nach einem Schneideprotokoll, jeweils im Querschnitt zum Lumen des Explantats hin, geschnitten. Die Konduithälften wurden zunächst erneut in zwei Teile unterteilt: A1 und A2, bzw. B1 und B2 (siehe Abb. 6).

Pro Viertel entstanden erst 3 Schnitte à 6 µm und 7 Schnitte à 4 µm, nach einem Abstand von etwa 250 µm entstanden erneut 3 Schnitte à 6 µm und 7 Schnitte à 4 µm. Schließlich folgte ein weiterer Abstand von 250 µm und 5 Schnitte à 6 µm.

So erzielte man pro Konduit eine Gesamtanzahl von 100 Objektträgern.

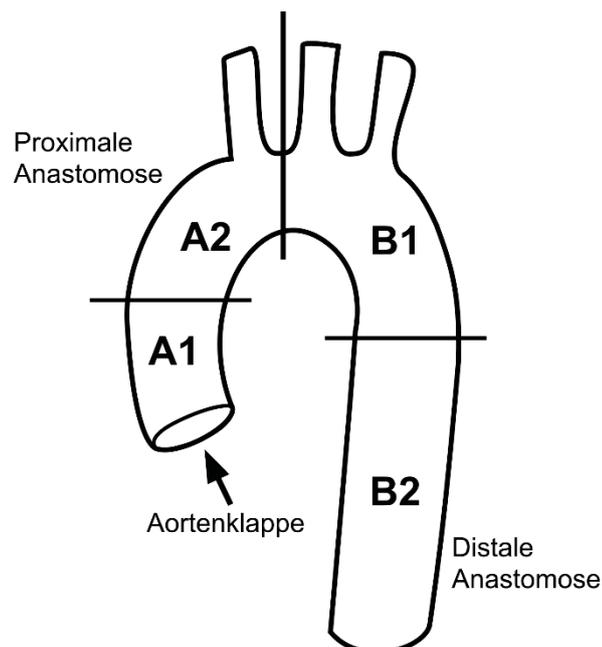


Abb. 6: Benennung der verschiedenen Regionen

2.2.11.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hierfür wurden die bisher unbehandelten Kryoschnitte für 1 Minute in Hämatoxylin gelegt. Danach wurde 1 Minute in Aqua bidest, 1 Minute in 4-5% Eisessig und erneut 1 Minute in Aqua bidest gewaschen. Nachdem die Schnitte für 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und für 1 Minute in 70% Alkohol dehydriert wurden, gelangten sie für 10 Minuten in Eosin. Hiernach folgte zum Entwässern eine aufsteigende Alkoholreihe mit einmal 70%, zweimal 96% und zweimal 100% Alkohol für jeweils 1 Minute. Abschließend wurden sie für zweimal 1 Minute in Xylol gelegt.

Nach dem Trocknen folgte die Einbettung mit Roti Histokitt II.

2.2.11.3 Bestimmung des Intima-Media-Index

Zur semiquantitativen Auswertung der Neointima-Formation in den Explantaten wurden in jeder der 4 Konduit-Regionen Intima-Media-Indizes bestimmt. Hierzu wurden an jeweils drei HE-gefärbten Schnitten pro Region (B1, B2 und A2) mit 250µm Abstand zueinander an acht Stellen pro Schnitt mithilfe der Leica Application Suite 3.7 Software die Intima- und Mediadicke gemessen. An der Klappenregion (A1) erfolgte keine Messung, da Ablagerungen in den Taschen eine Abgrenzung zur Neointima unmöglich machten.

Der Mittelwert der acht Intimawerte wurde durch den Mittelwert der acht Mediawerte geteilt. Auf diese Weise ergeben sich drei Index-Werte pro Region und zwölf Werte pro Konduit. Für jede Region wurden die Intima-Media-Indizes beider Gruppen nach 4 und 12 Wochen *in vivo* statistisch miteinander verglichen.

2.2.11.4 Movat-Pentachrom-Färbung

Für eine bessere Gewebsübersicht wurde eine Movat-Pentachrom-Färbung angefertigt.

Hierbei färben sich:

- Kerne und elastische Fasern: schwarz
- Hintergrund und Muzine: blau
- Muskulatur und Fibrin: rot
- Kollagen und retikuläres BGW: gelb
- Glykosaminoglykane: grün

Vor dem Färbevorgang wurden die Kryoschnitte über Nacht bei 37 °C erhitzt.

Nach 5 Minuten in Aqua bidest, gefolgt von einer Fixierung 10 Minuten in Formalin und erneuten 5 Minuten in Aqua bidest, wurden die Schnitte für 10 Minuten in einer Bouin's

Lösung bei 60 °C erhitzt. Die Bouin's Lösung besteht aus 300 ml Pikrinsäure, Formaldehyd 37-40 % und 20 ml 100 % Eisessig.

Anschließend wurden die Objektträger für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach 5 Minuten in 5 % Natriumthiosulfat, wurden die Schnitte erneut für 5 Minuten in Aqua bidest gewaschen; wobei jeweils nach 2 Minuten das Wasser gegen frisches ausgetauscht wurde.

Schließlich folgte eine Färbung in 1 % Alcian-Blau für 20 Minuten. Nach 3 Minuten unter fließendem Wasser, wurden die Objektträger für 10 Minuten in erhitztem alkalischen Alkohol stabilisiert.

Anschließend wurde erneut 3 Minuten lang unter fließendem Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden dann 9 Minuten in Weigert's Working-Solution gefärbt. Diese Lösung setzt sich zusammen aus 60 ml 2 % Hämatoxylin, 40 ml Eisenchlorid und 20 ml Jodlösung. Nach erfolgter Färbung wurde erneut 1 Minute unter kaltem fließendem Wasser und 5 Minuten in Aqua bidest gewaschen.

Im Anschluss Färbung für 1 Minute in einer Crocein-Säurefuchsin-Working-Solution, bestehend aus 80 ml Brilliant Crocein-R-Stock und 20 ml Säurefuchsin-Stock.

Gefolgt von Aqua bidest für abermals 5 Minuten mit Wasserwechsel nach jeweils 2 Minuten. Die Objektträger wurden dann zunächst 5 Minuten in 5 % Phosphorwolframsäure differenziert und im Anschluss direkt für 5 Minuten in 1 % Eisessig gespült.

Es folgten erneutes Waschen in Aqua bidest (nach 2 Minuten jeweils frisches Wasser) und Dehydratisieren 1 Minute in 96 % Alkohol, sowie zweimal 1 Minute in 100 % Alkohol.

Nach 8 Minuten in alkoholischem Safran, wurde erneut zweimal 1 Minute in 100 % Alkohol gespült und dehydratisiert.

Anschließendes Entfetten in Xylol bildete den letzten Schritt (dreimal 5 Minuten).

Zum Abschluss wurden die Objektträger mit Roti-Histokitt II eingedeckt.

2.2.11.5 Von-Kossa-Färbung

Zur Darstellung der Verkalkung (Hydroxyapatit-Ablagerungen) wurde eine von-Kossa-Färbung verwendet.

Zunächst wurden die Kryoschnitte für 30 Minuten unter einer 60-Watt-Lampe mit 1 % Silbernitratlösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua bidest folgten 5 Minuten in 5 % Natrium-Thiosulfat. Erneutes Waschen mit Aqua bidest und 5 Minuten in einer 0,03 % Nuclear-Fast-Red-Lösung bildeten den nächsten Schritt.

Schließlich wurden die Schnitte ein letztes Mal mit Aqua bidest gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, zweimal 100 % Alkohol, zweimal Xylol für jeweils 1 Minute) entwässert.

Nach dem Trocknen folgte die Einbettung mit Roti-Histokitt II.

2.2.11.6 Entwicklung eines Verkalkungs-Scores

Die Beurteilung der von-Kossa-Ergebnisse verlangte nach einem Score, mit welchem sich die verschiedenen Verkalkungsgrade quantifizieren lassen.

Hierfür wurden in von-Kossa-Färbung an acht Stellen pro Schnitt (jeweils ein Schnitt pro Region) der Verkalkungsgrad an Intima und Media getrennt bestimmt.

Für die Verkalkung der Intima konnten zur Bewertung 0-3 Punkte vergeben werden:

0 Punkte: keinerlei Verkalkung

1 Punkt: Mikroverkalkungen

2 Punkte: weniger als 50% der Intima sind betroffen

3 Punkte: schwere Verkalkung, mehr als 50% der Intima sind betroffen.

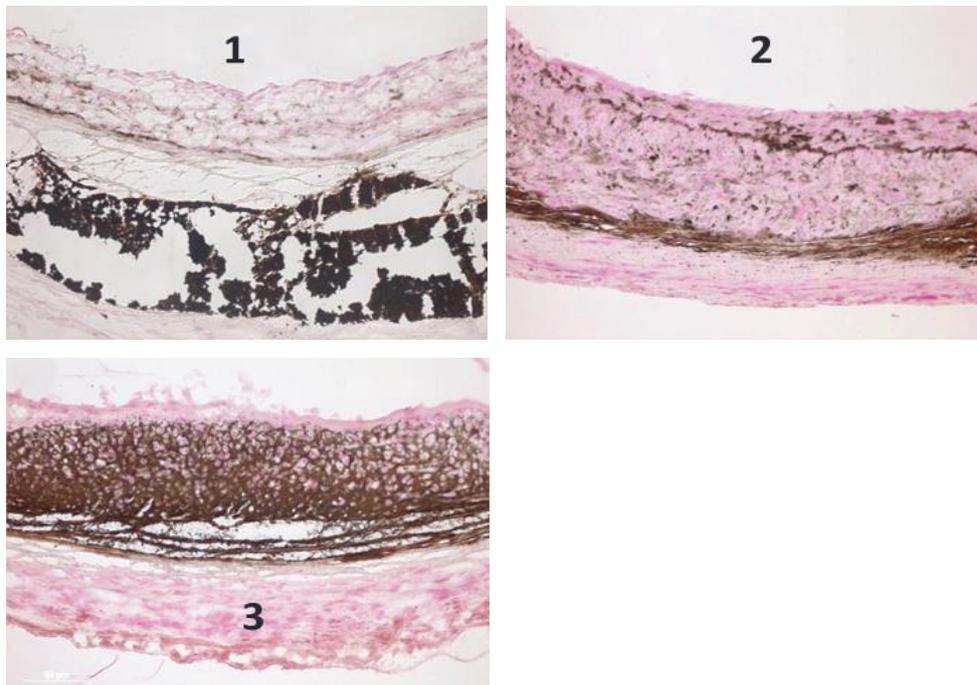


Abb. 7: Einteilung der Intima-Verkalkung (1-3 Punkte)

Für die Mediaverkalkung standen 0-5 Punkte zur Verfügung:

0 Punkte: keinerlei Verkalkung

1 Punkt: Mikroverkalkungen

2 Punkte: Makroverkalkung, <25% der Media sind betroffen

3 Punkte: Makroverkalkung, 25%-50% der Media sind betroffen

4 Punkte: Makroverkalkung, 50%-75% der Media sind betroffen

5 Punkte: Makroverkalkung, >75% der Media sind betroffen

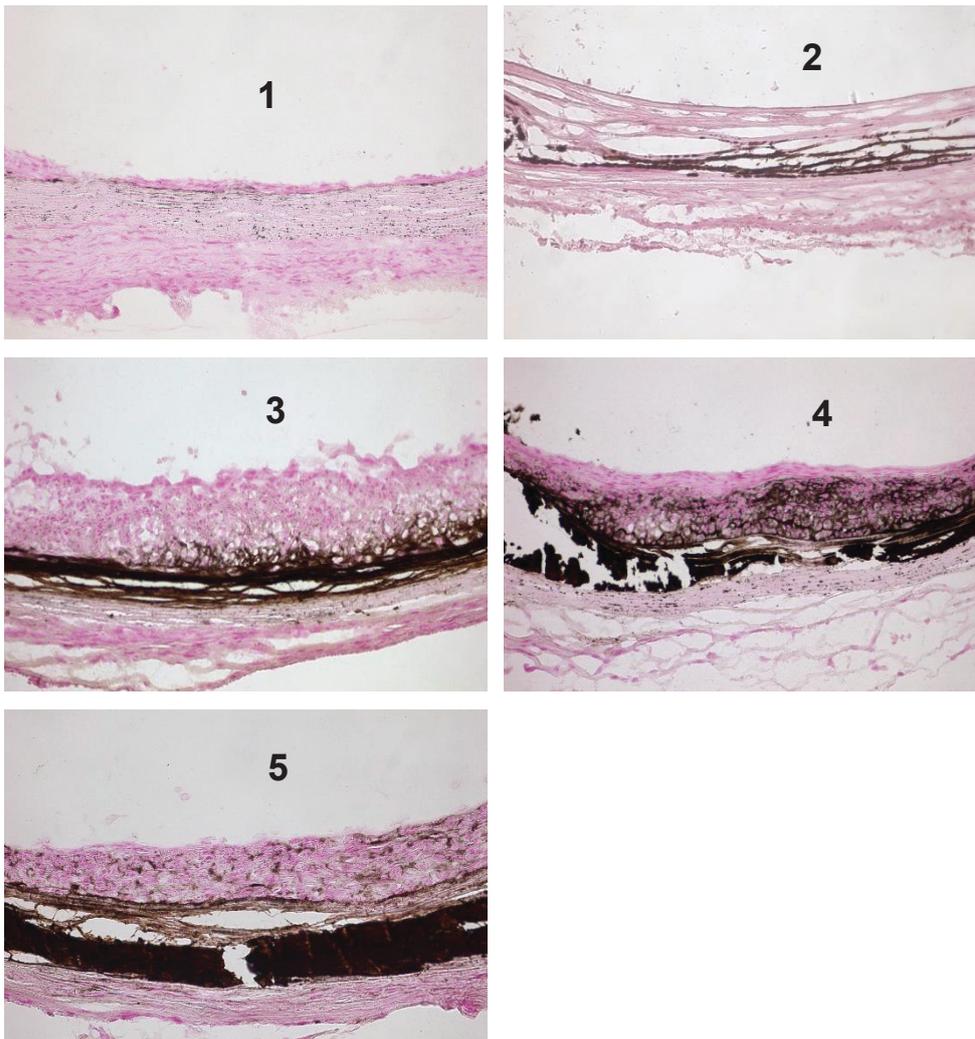


Abb. 8: Einteilung der Media-Verkalkung (1-5 Punkte)

So ergaben sich maximal erreichbare 24 Punkten für die Intima und 40 Punkten für die Media pro Region.

Getrennt nach Intima und Media wurden die von-Kossa-Score-Werte beider Gruppen nach 4 und 12 Wochen *in vivo* statistisch miteinander verglichen.

2.2.11.7 In-situ-Enzymographie

Zum Nachweis von möglicherweise vorhandener Enzymaktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMP) wurde eine in-situ-Enzymographie auf den Kryoschnitten durchgeführt.

Als erstes wurde hierfür eine Tris-Pufferlösung angesetzt. Diese enthielt 50 mM TRIS-HCl mit pH 7,5, 10 mM CaCl₂- Dihydrat, 150 mM NaCl sowie 5% Triton-X-100.

Schließlich wurde die Arbeitslösung vorbereitet. Sie bestand aus 1:100 verdünnter DQ-Gelatine in der Pufferlösung. Außerdem entstanden zwei Negativkontrollen: einmal 0,5 M EDTA (Titriplex II) in Gelatine-Puffer-Lösung und einmal nur reine Pufferlösung ohne Gelatine.

Nun konnte lichtsparend die Arbeitslösung auf die Präparate gegeben werden. Hierbei wurden etwa 300 µl pro Objektträger verwendet. Die Gewebeschnitte wurden dann in einer Feuchtkammer bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit PBS zunächst gründlich abgespült und anschließend in Küvetten dreimal zwei Minuten lang in PBS gewaschen.

Im Anschluss folgte die Eindeckung mit Vectashield DAPI und Nagellack.

2.2.11.8 Quantifizierung der MMP-Aktivität

Zur Quantifizierung der MMP-Aktivität in den gefärbten Präparaten wurde das Programm ImageJ verwendet. Hierfür wurden von jedem Schnitt jeweils an Stelle A1 sechs Bilder mit gleichen Belichtungseinstellungen (1 Sekunde) aufgenommen.

In ImageJ wurde bei diesen Bildern zunächst die Aorta mit dem Freihand-Tool umfahren und schließlich innerhalb dieses Feldes die mittleren Grauwerte sowie die Fläche berechnet. Aus den sechs Werten pro Gewebeschnitt wurde ein Mittelwert gebildet und die Werte der einzelnen Tiere miteinander verglichen.

2.2.11.9 Immunhistologie

Weiterhin folgten verschiedene Immunfluoreszenz-Färbungen, um die Zellen besser qualifizieren zu können.

Für die Immunhistologie wurden die Gefrierschnitte zunächst für 10 Minuten bei -20 °C in Aceton fixiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal 5 Minuten lang in PBS gewaschen und für weitere 5 Minuten in 0,1 % Triton-X-100 in PBS inkubiert. Hierauf folgte eine weitere Waschung in PBS für dreimal 5 Minuten.

Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in 1 % BSA + 0,1 % Tween 20 in PBS bei Raumtemperatur für eine Stunde. Als Primärantikörper wurden rabbit anti-von-Willebrand-Faktor (1:300), mouse anti-Smooth-Muscle-Actin (1:300), rabbit anti-Syndecan 3 (1:100) sowie rabbit anti-CD3 (1:200) und mouse anti-CD68 (1:200) verwendet.

Die Negativkontrollen wurden lediglich mit 1 % BSA + 0,1 % Tween 20 in PBS inkubiert.

Nachdem die Schnitte erneut dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen wurden, wurde der jeweilige Sekundärantikörper in 1 % BSA + 0,1 % Tween 20 in PBS bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Verwendet wurden hierbei: goat anti-rabbit-Alexa-Fluor-488 (1:200), goat anti-rabbit-Alexa-Fluor-546 (1:200), goat anti-mouse-Alexa-Fluor-488 (1:200), goat anti-mouse-Alexa-Fluor-546 (1:200).

Es folgten in Dunkelheit die letzten Waschschriffe in PBS dreimal für 5 Minuten, sowie 1 Minute in Aqua bidest und 5 Minuten in 100 % Ethanol.

Zur Eindeckung wurden Vectashield DAPI und Nagellack verwendet.

2.2.12 Quantitative Real-Time-PCR

2.2.12.1 RNA-Isolation

Als Erstes musste die benötigte RNA aus den tiefgefrorenen Konduits isoliert werden.

Hierfür wurden selbige zunächst mithilfe eines Mörsers zerkleinert und anschließend in Eppendorf-Röhrchen mit 1 ml Trizol überführt und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Zur Gewebe-Trizol-Lösung wurde dann 0,2 ml Chlorform (je 1 ml Trizol) gegeben, das Gemisch wurde geschüttelt bis keine Phasen mehr erkennbar waren und anschließend 15 Minuten bei 11000 rpm bei 6 °C zentrifugiert.

Die obere wässrige Chloroform-Phase mit den gelösten Nucleinsäuren wurde im Anschluss abpipettiert und in ein frisches Eppendorf Röhrchen überführt. Zum Präzipitieren der RNA wurden zur wässrigen Phase 0,5 ml Isopropanol (pro 1 ml verwendetem Trizol) gegeben und die Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Erst dann wurde bei 11.000 rpm bei 6 °C 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das entstandene Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol (pro 1 ml eingesetztem Trizol) von allen Seiten gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation bei 8.600 rpm bei 6 °C für 5 Minuten, wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Die weitere Aufreinigung der RNA, die DNase-Behandlung und das Entfernen des Trizols erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kit #74104 von QIAGEN nach Herstellerangaben.

Die Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels Spektrometer durch Absorptionmessungen bei 230, 260 und 280 nm, um eventuelle Verunreinigungen durch Proteine, andere organische Stoffe oder störende Partikel nachzuweisen. Ebenso lassen sich durch unterschiedliche Absorptionsmaxima einzelsträngige von doppelsträngigen Molekülen unterscheiden. Zusätzlich wurde das Agilent RNA 6000 Nano verwendet, um die RNA-Degradation zu qualifizieren.

2.2.12.2 Reverse Transkription

Als nächstes musste nun die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden, da die später in der PCR verwendeten Polymerasen DNA-abhängig und nicht in der Lage sind, RNA zu amplifizieren.

Zur Transkription wird das Enzym Reverse Transkriptase und ein Oligo-dT-Primer, welcher komplementär zum Poly-A-Schwanz der RNA ist, benötigt. Die Reverse Transkriptase besitzt drei unterschiedliche Aktivitäten: zunächst wird mittels der RNA-abhängigen DNA-Polymerase ein cDNA-Strang synthetisiert, der mit dem ursprünglichen RNA-Strang hybridisiert ist. Dann wird durch eine RNase der RNA-Anteil abgebaut und anschließend durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase der komplementäre DNA-Strang zum bereits vorhandenen cDNA-Einzelstrang synthetisiert.

Unsere cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben mithilfe des Qiagen QuantiTect-Reverse-Transcription-Kits.

2.2.12.3 Real-Time-PCR

In der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können speziell definierte Sequenzen der synthetisierten DNA vervielfältigt werden; hierfür werden spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer benötigt (Auflistung siehe Tab.1). In jedem Amplifikationszyklus finden die Schritte Denaturierung, Anlagerung und Elongation statt. Die Anzahl der gebildeten DNA-Moleküle kann dabei nach jedem Zyklus mithilfe von interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffen (hier: SYBR-Green) abgelesen werden, da der Fluoreszenzwert proportional zur DNA-Menge ansteigt.

Zur Vorbereitung der Real-Time-PCR wurde zunächst eine 100 μ M Stock Solution der Primer hergestellt. Hierfür wurden die Primer in nukleasefreiem Wasser gelöst und 10 μ l Aliquotes hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Für die Herstellung der Working-Solution wurde die Stock-Solution im Verhältnis 1:10 erneut mit nukleasefreiem Wasser verdünnt.

Für die Durchführung der Real-Time-PCR wurden auf eine 96well-Platte für jeden Primer jeweils Duplikat-Proben pipettiert. Jedes well enthielt: 10 μ l SYBR-Green, 0,3 μ l Forward-Primer, 0,3 μ l Reverse-Primer, 7,4 μ l H₂O und 2 μ l cDNA. Zusätzlich wurde eine Leerprobe pipettiert, die lediglich H₂O und SYBR-Green enthielt.

Als Referenzgen wurde β -Actin verwendet.

Die anschließende PCR erfolgte nach folgender *run method*:

2 min	50 °C	1 x
2 min	95 °C	1 x
15 s	95 °C	40 x
30 s	60 °C	40 x
15 s	95 °C	1 x
1 min	60 °C	1 x
15 s	95 °C	1 x
15 s	60 °C	1 x

2.2.12.4 Relative Quantifizierung

Um einen Vergleich der Expression verschiedener Zielgene zwischen Statin- und Kontrollgruppe zu ermöglichen, erfolgte die Quantifizierung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Der Ct-Wert zeigt denjenigen Amplifikationszyklus an, ab dem die Hintergrundfluoreszenz exponentiell überschritten wird.

Zunächst wurde in beiden Gruppen der Ct-Wert eines Zielgens auf den Ct-Wert des Referenzgens bezogen und so der ΔCt -Wert ermittelt. Als Referenzgen wurde β -Actin gewählt.

Anschließend wurde der so berechnete ΔCt -Wert eines Zielgens in der Therapiegruppe auf den gemittelten ΔCt -Wert desselben Gens in der Kontrollgruppe bezogen und somit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert bestimmt.

Mithilfe der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ wird am Ende die relative Expression der einzelnen Zielgene in der Therapiegruppe bestimmt.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (Referenzgen)}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Therapiegruppe)} - \text{mean } \Delta\text{Ct (Kontrollgruppe)}$$

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

2.2.13 Calcium-Assay

Zur Messung der Calcium-Konzentration wurden die explantierten Aortenkonduits (n=3 pro Gruppe) in PBS-Lösung mit 0,16 mg/ml Heparin gereinigt, getrocknet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das gefrorene Gewebe wurde mit einem Mörser zerkleinert und in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,0 mit 0,16 mg/ml Heparin gelöst. Anschließend wurde die Suspension 15 Minuten bei 4 °C bei 11.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und bei -80 °C gelagert. Für die Durchführung des Assays wurden die Proben dann zusammen mit zehn vorbereiteten Calciumstandards in Konzentrationen von 0 bis 20 mg/dl auf eine 96well-Platte pipettiert, jeweils 10 µl pro well.

Nach Kit-Vorgaben wurde das Working-Detector-Reagent vorbereitet und in jedes well 100 µl Reagenz pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 570-590 nm gemessen.

Zur Auswertung wurde die errechnete Kurve der Calciumstandards verwendet.

2.2.14 Blutserum-Analysen

Zur Bestimmung verschiedener Laborparameter wurde den Tieren während der Aorten-Insuffizienz-Operation (Tag -14), während der Implantations-Operation (Tag 0), sowie während der Explantations-Operation (Tag 28 bzw. Tag 84) über eine Kanüle bzw. über den liegenden zentralvenösen oder zervikalarteriellen Katheter 1 ml Vollblut entnommen.

Die Proben wurden daraufhin bei 8000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verarbeitung abpipettiert.

Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Das entstandene Serum wurde bei -80°C eingefroren und dem Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik am Universitätsklinikums Düsseldorf zur Analyse übergeben.

Es wurden folgende Laborparameter erhoben: Calcium, Phosphat, Harnstoff, Creatinin, Glucose, Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und Triglyceride.

2.2.15 Statistik

Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Für direkte Gruppenvergleiche zu einem Zeitpunkt wurden entweder ein- oder zweiseitige T-Tests (mit oder ohne Welch-Korrektur) oder Mann-Whitney-U-Tests (Kolmogorov-Smirnov-Test, F-Test) durchgeführt. Für Gruppenvergleiche zu verschiedenen Zeitpunkten wurden *two-way*-ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Tests durchgeführt. Von einer Signifikanz wurde ausgegangen, wenn die p-Werte unter 0,05 lagen.

Die Datenanalyse wurde mit GraphPad Prism V5.04 durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Erfolg der Dezellularisierung

In einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (siehe Abb. 9) stellte sich ein nahezu zellfreies Konduit mit intakter Struktur der extrazellulären Matrix dar. Die Fasern lagen parallel und zeigten keine Anzeichen einer durch das Dezellularisierungsverfahren abgelaufenen Schädigung.

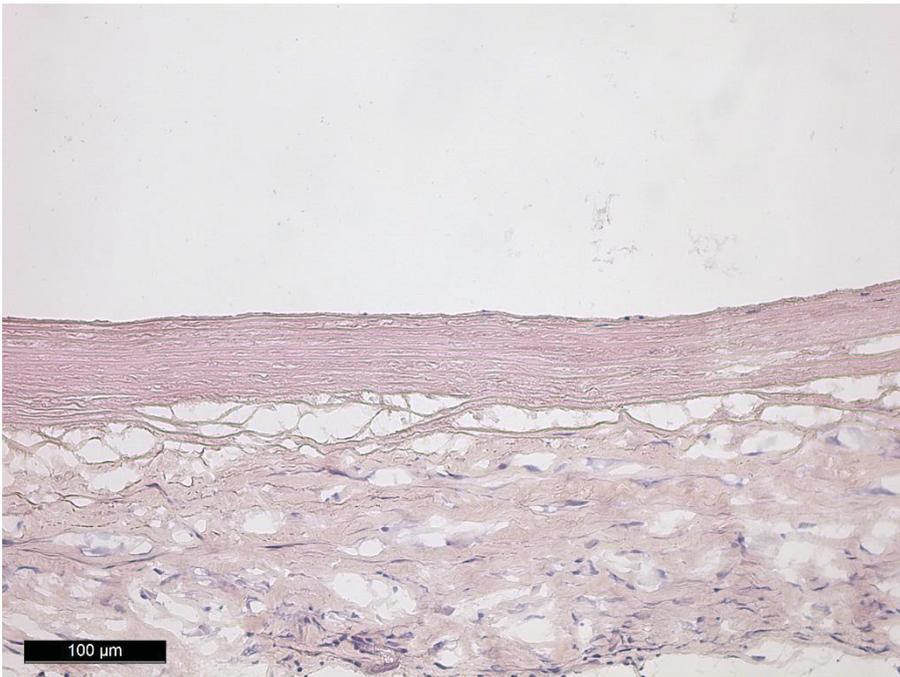


Abb. 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Dezellularisierung

3.2 Erfolg der Statingabe

Selbstverständlich stellt sich auch die Frage, ob das mit dem Futter zugeführte Statin überhaupt im Kreislauf der Versuchstiere ankommt, um dort einen Einfluss auf die Verkalkung der Implantate nehmen zu können.

Dies haben wir anhand der bereits bekannten Wirkung des Statins - die Senkung der Blutfettwerte - ermittelt. Mit der Annahme, dass die Tiere, die Statin mit dem Futter erhielten, ein erniedrigtes Gesamt-Cholesterin zeigen müssten, wurden Serumproben zur Analyse in das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin in Düsseldorf gegeben.

Bei der Auswertung zeigte sich in der Tat eine signifikant erniedrigte Konzentration des Gesamt-Cholesterins im Blut der Statingruppe (S) im Vergleich zur Kontrollgruppe (D) nach 12 Wochen Statingabe.

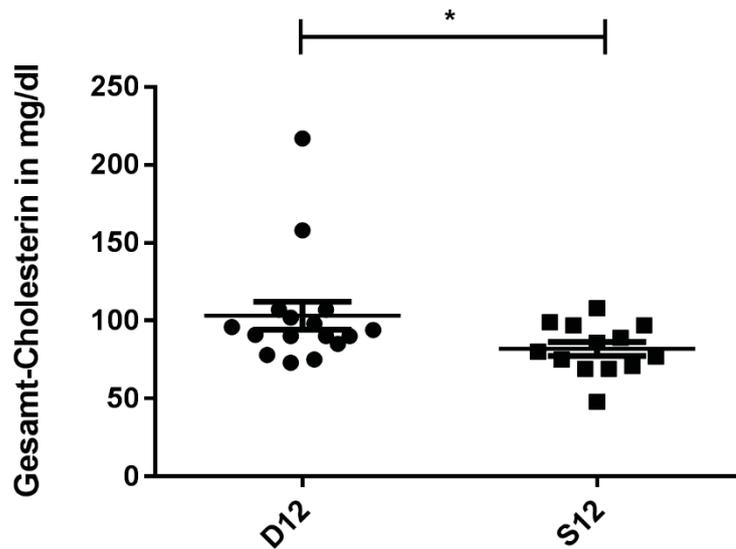


Abb. 10: Gesamt-Cholesterin-Konzentration im Serum beider Gruppen nach 12 Wochen

So lag in der Kontrollgruppe der Mittelwert des Gesamt-Cholesterin bei 107.2 ± 14.40 mg/dl gegenüber 80.3 ± 5.57 mg/dl bei den Tieren, die Statin erhielten ($p=0.049$).

So ist davon auszugehen, dass das zugesetzte Statin auch in den Organismus gelangt ist, da es hier seine erwünschte Wirkung auf die Blutfette zeigt.

3.3 Strukturelle Veränderung der Konduits

3.3.1 Nach 4 Wochen

Betrachtete man die explantierten Konduits zunächst in HE-Färbung und Movat-Färbung 4 Wochen nach Implantation, so erkannte man eine zellfreie Media und eine vielschichtige, neu entstandene Adventitia (siehe Abb. 11-14). Durch die Dezellularisierung war das Endothel vor Implantation vollständig verschwunden gewesen. Wie in 3.1 für den Zustand vor Implantation berichtet, zeigte sich bei einigen Konduits auch nach 4 Wochen *in vivo* keine Kernanfärbung über DAPI im Bereich des ehemaligen Endothels.

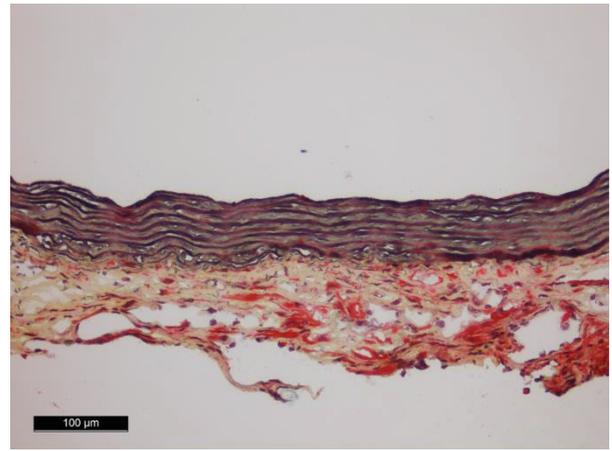
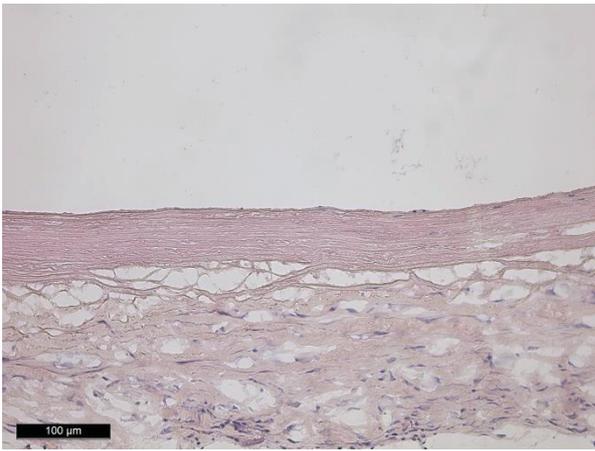


Abb. 11: Zellfreie Media und fehlende Intima in der Kontrollgruppe nach 4 Wochen (HE-Färbung)

Abb. 12: Zellfreie Media und fehlende Intima in der Kontrollgruppe nach 4 Wochen (Movat-Pentachrom-Färbung)

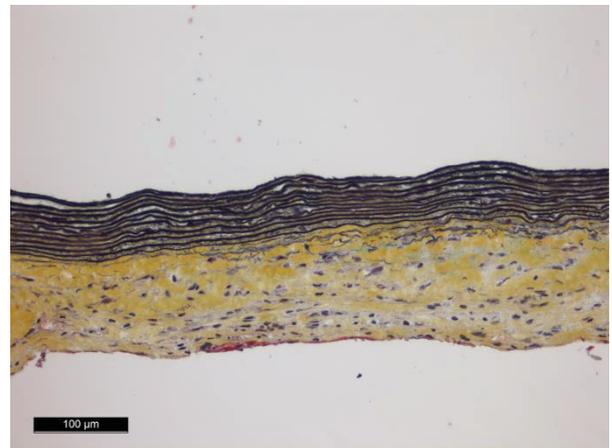


Abb. 13: Zellfreie Media und fehlende Intima in der Statingruppe nach 4 Wochen (HE-Färbung)

Abb. 14: Zellfreie Media und fehlende Intima in der Statingruppe nach 4 Wochen (Movat-Pentachrom-Färbung)

3.3.2 Nach 12 Wochen

Nach dem Bild, das sich uns nach vierwöchiger Implantation gezeigt hatte, stellte sich nun die Frage, wie sich die Besiedlung der Konduits nach längerer Implantationszeit verhalten würde.

Es zeigte sich, wie in Abb. 15-18 dargestellt, dass sich ein zellreiches und vielschichtiges Neuendothel in beiden Gruppen gebildet hatte.

Ebenso war zu erkennen, dass die Struktur der Media an Integrität verloren hatte. Die Fasern lagen zum Teil nicht mehr parallel, sondern wirkten aufgelockert und partiell deformiert (siehe Abb. 15-18).

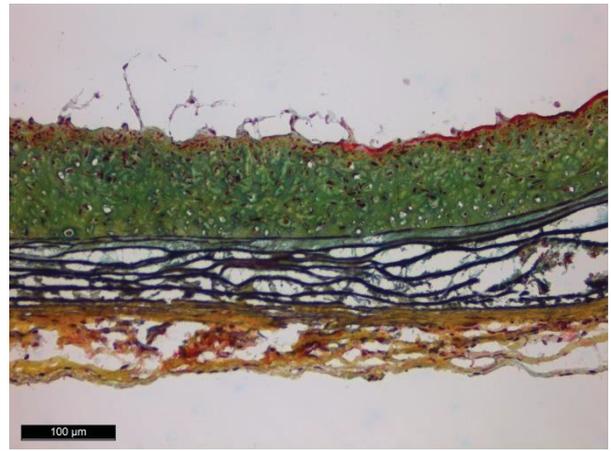
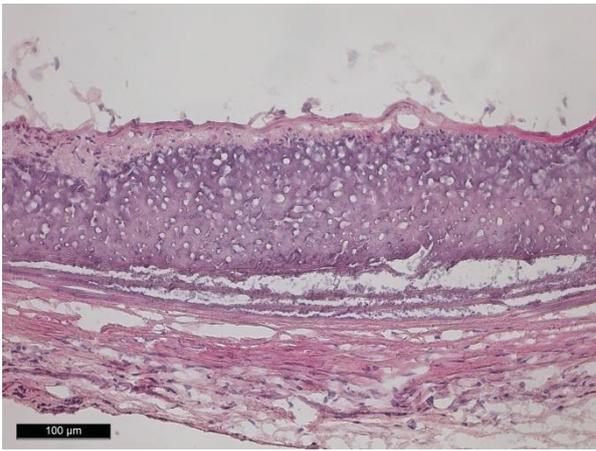


Abb. 15: Intimahyperplasie in der Kontrollgruppe nach 12 Wochen (HE-Färbung)

Abb. 16: Intimahyperplasie in der Kontrollgruppe nach 12 Wochen Movat-Pentachrom-Färbung)

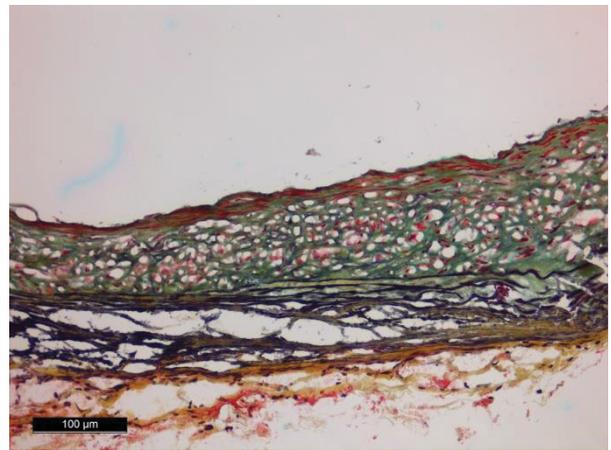
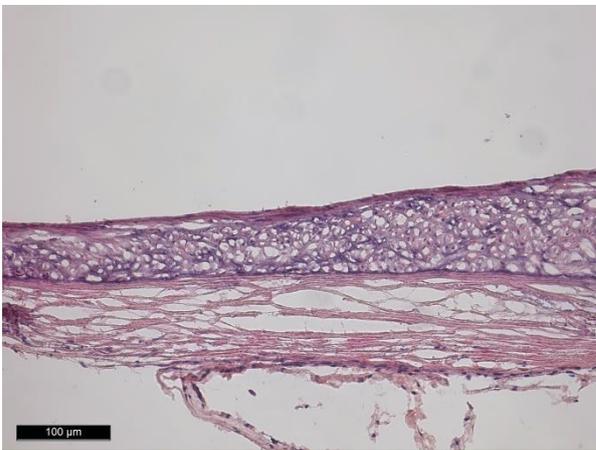


Abb. 17: Intimahyperplasie in der Statingruppe nach 12 Wochen (HE-Färbung)

Abb. 18: Intimahyperplasie nach 12 Wochen in der Statingruppe (Movat-Pentachrom-Färbung)

3.3.3 Quantifizierung der Intimahyperplasie

Wie auf oben gezeigten Bildern zu sehen, war rein qualitativ ein deutlicher Unterschied in der Entwicklung der Intimaschicht nach 4 und nach 12 Wochen zu beobachten. Wo nach 4 Wochen noch keine Abschlusschicht zu erkennen war, zeigte sich nach 12 Wochen in beiden Gruppen eine mehrschichtige Neointima.

Ein hierfür entwickelter Intima-Media-Index sollte die vorhandenen Unterschiede nach 4 und nach 12 Wochen nun auch quantifizieren. Zur Bestimmung des Index wurde die durchschnittliche Intimadicke eines Konduits gegen dessen durchschnittliche Mediadicke geteilt (siehe auch 2.2.11.3).

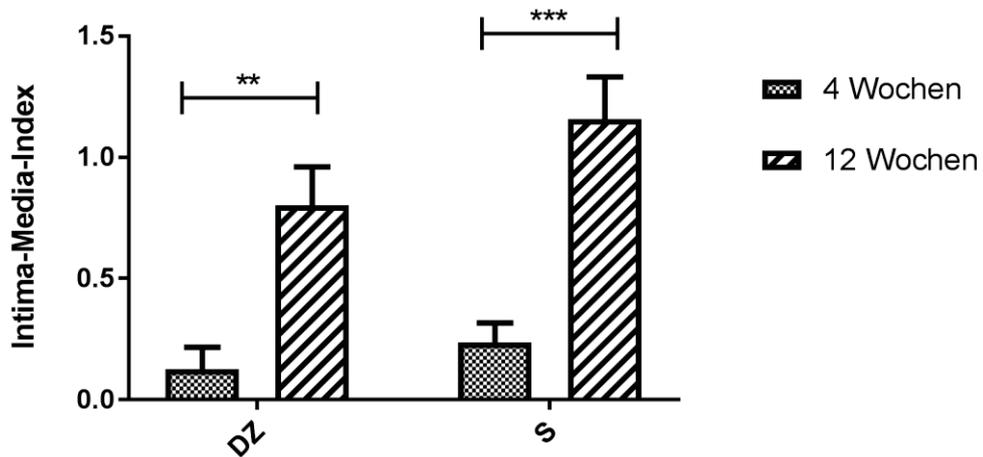


Abb. 19: Intima-Media-Index im Vergleich 4 Wochen zu 12 Wochen

Wie schon in den Abbildungen 11-18 ersichtlich nimmt die Dicke der Intima und damit auch der Intima-Media-Index in beiden Gruppen von 4 Wochen nach 12 Wochen zu. In beiden Gruppen ist der zeitliche Zuwachs signifikant: für die Kontrollgruppe (DZ) $p < 0,01$ und für die Statingruppe (S) $p < 0,001$.

Vergleicht man nun die Zunahme der Neointima zwischen den beiden Gruppen, lässt sich sowohl nach 4 Wochen als auch nach 12 Wochen kein signifikanter Unterschied feststellen.

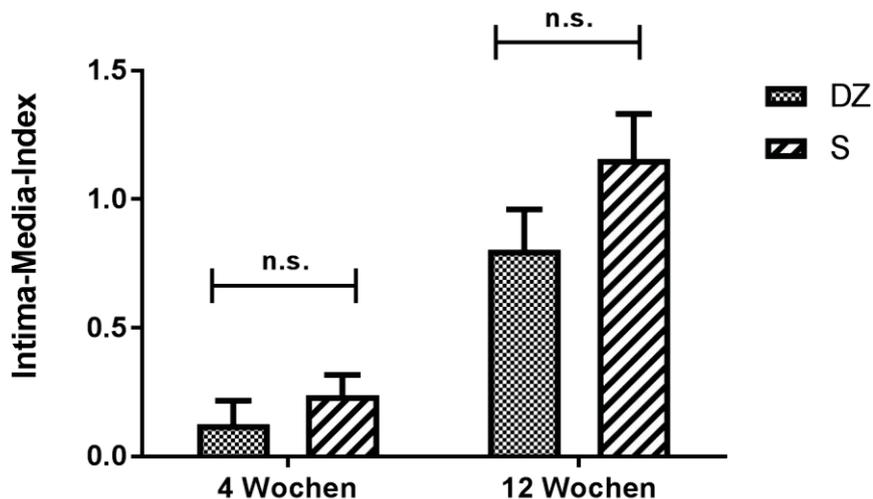


Abb. 20: Intima-Media-Index im Vergleich Kontroll- und Statingruppe

Auch der prozentuale Anteil der luminalen Rebesiedlung nahm von 4 nach 12 Wochen zu. Nach 4 Wochen waren durchschnittlich $40,27 \pm 7,48$ % der luminalen Oberfläche in der Statingruppe und $47,59 \pm 7,17$ % der Oberfläche in der Kontrollgruppe neubesiedelt worden. Nach 12 Wochen war in beiden Gruppe nahezu die gesamte luminale Fläche rebesiedelt

worden. In der Statingruppe konnte einer Oberflächenbesiedelung von $98,10 \pm 1,10 \%$ erreicht werden und in der Kontrollgruppe $84,03 \pm 4,53 \%$. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt bewiesen werden.

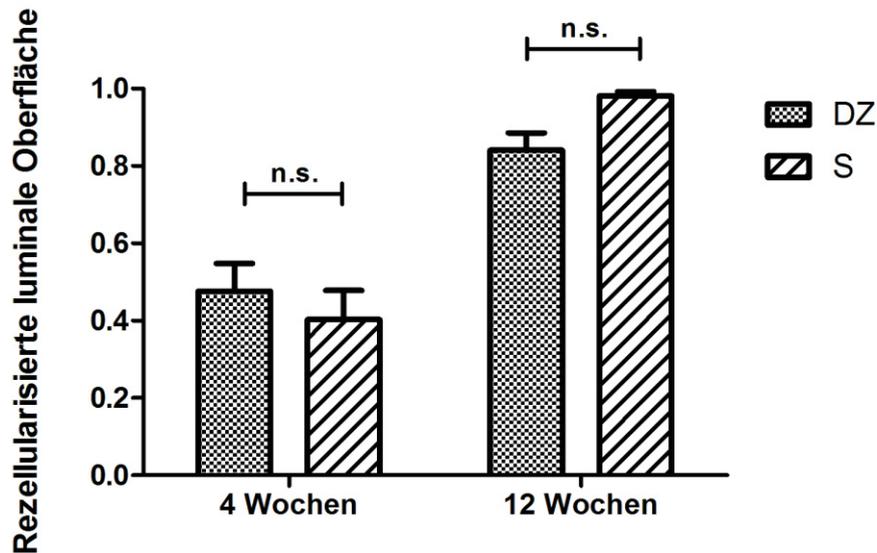


Abb. 21: Anteil der luminalen Rebesiedlung nach 4 und 12 Wochen

3.3.4 Immunhistologische Qualifizierung

Nachdem nun der Zuwachs an Neointima in beiden Gruppen quantifiziert worden war, stellte sich natürlich auch die Frage, um welche Art von Zellen es sich handeln könnte. Daher führten wir verschiedene immunhistologische Untersuchungen durch, die uns darauf Antworten geben sollten.

Als Antikörper zur Bestimmung der Zelleigenschaften wurden α SMA und vWF verwendet.

Eine Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- α SMA (in den Abbildungen rot-fluoreszent dargestellt) zeigte, dass dieses sich hauptsächlich in Zellen der hyperplastischen Intimaregion positiv anfärben lies. Dieser Effekt war unabhängig vom Zeitpunkt - sofern Intima vorhanden war - und auch zwischen den Gruppen war kein Unterschied zu erkennen.

Eine in Kombination mit Anti- α SMA durchgeführte Färbung mit Anti-vWF (in den Abbildungen grün-fluoreszent dargestellt) ließ eine positive Abschlusschicht luminal der Neointima erkennen. Auch hier gab es zwischen den Gruppen keinen Unterschied, jedoch war diese Zellschicht nur in Präparaten mit bereits entstandener Intima zu erkennen (vgl. Abb. 22 ohne α SMA-positive Intima und ohne vWF-positive Abschlusschicht)

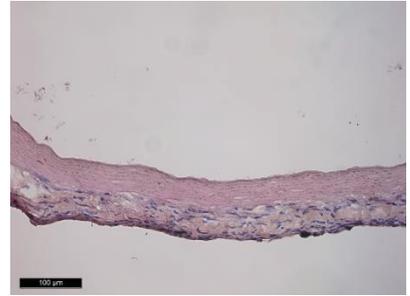
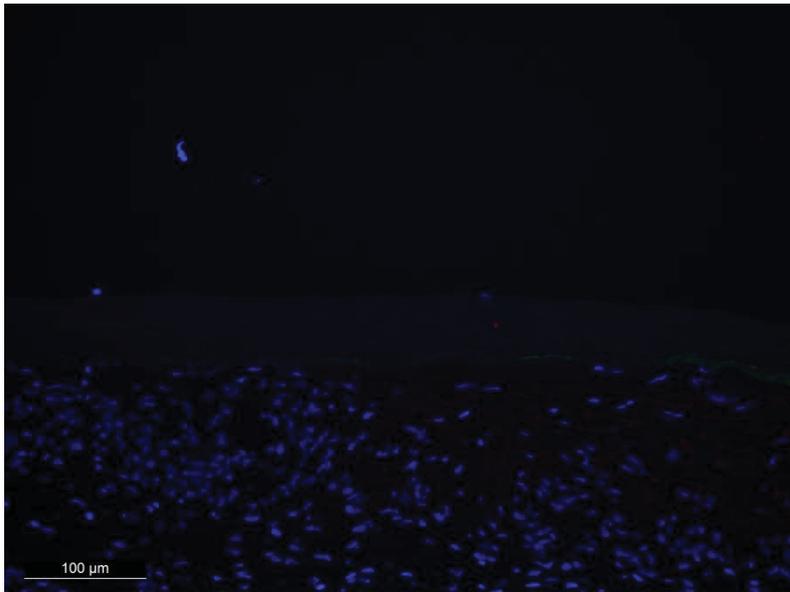


Abb. 22: Immunhistologische Färbung mit DAPI-Kernfärbung, anti- α SMA und anti-vWF in der Kontrollgruppe nach 4 Wochen

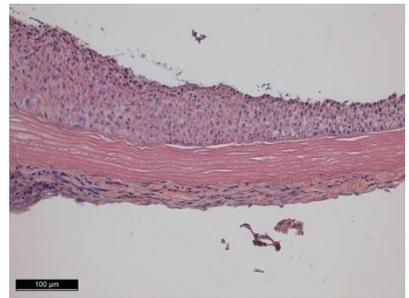
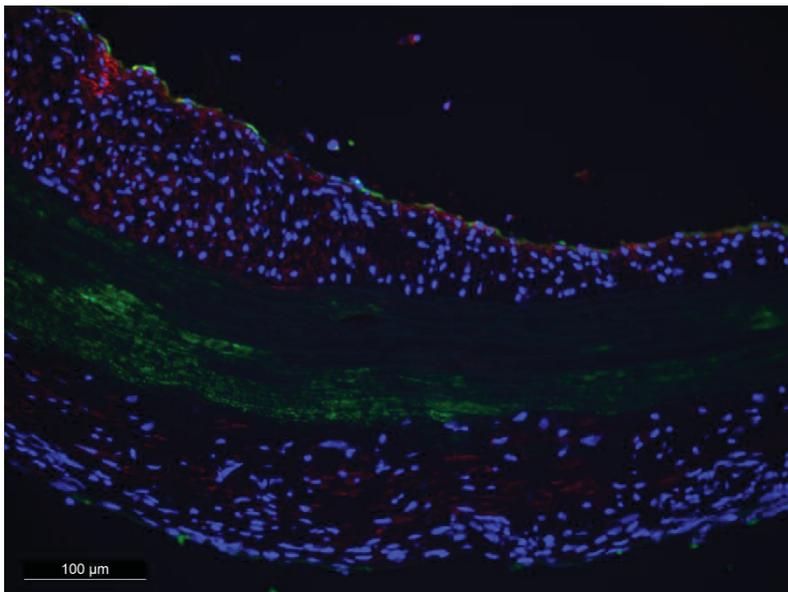


Abb. 23: Immunhistologische Färbung mit DAPI-Kernfärbung, anti- α SMA und anti-vWF in der Statingruppe nach 4 Wochen

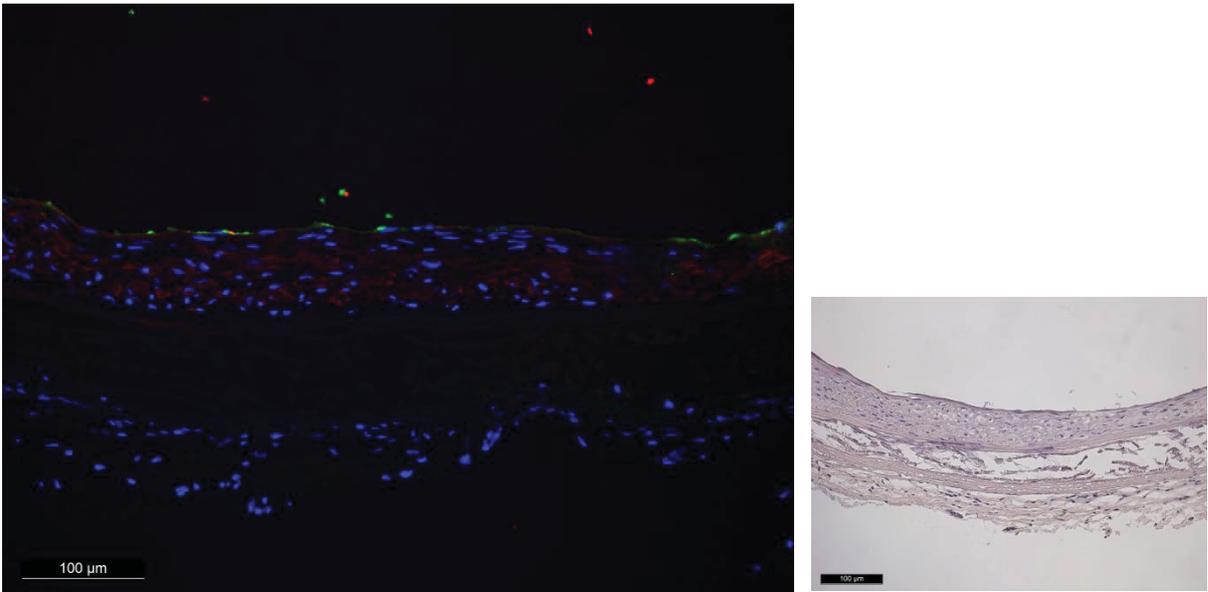


Abb. 24: Immunhistologische Färbung mit DAPI-Kernfärbung, anti- α SMA und anti-vWF in der Kontrollgruppe nach 12 Wochen

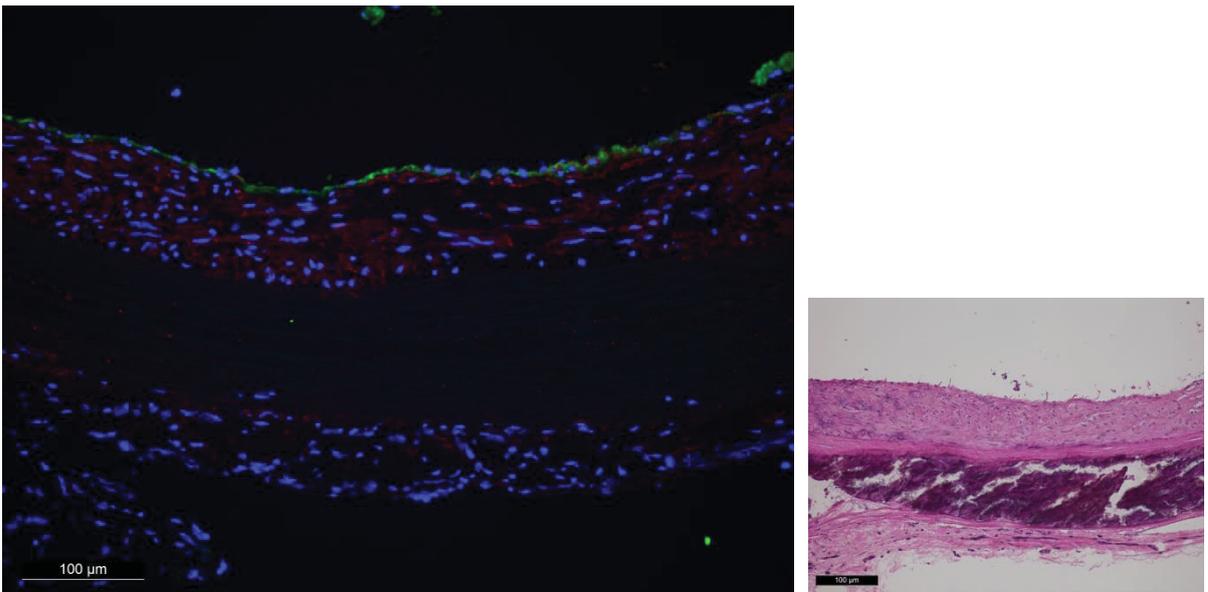


Abb. 25: Immunhistologische Färbung mit DAPI-Kernfärbung, anti- α SMA und anti-vWF in der Statingruppe nach 12 Wochen

3.3.5 Qualifizierung mittels Real-Time-PCR

Mithilfe einer Genexpressionsanalyse sollten die Gruppen hinsichtlich Entzündung, Prothrombogenität und Zellaktivierung untersucht werden.

Als Entzündungsparameter und Marker für Prothrombogenität wurde die Expression von $\text{TNF}\alpha$, RAGE, IL1b, IL6, CD39 und CD73 in beiden Gruppen nach 12 Wochen analysiert.

Die Tiere der Statingruppe zeigten eine ähnliche relative Expression von $TNF\alpha$, nämlich $1,120 \pm 0,155$ im Vergleich zu $1,034 \pm 0,130$ bei der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 26 links)

Die relative Expression von RAGE lag bei den Kontrolltieren bei $1,349 \pm 0,595$ und bei den Tieren, die Simvastatin erhielten lediglich bei $1,158 \pm 0,272$ (vgl. Abb. 26 rechts)

Auch die Expressionsanalyse der CD-Rezeptoren zeigte eine verminderte Expression von Entzündungsparametern in der Statingruppe. Sie lag bei $0,953 \pm 0,111$ gegenüber $1,041 \pm 0,145$ in der Kontrollgruppe für CD39, sowie bei $1,033 \pm 0,139$ in der Statingruppe und $1,164 \pm 0,353$ bei der Kontrolle für CD73 (vgl. Abb. 27)

Verglich man die Genexpressionen beider Interleukine, so war deren relative Expression in der Statingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe stark vermindert. Für IL-1b lag sie bei $0,639 \pm 0,114$ gegenüber $1,218 \pm 0,441$ und für IL-6 sogar bei $0,404 \pm 0,083$ gegenüber $1,130 \pm 0,264$ in der Kontrolle. Der Unterschied für IL-6 war signifikant mit $p=0,0305$ (vgl. Abb. 28)

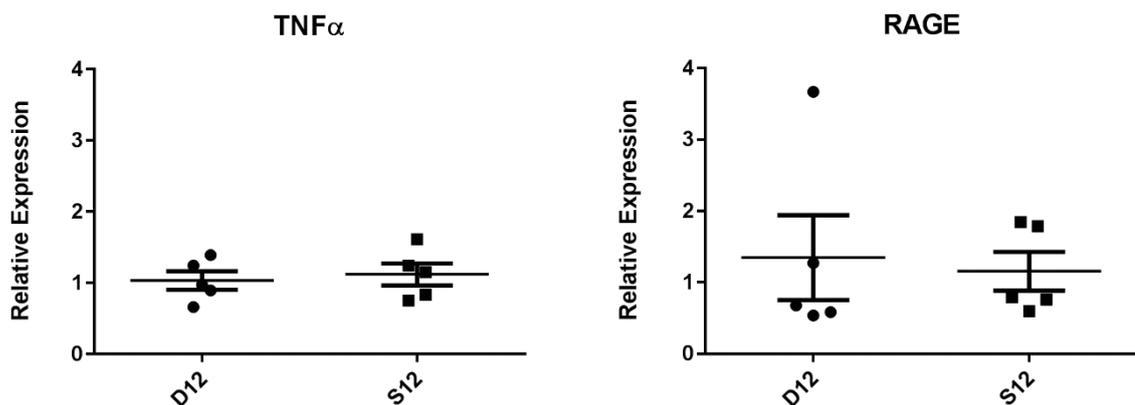


Abb. 26: Relative Expression von $TNF\alpha$ und RAGE in beiden Gruppen nach 12 Wochen

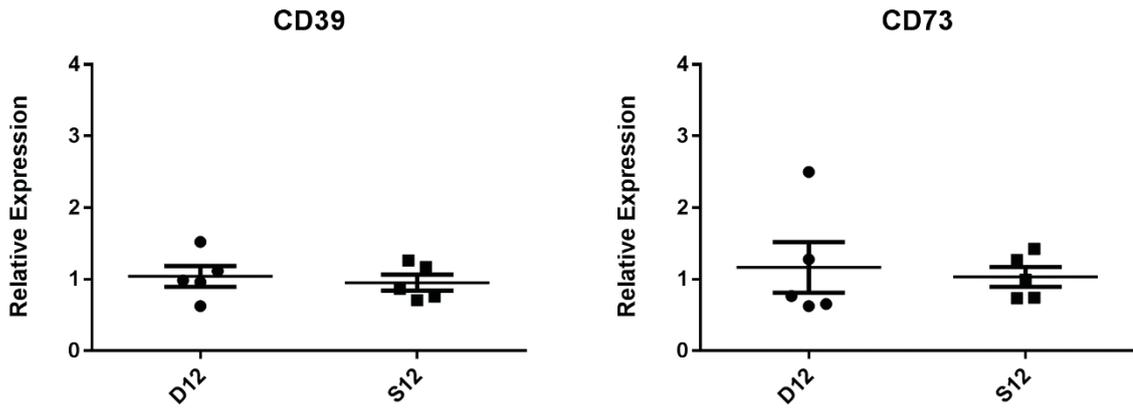


Abb. 27: Relative Expression von CD39 und CD73 in beiden Gruppen nach 12 Wochen

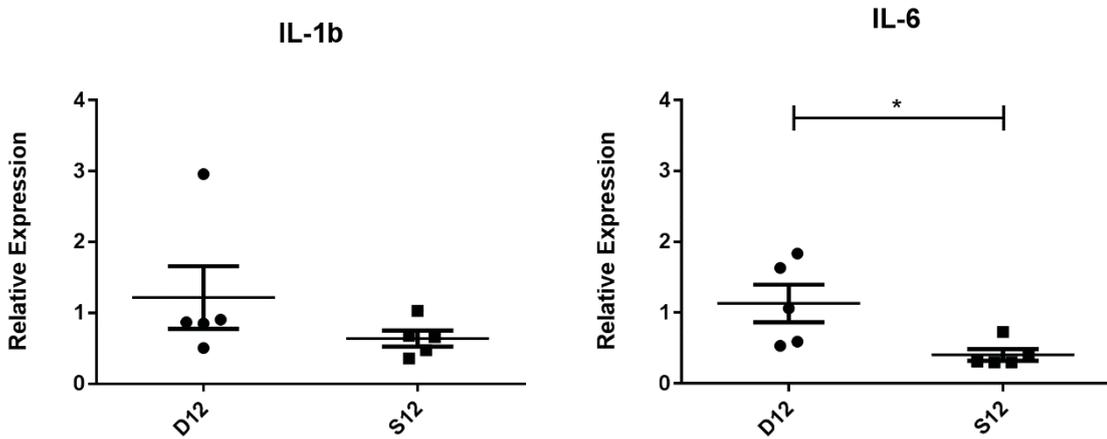


Abb. 28: Relative Expression von IL-1b und IL-6 in beiden Gruppen nach 12 Wochen

Schließlich wurde α -SMA als Marker der Zellaktivierung und -proliferation in beiden Gruppen nach 12 Wochen analysiert.

Hierbei zeigte sich für die Kontrollgruppe eine leicht erhöhte relative Expression von $1,180 \pm 0,343$ gegenüber der Statingruppe mit $1,012 \pm 0,169$. Dies war jedoch nicht signifikant (vgl. Abb. 29)

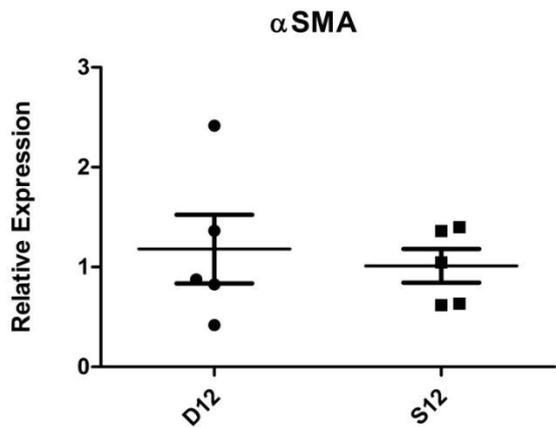


Abb. 29: Relative Expression von α SMA bei beiden Gruppen nach 12 Wochen

3.3.6 Qualifizierung mittels in-situ-Enzymographie

Über eine in-situ-Enzymographie wurde die Aktivität der Matrix-Metalloproteasen (MMP) in unseren Konduits nachgewiesen.

MMP sind Enzyme, die die Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. Sie bestehen aus einer Peptidase-Domäne sowie aus einer calciumbindenden Domäne, über welche sie aktiviert werden. MMP sind in der Lage extrazelluläre Matrix abzubauen und so beim Gewebeumbau zu helfen.

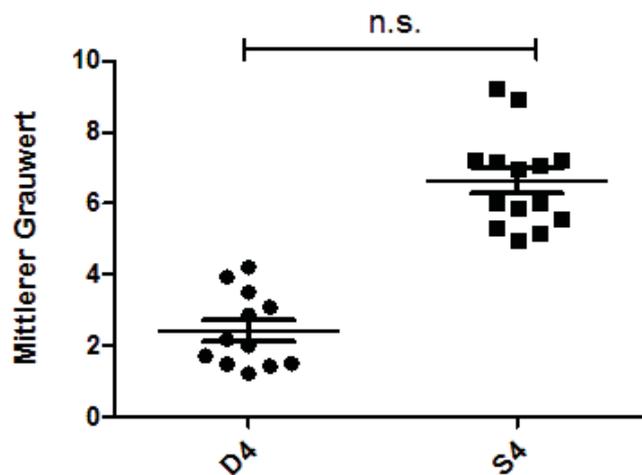


Abb. 30: MMP-Aktivität in beiden Gruppen nach 4 Wochen

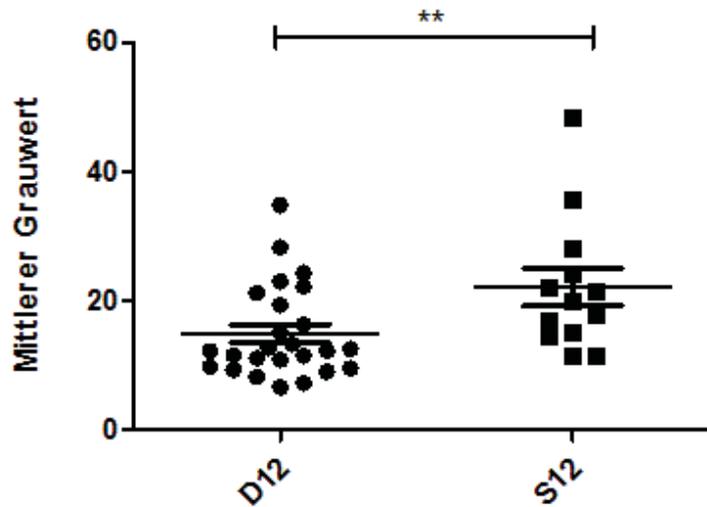


Abb. 31: MMP-Aktivität in beiden Gruppen nach 12 Wochen

Die Auswertung mithilfe von ImageJ zeigte zunächst deutlich, dass bei beiden Gruppen die MMP-Aktivität von 4 Wochen nach 12 Wochen signifikant ($p < 0,0001$) anstieg (vgl. Abb. 32/33 zu 34/35).

Nach 4 Wochen wies die Statingruppe einen mittleren Grauwert von $6,635 \pm 0,352$ gegenüber der Kontrolle mit $2,428 \pm 0,304$ auf. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (vgl. Abb. 30).

Nach 12 Wochen lagen die Tiere, die Statin erhielten, bereits bei einem mittleren Grauwert von $22,17 \pm 2,87$ und die Kontrolltiere bei einem Grauwert von $14,90 \pm 1,43$ ($p < 0,01$) (vgl. Abb. 31).

Die MMP-Aktivität zeigte sich anhand der ausgewerteten Bilder bei beiden Gruppen nach 4 Wochen vorrangig fluoreszent als einschichtige Neointima und in der Adventitia. Die Media war schwach bis gar nicht angefärbt (siehe Abb. 32 und 33).

Nach 12 Wochen war die Aktivität am stärksten im Bereich der kalzifizierten Media ausgeprägt, aber auch die einschichtige Anfärbung als Abschluss der Intima war hier vorhanden (siehe Abb. 34 und 35).

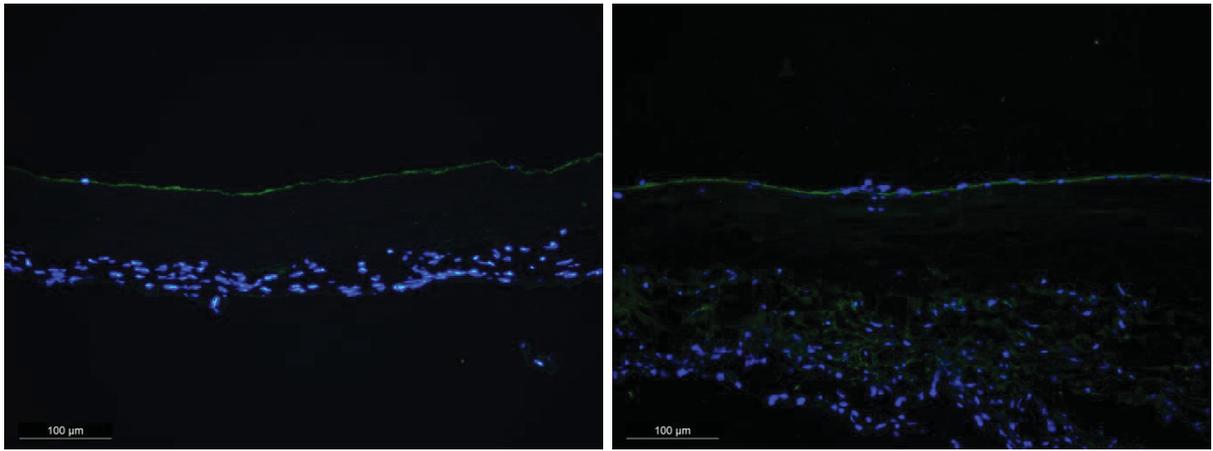


Abb. 32: MMP-Aktivität in der Kontrollgruppe nach 4 Wochen (in-situ-Enzymographie)

Abb. 33: MMP-Aktivität in der Statingruppe nach 4 Wochen (in-situ-Enzymographie)

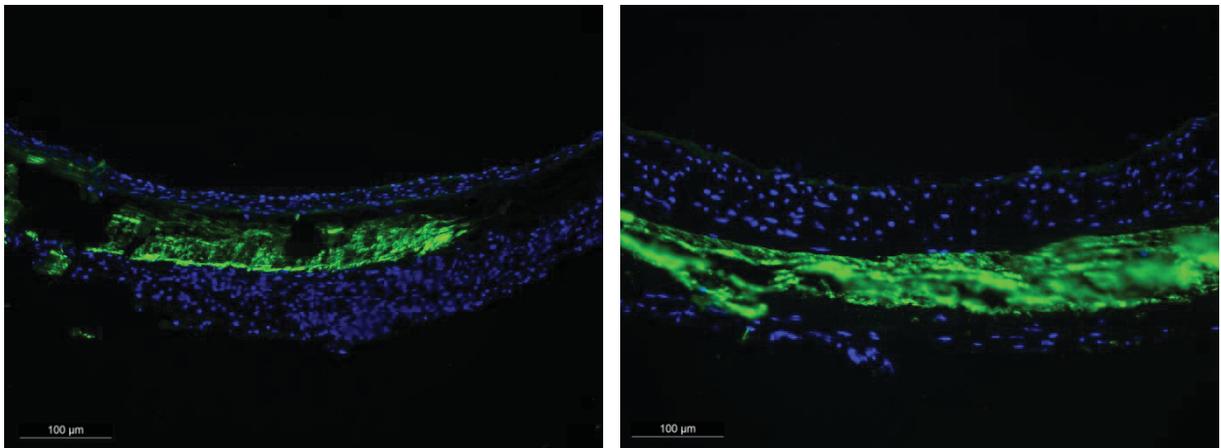


Abb. 34: MMP-Aktivität in der Kontrollgruppe nach 12 Wochen (in-situ-Enzymographie)

Abb. 35: MMP-Aktivität in der Statingruppe nach 12 Wochen (in-situ-Enzymographie)

3.4 Verkalkung der Konduits

3.4.1 Von-Kossa-Färbung

Der Hauptaspekt dieser Arbeit liegt darin eine mögliche Reduktion der Kalklast durch Simvastatin zu evaluieren. Als erste Übersichtsfärbung eignet sich deshalb die von-Kossa-Färbung am besten. Hierbei werden verkalkte Areale in einem Braun- bis Schwarzton angefärbt und können gut qualifiziert und im Anschluss auch quantifiziert werden.

Nach durchgeführter Färbung zeigen sich bei den 4-Wochen-Tieren keine bis allenfalls leichte Mikroverkalkungen in der Media, die sich durch kleine punktförmige Anfärbungen kennzeichneten.

Intimaverkalkungen waren bei den 4-Wochen-Tieren jedoch nicht zu beobachten (vgl. Abb. 36 und 37).

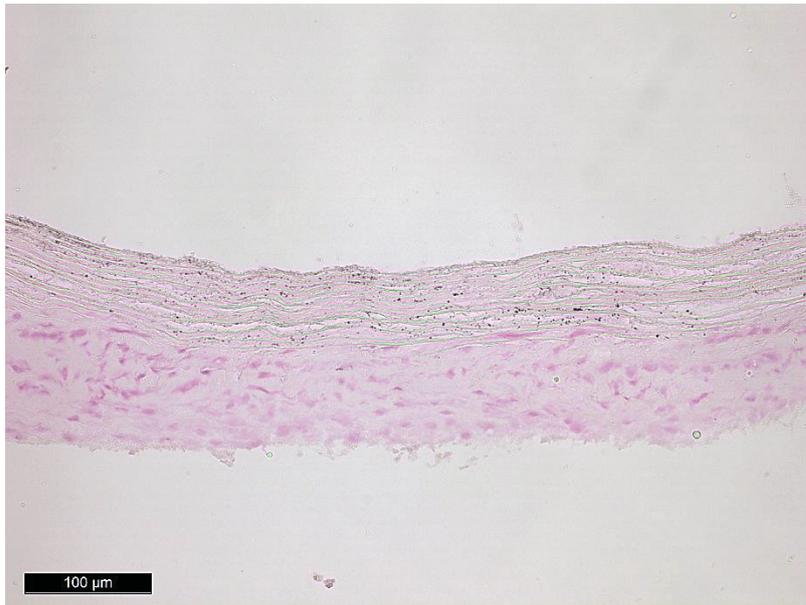


Abb. 36: Mikroverkalkungen der Media bei einem 4-Wochen-Statintier (HE-Färbung)



Abb. 37: Mikroverkalkungen bei einem 4-Wochen-Kontrolltier (HE-Färbung)

Nach einer Implantationszeit von 12 Wochen zeigte sich ein deutlich anderes Bild. Die Verkalkung der Präparate war sehr heterogen und reichte von kleinen Mikroverkalkungen bis hin zu schwersten Verkalkungen, die keine Mediastruktur mehr ausmachen ließen. Außerdem war nun in allen Präparaten eine Verkalkung der Intima zu erkennen, deren Ausmaß jedoch auch sehr variabel war (vgl. Abb. 38 und 39).

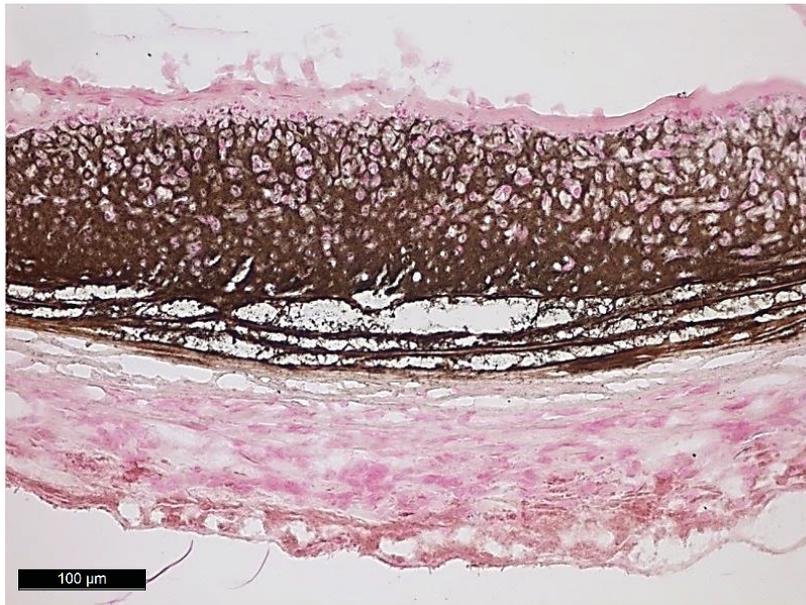


Abb. 38: Intima- und Mediaverkalkung bei einem 12-Wochen-Kontrolltier (von-Kossa-Färbung)

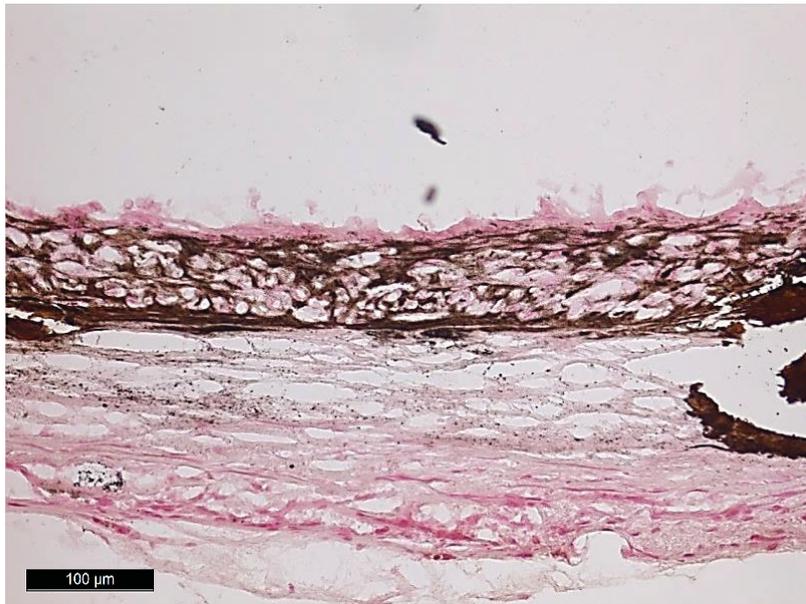


Abb. 39: Starke Intima- und leichte Mediaverkalkung bei einem 12-Wochen-Statintier (von-Kossa-Färbung)

3.4.2 Verkalkungs-Score

Rein qualitativ war sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen auf Grund der Heterogenität der Verkalkung kein Unterschied zwischen beiden Gruppen auszumachen.

Daraus ergab sich die Notwendigkeit eines Verkalkungs-Scores, dessen genaue Durchführung bereits weiter oben beschrieben wurde.

Er zeigt die quantitativen Ausmaße der Verkalkung von Intima und Media nach 4 und 12 Wochen bei beiden Gruppen.

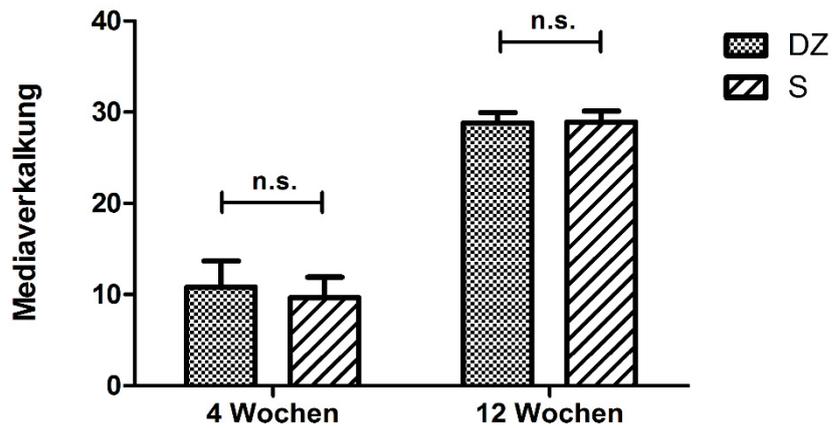


Abb. 40: Mediaverkalkung der beiden Gruppen nach 4 und 12 Wochen

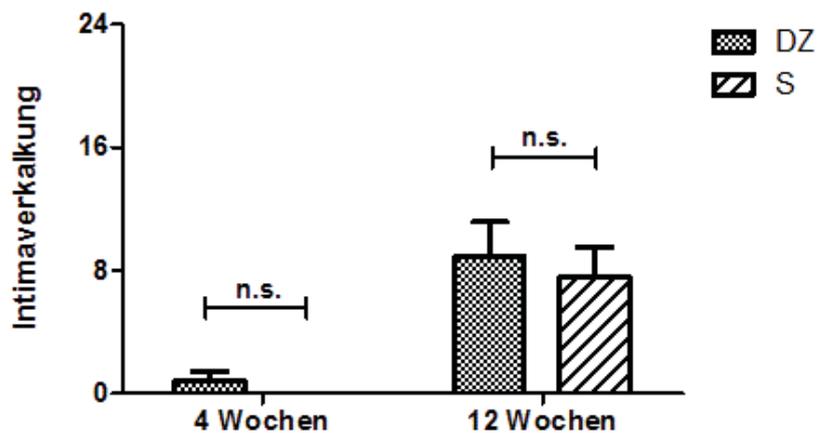


Abb. 41: Intimaverkalkung der beiden Gruppen nach 4 und 12 Wochen

Die quantitative Auswertung der Mediaverkalkung zeigte, dass die Statingruppe bei 4 Wochen mit einem mittleren Verkalkungsscore von 9,6 schwächer verkalkt als die Kontrollgruppe (mittlerer Verkalkungsscore von 10,8). Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

Die Verkalkung nahm dann, wie auch qualitativ beobachtet, von 4 nach 12 Wochen signifikant ($p < 0,0001$) in beiden Regionen zu (vgl. Abb. 40).

Allerdings hatten zu diesem Zeitpunkt beide Gruppen ein annähernd gleiches Ausmaß an Verkalkung erreicht. Die Tiere der Statingruppe mit einem mittleren Verkalkungsscore von 28,9 und die der Kontrollgruppe mit 28,8.

Bei der Betrachtung der Intimaverkalkung zeigte sich nach 4 Wochen lediglich eine minimale Verkalkung in der Intima der Kontrollgruppe (mittlerer Verkalkungsscore 0,8). Nach 12 Wochen zeigten sich in beiden Gruppen erneut ein signifikanter Anstieg der Verkalkung.

Die Kontrolltiere waren hierbei etwas stärker verkalkt (mittlerer Verkalkungsscore 8,9), im Vergleich zu 7,6 bei den Statintieren; jedoch fand sich auch hier keine Signifikanz (vgl. Abb. 41)

3.4.3 Calcium-Assay

Ein im Anschluss durchgeführtes Calcium-Assay sollte die Calcium-Quantifizierung noch weiter objektivieren, da dem Verkalkungsscore durch die Vergabe von Punkten doch ein Rest an Subjektivität zugrunde lag.

Das Assay wurde sowohl an den infrarenal implantierten, dezellularisierten Konduits als auch an den nativen Konduits derselben Tiere durchgeführt.

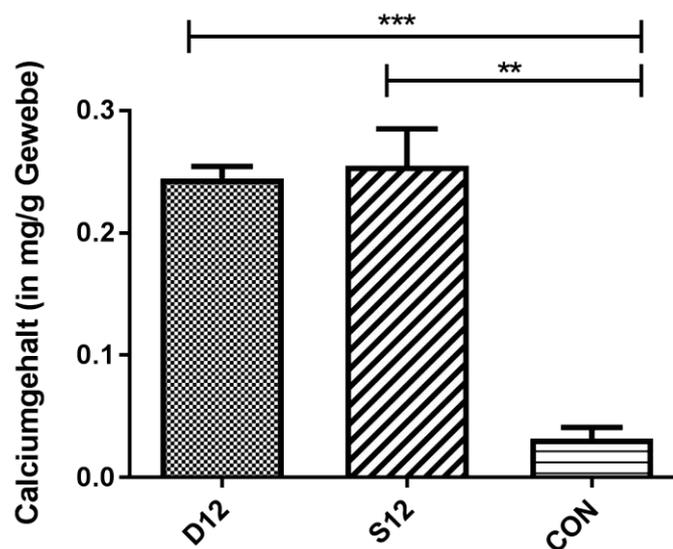


Abb. 42: Calcium-Gehalt in mg/g Gewebe in den implantierten Konduits nach 12 Wochen

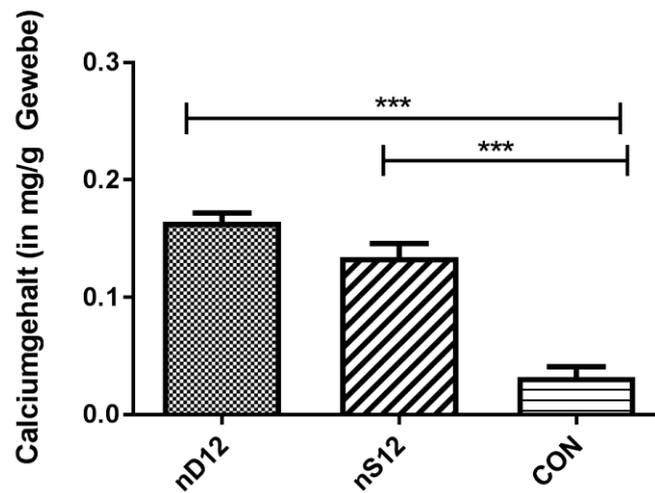


Abb. 43: Calcium-Gehalt pro Gramm Gewebe in den nativen Konduits nach 12 Wochen

Bei der Auswertung ergaben sich bei den implantierten Konduits (siehe Abb. 42) mittlere Werte für den Calcium-Gehalt von $0,245 \pm 0,017$ mg/g für die Kontrollgruppe (DZ) und $0,255 \pm 0,052$ mg/g für die Statingruppe (S).

Bei den nativen Konduits (siehe Abb. 43) war der mittlere Calcium-Gehalt deutlich geringer. Die Kontrollgruppe zeigte Werte von $0,164 \pm 0,013$ mg/g und die Statingruppe auf $0,134 \pm 0,020$ mg/g.

Zwischen beiden Gruppen bestand jeweils keine Signifikanz, jedoch konnte in beiden Fällen ein signifikanter Unterschied zur nativen Kontrolle (CON; ohne prokalzifizierende Diät) mit einem mittleren Calcium-Gehalt von $0,032 \pm 0,012$ mg/g, belegt werden ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$).

3.4.4 Auswertung der Blutwerte

Aus den gewonnenen Blutseren wurden im Institut für Klinische Chemie der Calcium-Gehalt nach 12 Wochen bestimmt (vgl. Abb. 44).

Die Tiere, die Simvastatin erhielten, zeigten nach 12 Wochen eine niedrigere Calcium-Konzentration im Blut als die Tiere der Kontrollgruppe ohne Medikament.

Mit Mittelwerten von $2,9 \pm 0,1$ mmol/l gegenüber $3,2 \pm 0,1$ mmol/l in der Kontrollgruppe war dieser Unterschied signifikant ($p = 0,043$).

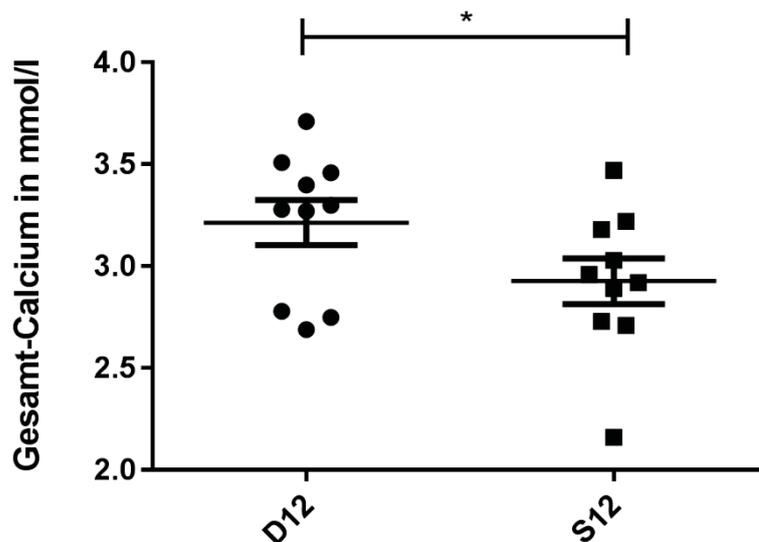


Abb. 44: Calcium-Gehalt in mmol/l im Serum nach 12 Wochen

3.4.5 Auswertung der Real-Time-PCR

Für die Bestimmung des Verkalkungsmaßes wurde mithilfe einer PCR die relative Expression von verschiedenen Markern der chondro-osteogenen Differenzierung bestimmt. Verwendet wurden OPN, OCN, OPG, ALP, BMP2 und RUNX2.

Für Osteopontin lag die relative Expression in beiden Gruppen nach 12 Wochen recht dicht beieinander mit Werten von $1,113 \pm 0,249$ in der Kontrollgruppe gegenüber $1,060 \pm 0,160$ in der Statingruppe; hier ergab sich keine Signifikanz (vgl. Abb. 45 links).

Die relative Expression für Osteocalcin ergab Werte von $1,095 \pm 0,236$ für die Kontrollgruppe und $1,014 \pm 0,290$ für die Tiere, die Statin erhalten hatten; auch diese Unterschiede waren nicht signifikant (vgl. Abb. 45 rechts).

Eine Genexpressionsanalyse der ALP zeigte leicht erhöhte Expressionen auf Seiten der Statingruppe ($3,408 \pm 2,342$ gegenüber $1,078 \pm 0,209$)

Bei der Analyse von Osteoprotegerin ließ sich eine relative Expression von $1,097 \pm 0,260$ bei den Kontrolltieren gegenüber $0,795 \pm 0,163$ bei Tieren, die Statin erhielten, zeigen.

Für die folgenden chondrogenen Marker BMP2 und RUNX2 ließ sich zwischen beiden Gruppen so gut wie kein Unterschied zeigen. BMP2 erreichte eine relative Expression von $1,097 \pm 0,229$ in der Kontrollgruppe gegenüber $0,915 \pm 0,205$ in der Statingruppe. Die Kontrollgruppe zeigte eine Expression von $1,153 \pm 0,311$ für RUNX2 und die Statingruppe für dasselbe Gen $1,173 \pm 0,217$.

In keinem Gen der chondro-osteogenen Differenzierung konnte zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

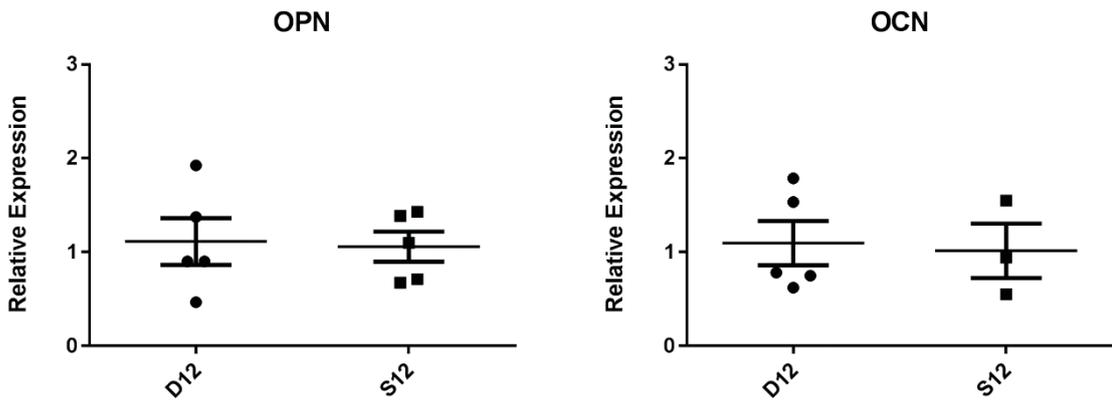


Abb. 45: Relative Expression von OPN und OCN bei beiden Gruppen nach 12 Wochen

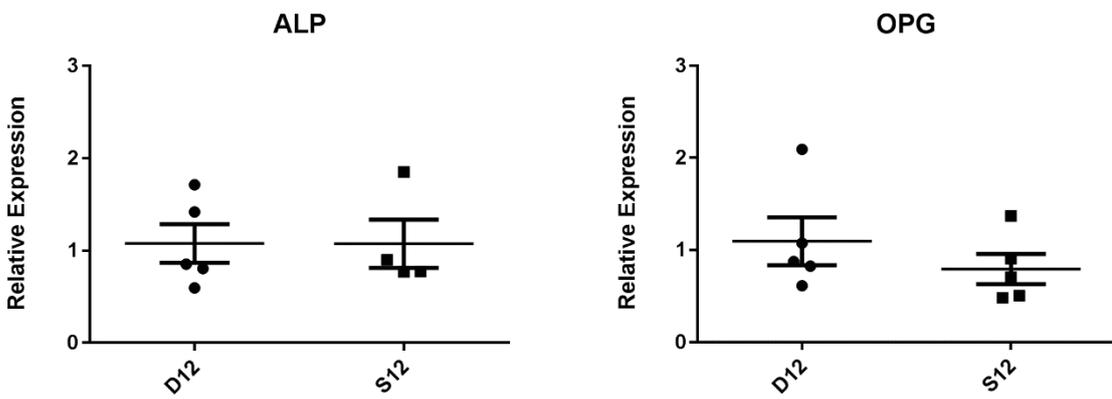


Abb. 46: Relative Expression von ALP und OPG bei beiden Gruppen nach 12 Wochen

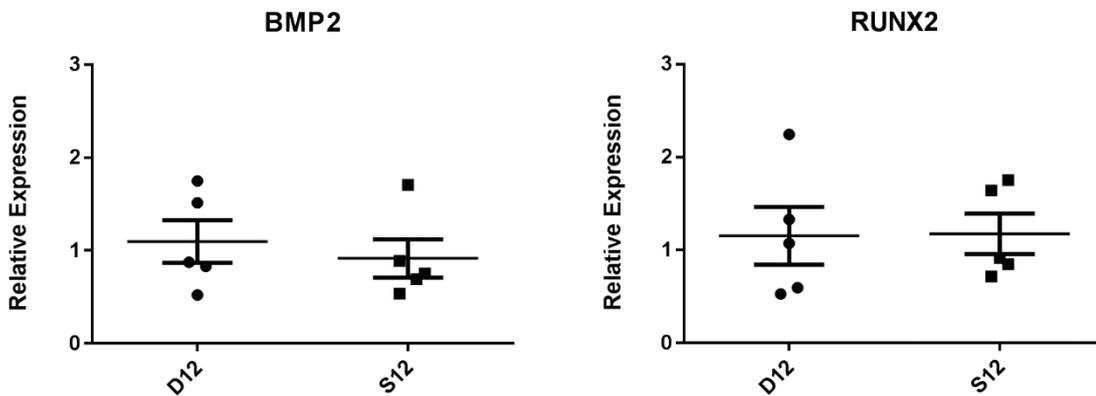


Abb. 47: Relative Expression von BMP2 und RUNX2 bei beiden Gruppen nach 12 Wochen

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Simvastatin auf die kalzifizierende Degeneration von heterotop implantierten dezellularisierten Aortenkonduits im Ratten-Härtemodell dargestellt werden.

Die heterotope Implantation nach Assmann et al. 2012 wurde direkt postoperativ dopplersonographisch überprüft, um die Suffizienz der Anastomosen und die ausreichende Durchblutung des infrarenalen Konduits und der unteren Extremität sicher zu stellen.

Durch Fütterung einer prokalzifizierenden Spezial-Diät mit erhöhten Konzentrationen von Vitamin D, Cholesterin und Calcium-Phosphat wurde die Degeneration der Implantate verstärkt. Diesen Erfolg konnten wir sowohl in der Histologie durch stark positive von-Kossa-Färbungen, als auch bei der Auswertung des Calcium-Assays und der Blutanalyse auf Cholesterin und Calcium, nachweisen.

Ebenso zeigte sich in der Gruppe der Tiere, die zusätzlich ein Statin mit dem Futter erhielten, eine signifikante Reduktion der Cholesterin-Konzentration im Blutserum im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0.049$), was die metabolische Wirksamkeit des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers belegte.

4.1 Rezellularisierung

Eine schnelle Rebesiedelung der zellfreien luminalen Konduitoberfläche wird als förderlich angesehen, was die Biokompatibilität, die hämodynamische Funktion und die Haltbarkeit des dezellularisierten Implantats betrifft. Eine fehlende oder lückenhafte Rezellularisierung kann zu vermehrten Immunreaktionen oder thrombogenen Ereignissen führen (Lee et al. 2014). Daher ist bei Implantation dezellularisierter Konduits eine schnelle und effektive Rebesiedelung sehr wichtig.

In diesem Modell zeigte sich nach einer Implantationszeit von 4 Wochen ungefähr die Hälfte der luminalen Oberfläche rebesiedelt. Wohingegen nach 12 Wochen nahezu überall eine neointimale Schicht zu finden war. Diese Ergebnisse stimmen auch mit vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe überein, die zeigen, dass dezellularisierte Konduits *in vivo* generell zu einer schnellen luminalen Rezellularisierung neigen (Assmann et al. 2012, 2013).

Allerdings neigten diese auch zu einem eher überschießenden neointimalen Wachstum, sodass es nicht bei einer einzelnen Endothel-Schicht blieb. Die Intimadicke wuchs dabei im Laufe der Zeit. Der Intima-Media-Index, als Marker für Intimahyperplasie, nahm in beiden Gruppen von 4 nach 12 Wochen signifikant zu ($p<0,0001$).

Untersuchungen bezüglich der Art der hyperplastischen Zellen ergaben, dass die Intima in beiden Gruppe vorwiegend aus α -SMA-positive Zellen besteht, die nach luminal von einer Schicht vWF-positiver Zellen bedeckt werden. Dieser Nachweis deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Studien, auch dort wurden in der Neointima vorwiegend α -SMA-positive Zellen gefunden (Akhyari et al. 2010; Tsai et al. 2012; Assmann et al. 2013)

Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob die Gabe von Simvastatin einen Einfluss auf die Rezellularisierung der Intima hat.

In anderen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass Statine in der Lage sind, die Intimahyperplasie in nativen Gefäßen, zu reduzieren.

Unter Atorvastatin-Therapie konnte sowohl der Intima-Media-Index als auch die Anzahl intimaler α -SMA-positiver Zellen in nativen Gefäßen nach Endothelverletzung im Rattentiermodell reduziert werden, was im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Lumenvergrößerung führte (Aydin et al. 2009). Eine ähnliche Studie von Xu et al. zeigte im Rattenmodell nach Verletzung der Arteria carotis unter Atorvastatingabe eine verminderte Neointimabildung und eine erhöhte Apoptoserate von α -SMA-positiver Zellen (Y. Xu et al. 2014). Eine andere Gruppe zeigte, dass eine *in vitro* Statingabe die Proliferation α -SMA-positiver Zellen in operativ entfernten Gefäßen von Mäusen mit normalen Cholesterinwerten signifikant reduzieren und damit einer intimalen Hyperplasie entgegen wirken konnte (Zhang et al. 2012). Auch viele weitere Studien wiesen eine Verkleinerung der Neointima sowie der Intima-Media-Relation unter einer Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern nach: Koniari et al. stellten in ihrem Hasenmodell mit prokalzifizierender Diät dar, dass die Ausbildung einer Neointima in der nativen *aorta descendens* unter der Gabe von Pravastatin signifikant reduziert werden konnte (Koniari et al. 2015). Janardhanan et al. zeigten, dass in ihrem Mäusemodell mit artifiziell generierten arteriovenösen Fisteln die α -SMA-Zellichte und die Zellproliferation unter Simvastatingabe reduziert werden konnten (Janardhanan et al. 2013). Auch Qiang et al. konnten mit ihrem Rattenmodell nachweisen, dass nach Transplantation von venösen Gefäßimplantaten und Gabe von Atorvastatin weniger Umbauprozesse und eine reduzierte Intimahyperplasie darzustellen waren (Qiang et al. 2012).

Aber nicht nur histologisch konnte bisher eine Reduktion der nativen Intimahyperplasie durch Statingabe nachgewiesen werden, auch mittels intravaskulärem Ultraschall konnte nachweislich eine Wirkung gezeigt werden (Kulik et al. 2011).

Trotz dieser vielen positiven Ergebnisse, kam es in dieser Arbeit zu keiner Reduktion der Neointima. Allerdings ist dies bisher die erste Studie, die die Statinwirkung auf dezellularisierte Konduits untersucht und nach unseren Ergebnissen scheint eine Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern die intimale Neoplasie nach Dezellularisierung nicht zu reduzieren.

4.2 Inflammation

Bei nicht-autologen Transplantationen stellt das Auftreten adverser Immunreaktionen gegen das Implantat noch immer ein großes Problem dar. Das Ziel ist daher eine Reduktion des immunogenen Potentials. Daher war ein zweiter Aspekt dieser Arbeit die Beurteilung der inflammatorischen Reaktion, zum einen durch die Dezellularisierung und zum anderen durch die Statingabe.

Entzündungsreaktionen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose (Ikonomidis et al. 2012; Libby et al. 2010). Die Adhäsion und Migration von Entzündungsstellen stehen meist am Anfang von arteriosklerotischen Läsionen. Zudem können inflammatorische Zytokine die Stabilität von Plaques beeinflussen (Ait-Oufella et al. 2011; Stoll and Bendszus 2006).

So ist es nur sinnvoll, wenn eine medikamentöse Intervention auch eine anti-inflammatorische Komponente aufweist. HMG-CoA-Reduktase-Hemmer sind in der Lage pro-inflammatorische Zytokine (wie IL-6 und IL-8) sowie Akute-Phase-Proteine (allen voran das C-reaktive Protein) zu senken und damit anti-entzündlich auf die Gefäßstrukturen einzuwirken (Jain and Ridker 2005; Albert et al. 2001; Sparrow et al. 2001; Jialal et al. 2001).

Mittels einer Real-Time-PCR-Analyse untersuchten wir quantitativ die Marker CD39, CD73 und TNF- α sowie die pro-inflammatorischen Zytokine IL1b und IL6 nach 12 Wochen Implantationsdauer. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von IL-6 ($p=0,0305$) bei den Tieren, die Simvastatin erhalten hatten.

Eine Reduktion verschiedener Zytokine durch HMG-CoA-Reduktase-Hemmer wurde bereits in anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Ma et al. 2015 und Waehre et al. 2004 zeigten ebenfalls eine verminderte IL-1b-Expression unter Statin-Therapie. Erniedrigte Werte für IL-6 und TNF- α nach einer Behandlung mit dem Lipidsenker traten auch bei Bupalova et al. 2014 oder Calza et al. 2012 auf.

Weitere Studien zeigen, dass Patienten mit koronarer Herzkrankheit erhöhte Werte für Interleukine und Tumor-Nekrose-Faktoren aufweisen (Klingenberg and Hansson 2009). Insbesondere IL-6 und TNF- α scheinen dabei eine wichtige Rollen bei der Entstehung von arteriosklerotischen Entzündungsprozessen zu spielen (Sun et al. 2009). Auch Schuett et al. bestätigen, dass das Vorhandensein von IL-6 die Plaque-Entstehung triggern und deren Stabilität negativ beeinflussen kann (Schuett et al. 2009).

Die Senkung dieser Zytokine führte zu einer verminderten Entzündungsreaktion, einer verbesserten Endothelfunktion und einer beschleunigten Flussgeschwindigkeit (Weis et al. 2001). Die anti-inflammatorische Wirkung scheint also mit einer protektiven Wirkung auf die Gefäße einherzugehen, sodass man hier von einem positiven Effekt durch den Einsatz von Statinen sprechen kann.

Möglicherweise kann dieser Effekt durch eine angepasste Dosierung des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers noch weiter gesteigert werden. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen CRP-Konzentration und Statin-Dosis gebe. So wurden Patienten mit Atherosklerose über einen längeren Zeitraum Statine in verschiedenen Dosierungen verabreicht und anschließend die CRP-Konzentrationen verglichen. Allen Studien gemeinsam war, dass mit erhöhter Statin-Gabe die Entzündungsreaktion und damit auch der Wert des Akut-Phase-Proteins weiter abnahmen (Tawakol et al. 2013; Bonnet et al. 2008; Ray and Cannon 2005).

Eine weitere Möglichkeit das pro-inflammatorische Potential zu senken, stellt die Dezellularisierung an sich dar. Durch Entfernung aller Zellkomponenten wird auch die zelluläre und humorale Immunantwort gegenüber dem Implantat signifikant reduziert (Meyer et al. 2005; Numata et al. 2004).

Diese These können wir auch mit Ergebnissen dieser Arbeit stützen. So konnten wir in der Immunfluoreszenz auf CD3 und CD68, die als valide Entzündungsmarker gelten, rein qualitativ weder nach 4 noch nach 12 Wochen inflammatorische Zellen nachweisen.

In einer anderen Studie dieser Arbeitsgruppe wurden kryokonservierte Konduits mit dezellularisierten Konduits unter anderem hinsichtlich ihrer Immunreaktion nach allogener Implantation untersucht. Auch hier zeigte sich eine signifikante Entzündungsreaktion in der Gruppe der rein kryokonservierten Implantate, wohingegen erneut wenig inflammatorische Aktivität in den Konduits nach erfolgter Dezellularisierung nachgewiesen werden konnte (Assmann, Zwirnmann, et al. 2014). Auch im Schweine-Modell nach Numata et al. wurden im Vergleich Dezellularisierung vs. Kryokonservation nur in der nativen Gruppe Entzündungszellen gefunden (Numata et al. 2004).

Die durch die Dezellularisierung ohnehin bereits stark verminderte Entzündungsreaktion stellt jedoch auch ein Problem bei der Auswertung dar, da hierdurch eventuell stärker vorhandene anti-inflammatorische Effekte des Statins nicht richtig zum Tragen kommen konnten.

4.3 Kalzifizierende Degeneration der Konduits

Da dezellularisierte Implantate unter normalen Umständen keine bis lediglich Mikroverkalkungen aufweisen, wurde in dieser Studie mittels einer prokalzifizierenden Diät die Verkalkung der Konduits verstärkt, um das anti-degenerative Potential einer Simvastatin-Therapie optimal beurteilen zu können.

Die geringe Kalzifizierung dezellularisierter Implantate zeigte sich bereits sowohl in früheren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ohne Härtefutter (Assmann et al. 2013, 2012), als

auch in Studien, die dezellularisierte und rein kryokonservierte Konduits hinsichtlich ihrer Degenerationsneigung verglichen und eine signifikant reduzierte Verkalkung in der ersten Gruppe fanden (Lopes et al. 2009; Hopkins et al. 2009).

Dank des Härtefutters zeigten sich allerdings massive Hydroxyapatit-Ablagerungen, vorwiegend in der Media unserer dezellularisierten Konduits.

Trotzdem konnten wir keinen Effekt der Statin-Therapie auf die verkalkten Areale nachweisen. Wir quantifizierten die Kalklast über einen eigens entwickelten Kalzifizierungs-Score und über ein Calcium-Assay, wir führten histologischen Untersuchungen mittels von-Kossa-Färbungen und Immunfluoreszenzen durch und testeten in der Real-Time-PCR verschiedene Marker der chondro-osteogenen Differenzierung. In keiner der Untersuchungen zeigte sich eine signifikante Senkung der Kalklast durch die Simvastatin-Gabe.

Dass in unserem Modell keine Reduktion des Calcium-Gehalts durch die Simvastatin-Therapie erreicht wurde, kann auch an den Gegebenheiten des Modells liegen. So lag die größte Kalklast in der zellfreien Media, die über den gesamten Versuchszeitraum nicht rebesiedelt wurde. Möglicherweise sind die fehlenden interstitiellen Zellen der Grund, weswegen die Statin-Therapie nicht ihre vollständige anti-degenerative Wirkung entfalten konnte.

In verschiedenen Publikationen taucht aktuell vermehrt der Begriff „Statin-Paradox“ auf. Das „Statin-Paradox“ beschreibt die Tatsache, dass die Effekte einer Statintherapie abhängig vom vorliegenden Zelltyp sein könnten. So beschrieben Monzack et al. in ihrer Studie, dass es je nach Subtyp der valvulären interstitiellen Zellen (VIC) zu einer vermehrten oder zu einer verminderten Expression von osteoblastischen Markern kommen kann. Bei Vorliegen myofibroblastischer VICs führte die Statintherapie zu einer Reduktion der Osteocalcin-Expression, bei osteoblastischer VICs zu einem Anstieg.

VICs selbst sind multipotente Zellen, die sich je nach Ausgangslage in ebendiese Subtypen differenzieren können. Osteoblastische VICs treten dabei vermehrt bei Herzklappenerkrankungen auf; myofibroblastische VICs kommen vor allem bei gesunden Klappen oder nach stattgehabtem *Remodelling* vor (Monzack and Masters 2012). Die Tatsache, dass es sich nach Ergebnissen unserer Zellqualifizierung hauptsächlich um α -SMA-positive Myofibroblasten in der Neointima handelt, könnte hierbei eine mögliche Erklärung für die leicht ernierigte Osteocalcin-Expression in der Statin-Gruppe sein.

Eine Follow-Up-Studie von Zhao et al. wies bei Patienten mit bekannter koronarer Herzkrankheit nach einer 10-jährigen Therapie mit Lovastatin im Vergleich zur Kontrollgruppe eine unterschiedliche Plaque-Zusammensetzung nach. Die behandelten Patienten zeigten in den Plaques einen erhöhten Calcium-Anteil (10 % im Vergleich zu 3 %

in der Kontrollgruppe), trotz signifikant reduziertem Lipid-Anteil und einer insgesamt verringerten Plaquefläche (Zhao et al. 2001).

Dass gerade eine kalkreiche Kappe bei arteriosklerotischen Plaques von Vorteil sein kann, zeigen auch andere Publikationen. So wirkt eine vermehrte Kalkablagerung stabilisierend auf die Plaques und senkt damit gleichzeitig das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse.

HMG-CoA-Reduktase-Hemmer scheinen die Oxidation des *low-density*-Cholesterins zu verhindern und damit auch die Aktivierung von Makrophagen und die Entstehung von Schaumzellen. Durch die Makrophagen-Aktivierung kann es zur Phagozytose kommen, was möglicherweise die Plaque-Oberfläche aufweicht und schwächt, was wiederum zu einer progredienten Plaque-Instabilität mit eventuell nachfolgender Ruptur führen kann (Vaughan, Gotto, and Basson 2000). Weiche Plaques, die vorwiegend aus einem lipidreichen Kern und vielen Schaumzellen bestehen, sind eher instabil und daher besonders prädisponiert für eine Ruptur. Läsionen dieser Art sind selten, aber für 80-90% akuter kardiovaskulärer Ereignisse verantwortlich. Im Gegensatz dazu wirkt eine fibröse Kappe und ein wenig lipidreicher Kern plaquestabilisierend (Brown et al. 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die Expression von RAGE mit und ohne Simvastatin-Therapie bestimmt. AGE steht für *Advanced Glycation Endproduct* und ist das Reaktionsprodukt einer Glykation, also einer Reaktion, die ohne Enzyme abläuft.

Aktuelle Studien zeigen, dass AGE über einen Rezeptor (RAGE) zusammen mit oxidativen Stress an einer gesteigerten vaskulären Verkalkung beteiligt sein kann (Wei et al. 2013).

In dieser Arbeit kam es zu keiner Veränderung der RAGE-Expression in den kalzifizierten Konduits durch die Statingabe.

Frühere Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Expression und der Protein-Gehalt von RAGE unter Atorvastatin-Therapie zwar in diabeteskranken Ratten gesenkt werden konnte, in der Kontrollgruppe ohne Diabetes trat dieser Effekt jedoch nicht auf (Lu et al. 2011). Und auch Wei et al. berichteten über erhöhte AGE-Werte bei Ratten, die an Diabetes erkrankt waren, jedoch nicht bei Tieren, die 8 Wochen lang hochdosiert Vitamin-D bekommen hatten (Wei et al. 2013). Auch in weiteren Studien war AGE nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von Diabetes erhöht und an den kardiovaskulären Folgeschäden beteiligt (Stirban et al. 2013).

Diese Ergebnisse könnten erklären, warum Simvastatin in dieser Studie mit vorhandener Hypercholesterinämie, aber ohne Hyperglykämie, nicht in der Lage war, die RAGE-Expression zu senken.

In dieser Studie erfolgte auch eine Analyse der Aktivität der Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) im Gewebe, also von Enzymen, die die Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. Der größte Anteil dieser MMPs setzt sich dabei aus MMP-2 und MMP-9 zusammen.

Eine erhöhte Aktivität von MMP-2 wurde in vorherigen Untersuchungen unter anderem in

arteriosklerotisch veränderten Aorten gefunden (Li et al. 1996). Dort zeigte sich ein Anstieg der Protease in Lipidablagerung und ein noch größerer Anstieg in arteriosklerotischen Plaques. So soll MMP-2 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose haben und auch eine Beteiligung bei thromboembolischen Komplikationen wird diskutiert.

Eine erhöhte Expression von MMP-9 wurde auch in instabilen arteriosklerotischen Plaques gefunden, die für eine mögliche Embolisation verantwortlich sein könnten. Auch in Gebieten mit entzündlichen Infiltraten zeigte sich MMP-9 signifikant erhöht (Loftus et al. 2000).

Simionescu et al. konnten erhöhte Konzentrationen von MMP-2 und MMP-9 in rupturierten, aber nicht kalzifizierten, biologischen Klappenprothesen nachweisen, was ebenfalls für eine Beteiligung der MMPs bei degenerativen Prozessen spricht (Simionescu et al. 1996).

In dieser Arbeit zeigte sich sowohl nach 4 Wochen als auch nach 12 Wochen eine erhöhte MMP-Aktivität in Explantaten der Statingruppe, was für einen gesteigerten Umbauprozess in diesen Gewebeanteilen sprechen kann.

Jedoch ist bisher noch unklar, inwiefern MMPs an diesen Umbauprozessen beteiligt sind. So wäre es möglich, dass sie entweder die Degeneration verstärken oder bei einer Regeneration des degenerativen Gewebes helfen können.

So ist auch die Studienlage diesbezüglich nicht eindeutig. Hurks et al. untersuchten die Wirkung verschiedener Statine auf die Proteasen und stellten fest, dass es zu keiner signifikanten Veränderung der MMP-Expression unter Statintherapie kam. Zudem vermuteten sie einen unterschiedlichen Einfluss durch verschiedene Statin-Subtypen (Hurks et al. 2010).

Passend dazu zeigte sich bei Izidoro-Toledo et al. lediglich unter Atorvastatin und Pravastatin, aber nicht unter dem, auch in dieser Studie verwendeten, Simvastatin eine Reduktion der MMP-2-Aktivität, was die These einer unterschiedlichen Wirkung je nach Statin-Subtypen unterstützen würde (Izidoro-Toledo et al. 2011).

4.4 Einordnung in klinischen Zusammenhang

Der Nutzen einer Statintherapie bei Koronarer Herzkrankheit ist aktuell Gegenstand vieler verschiedener Studien. HmG-CoA-Reduktase-Hemmer werden dabei nicht nur wegen ihrer lipidsenkenden Eigenschaften eingesetzt, sondern auch zunehmend wegen ihrer pleiotropen Effekte. So besitzen Statine auch eine anti-inflammatorische und immunmodulatorische Wirkung und sind in der Lage atherosklerotische Plaques zu stabilisieren und deren Progression zu verhindern. Auch eine Verbesserung der Endothelfunktion, Reduktion der Thrombogenität und anti-oxidative Wirkung wird ihnen nachgesagt (Jasińska et al. 2007).

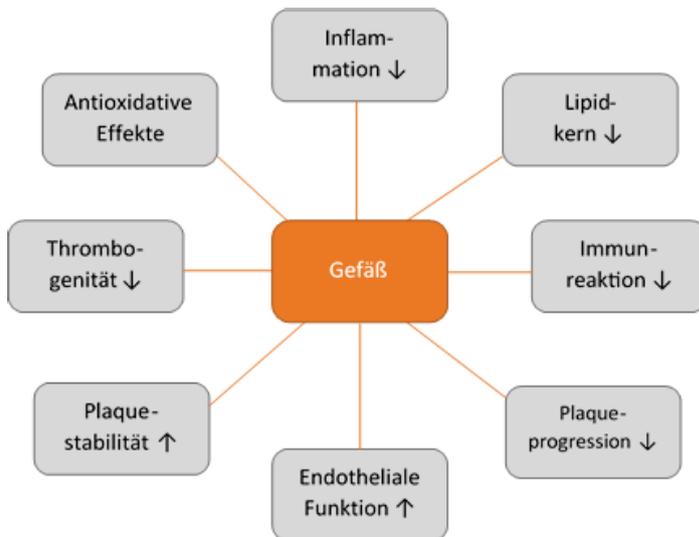


Abb. 48: Gefäßschützende Wirkung der Statine

Im Folgenden sollen einige größere Studien über mögliche Auswirkungen einer Statintherapie verglichen werden (nach Assmann et al. 2014)

In der YELLOW-Studie wurde bei 87 Patienten mit einer Mehrgefäßerkrankung die Lipiddicke in arteriosklerotischen Plaques nach standardisierter und intensivierter Statintherapie verglichen. Nach 7 Wochen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Lipidschicht bei Patienten, die mit intensivierter Statintherapie behandelt wurden (Kini et al. 2013). Die Reduktion des Lipidkerns scheint die Plaquestabilität dabei positiv beeinflussen und die Entstehung eines akuten Koronarsyndroms verhindern zu können (Fernández-Ortiz et al. 1994).

Im Gegensatz zu Studien zur Statintherapie bei der Behandlung der koronaren Herzkrankheit, die alle einen deutlichen Nutzen durch die medikamentöse Intervention nachweisen können, ist die Studienlage bei der Behandlung der Aortenklappenstenose mit Statinen sehr uneinig.

In der RAAVE-Studie kam es echokardiografisch bei der Hälfte der 121 Patienten mit Aortenklappenstenosen, die mit Rosuvastatin behandelt wurden, zu einer Verbesserung der Hämodynamik mit Reduktion der Stenose; im Gegensatz zur anderen Hälfte, die mit einem Placebo behandelt wurden (Moura et al. 2007).

In der SALTIRE-Studie hingegen konnte die Progression der Aortenklappenstenose nicht verhindert werden. Die Studie bestand aus 155 Patienten mit kalzifizierender Aortenklappenstenose; die Hälfte erhielt Atorvastatin und die andere Hälfte ein Placebo. Die Gefäßverkalkung wurde mittels Doppler-Ultraschalls bestimmt und schritt in beiden Gruppe trotz Therapie weiter fort (Cowell et al. 2005).

Und auch in der SEAS-Studie kam es bei über 1800 Patienten mit Aortenklappenstenosen, die Simvastatin und Ezetimib erhielten, weiterhin zu einer Progression der Herzerkrankung. So konnten weder die Klappenrekonstruktionen noch die ischämischen Ereignisse in ihrer Anzahl durch die Therapie reduziert werden (Rossebø et al. 2008).

Die deutlichen Unterschiede zwischen den Studien können am ehesten durch die unterschiedlichen Einschlusskriterien erklärt werden. In der SALTIRE- und in der SEAS-Studie, die keinen positiven Effekt durch eine Statinbehandlung zeigen konnten, wurden Patienten ohne Hypercholesterinämie eingeschlossen. Also Patienten, die im eigentlichen Sinn keine Statintherapie benötigten. Wohingegen in der RAAVE-Studie Patienten mit Hypercholesterinämie das Statin und Patienten ohne erhöhte Cholesterinwerte das Placebo erhielten. Daraus lässt sich schließen, dass hauptsächlich Patienten mit einer Aortenklappenstenose und gleichzeitiger Hypercholesterinämie durch die Statintherapie eine positive Auswirkung mit Besserung der Herzerkrankung zeigen.

In der retrospektiven Kohorten-Studie von Farivar et al. wurden 144 Patienten nach einem Klappenersatz hinsichtlich der Klappenverkalkung und ihres Serum-Cholesterol-Werts verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Hypercholesterinämie und der Klappenverkalkung der Patienten. Hiernach scheinen erhöhte Cholesterin-Konzentrationen auch einen Risikofaktor für vermehrte Klappendegeneration darzustellen (Farivar et al. 2003). Wohingegen eine andere Studie zur Degeneration von Bioprothesen wiederum nicht belegen konnte, dass präoperativ erhöhte Cholesterinwerte einen Risikofaktor für vermehrte Degeneration des Klappenersatzes darstellen. In dieser Studie wurden 7150 Patienten mit Klappenersatz hinsichtlich einer Prothesendegeneration verglichen. Bei 208 von ihnen wurde eine degenerativ bedingte Explantation notwendig, aber erhöhte Cholesterinwerte schienen keinen Risikofaktor hierfür darzustellen. Als prognostisch ungünstig zeigten sich vielmehr ein niedriges Alter bei der Transplantation, ein hohes Körpergewicht und erhöhte Kreatinin-Werte im Serum (Gring et al. 2006).

Shetty et al. wiederum unterstützen ebenfalls die These, dass lipidbedingte Entzündungsmechanismen zur Degeneration von Bioprothesen wesentlich beitragen und daher durch medikamentöse Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren auch die Klappendegeneration verringert werden kann (Shetty et al. 2009).

In dieser Arbeit könnte das Fehlen einer signifikanten Inflammation durch die vorherige Dezellularisierung der Konduits mit ein Grund dafür sein, warum die medikamentöse Therapie mit Simvastatin nicht zu einer Verringerung der Implantatdegeneration beitragen konnte. Dass das applizierte Statin grundsätzlich ausreichend dosiert war, um Effekte im Empfängerorganismus zu erzeugen, konnte allerdings bestätigt werden. So zeigte sich in der Arbeit sowohl Auswirkungen auf den Metabolismus durch verringerte Calcium- und

Cholesterin-Serumwerte als auch auf die Inflammation im Gewebe durch eine erniedrigte IL-6-Expression.

4.5 Limitationen dieser Arbeit

Das verwendete Rattenmodell ist nicht in der Lage, den komplexen menschlichen Metabolismus und Degenerationsvorgänge kardiovaskulärer Prothesen mit allen Einflüssen abzubilden. Komorbiditäten, wie Diabetes, arterielle Hypertonie, Adipositas oder Niereninsuffizienz, beeinflussen den Verlauf der Atherosklerose bzw. das Schicksal des implantierten Klappenersatzes. Für die Zukunft könnten hier beispielsweise Rattenmodelle mit zusätzlichen metabolischen Störungen eine Möglichkeit darstellen, die Effekte einer Statin-Therapie auf die kalzifizierende Klappendegeneration *in vivo* noch genauer abzubilden. (Assmann et al. 2014)

Desweiteren kann durch die infrarenale, heterotope Implantation die Hämodynamik nicht vollkommen identisch zum menschlichen Organismus dargestellt werden. Allen Tieren wurde vor der Transplantation künstlich eine Aortenklappeninsuffizienz an der nativen Klappe generiert. Um die Funktionalität und insbesondere den diastolischen Klappenschluss der implantierten Klappe zu gewährleisten, musste in der abdominalen Aorta ein diastolischer Reflux erzeugt werden. Trotz deutlich verbesserter Hämodynamik kann dieses Modell die Blutflusscharakteristika in der Aortenklappenposition nicht vollständig simulieren.

Literaturverzeichnis

- Ait-Oufella, Hafid, Soraya Taleb, Ziad Mallat, and Alain Tedgui. 2011. "Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (5): 969–79. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207415>.
- Akhyari, Payam, Hiroyuki Kamiya, Patricia Gwanmesia, Hug Aubin, Ramon Tschierschke, Stefanie Hoffmann, Matthias Karck, and Artur Lichtenberg. 2010. "In Vivo Functional Performance and Structural Maturation of Decellularised Allogenic Aortic Valves in the Subcoronary Position." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 38 (5): 539–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2010.03.024>.
- Albert, M. A., E. Danielson, N. Rifai, P. M. Ridker, and PRINCE Investigators. 2001. "Effect of Statin Therapy on C-Reactive Protein Levels: The Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation (PRINCE): A Randomized Trial and Cohort Study." *JAMA* 286 (1): 64–70.
- Antonini-Canterin, Francesco, Monica Hîrșu, Bogdan Alexandru Popescu, Elisa Leiballi, Rita Piazza, Daniela Pavan, Carmen Gînghină, and Gian Luigi Nicolosi. 2008. "Stage-Related Effect of Statin Treatment on the Progression of Aortic Valve Sclerosis and Stenosis." *The American Journal of Cardiology* 102 (6): 738–42. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.04.056>.
- Antonini-Canterin, Francesco, Bogdan A. Popescu, Guoqian Huang, Renata Korcova-Miertusova, Dante Rivaben, Pompilio Faggiano, Daniela Pavan, et al. 2005. "Progression of Aortic Valve Sclerosis and Aortic Valve Stenosis: What Is the Role of Statin Treatment?" *Italian Heart Journal: Official Journal of the Italian Federation of Cardiology* 6 (2): 119–24.
- Antonini-Canterin, Francesco, Alfredo Zuppiroli, Bogdan A. Popescu, Gianluca Granata, Eugenio Cervesato, Rita Piazza, Daniela Pavan, and Gian Luigi Nicolosi. 2003. "Effect of Statins on the Progression of Bioprosthetic Aortic Valve Degeneration." *The American Journal of Cardiology* 92 (12): 1479–82.
- Assmann, Alexander, Payam Akhyari, Christofer Delfs, Ulrich Flögel, Christoph Jacoby, Hiroyuki Kamiya, and Artur Lichtenberg. 2012. "Development of a Growing Rat Model for the in Vivo Assessment of Engineered Aortic Conduits." *The Journal of Surgical Research* 176 (2): 367–75.
- Assmann, Alexander, Christofer Delfs, Hiroshi Munakata, Franziska Schiffer, Kim Horstkötter, Khon Huynh, Mareike Barth, et al. 2013. "Acceleration of Autologous in Vivo Recellularization of Decellularized Aortic Conduits by Fibronectin Surface Coating." *Biomaterials* 34 (25): 6015–26. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.037>.
- Assmann, Alexander, Kim Horstkötter, Hiroshi Munakata, Franziska Schiffer, Christofer Delfs, Kai Zwirnmann, Mareike Barth, Payam Akhyari, and Artur Lichtenberg. 2014. "Simvastatin Does Not Diminish the in Vivo Degeneration of Decellularized Aortic Conduits." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 64 (4): 332–342.
- Assmann, Alexander, Kai Zwirnmann, Friederike Heidelberg, Franziska Schiffer, Kim Horstkötter, Hiroshi Munakata, Felix Gremse, Mareike Barth, Artur Lichtenberg, and Payam Akhyari. 2014. "The Degeneration of Biological Cardiovascular Prostheses under pro-Calcific Metabolic Conditions in a Small Animal Model." *Biomaterials* 35 (26): 7416–28. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.034>.
- Aydin, Unal, Murat Ugurlucan, Funda Gungor, Sedat Ziyade, Bekir Inan, Maciej Banach, Yusuf Kalko, and Tahsin Yasar. 2009. "Effects of Atorvastatin on Vascular Intimal Hyperplasia: An Experimental Rodent Model." *Angiology* 60 (3): 370–77. <https://doi.org/10.1177/0003319708321102>.
- Baigent, C., A. Keech, P. M. Kearney, L. Blackwell, G. Buck, C. Pollicino, A. Kirby, et al. 2005. "Efficacy and Safety of Cholesterol-Lowering Treatment: Prospective Meta-Analysis of Data from 90,056 Participants in 14 Randomised Trials of Statins." *Lancet (London, England)* 366 (9493): 1267–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67394-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67394-1).

- Banach, Maciej, Corina Serban, Amirhossein Sahebkar, Dimitri P. Mikhailidis, Sorin Ursoniu, Kausik K. Ray, Jacek Rysz, et al. 2015. "Impact of Statin Therapy on Coronary Plaque Composition: A Systematic Review and Meta-Analysis of Virtual Histology Intravascular Ultrasound Studies." *BMC Medicine* 13 (1): 229. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0459-4>.
- Baraki, Hassina, Igor Tudorache, Maïke Braun, Klaus Höffler, Adelheid Görler, Artur Lichtenberg, Christopher Bara, et al. 2009. "Orthotopic Replacement of the Aortic Valve with Decellularized Allograft in a Sheep Model." *Biomaterials* 30 (31): 6240–46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.068>.
- Bea, Florian, Erwin Blessing, Brian Bennett, Michael Levitz, Elizabeth P. Wallace, and Michael E. Rosenfeld. 2002. "Simvastatin Promotes Atherosclerotic Plaque Stability in apoE-Deficient Mice Independently of Lipid Lowering." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (11): 1832–37.
- Bellamy, Michael F., Patricia A. Pellikka, Kyle W. Klarich, A. Jamil Tajik, and Maurice Enriquez-Sarano. 2002. "Association of Cholesterol Levels, Hydroxymethylglutaryl Coenzyme-A Reductase Inhibitor Treatment, and Progression of Aortic Stenosis in the Community." *Journal of the American College of Cardiology* 40 (10): 1723–30.
- Bespalova, I. D., N. V. Riazantseva, V. V. Kaliuzhin, B. Iu Murashev, I. A. Osikhov, and Iu A. Mediantsev. 2014. "[Effect of atorvastatin on pro-inflammatory status (in vivo and in vitro) in patients with essential hypertension and metabolic syndrome]." *Kardiologija* 54 (8): 37–43.
- Boccafoschi, Francesca, Margherita Botta, Luca Fusaro, Francesco Copes, Martina Ramella, and Mario Cannas. 2015. "Decellularized Biological Matrices: An Interesting Approach for Cardiovascular Tissue Repair and Regeneration." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, October. <https://doi.org/10.1002/term.2103>.
- Bonnet, Jacques, R. McPherson, A. Tedgui, D. Simoneau, A. Nozza, P. Martineau, Jean Davignon, and CAP Investigators. 2008. "Comparative Effects of 10-Mg versus 80-Mg Atorvastatin on High-Sensitivity C-Reactive Protein in Patients with Stable Coronary Artery Disease: Results of the CAP (Comparative Atorvastatin Pleiotropic Effects) Study." *Clinical Therapeutics* 30 (12): 2298–2313. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.12.023>.
- Brown, B. G., X. Q. Zhao, D. E. Sacco, and J. J. Albers. 1993. "Lipid Lowering and Plaque Regression. New Insights into Prevention of Plaque Disruption and Clinical Events in Coronary Disease." *Circulation* 87 (6): 1781–91.
- Brown, John W., Mark Ruzmetov, Toshihiro Fukui, Mark D. Rodefeld, Yousuf Mahomed, and Mark W. Turrentine. 2006. "Fate of the Autograft and Homograft Following Ross Aortic Valve Replacement: Reoperative Frequency, Outcome, and Management." *The Journal of Heart Valve Disease* 15 (2): 253–259; discussion 259–260.
- Brown, M. S., S. K. Basu, J. R. Falck, Y. K. Ho, and J. L. Goldstein. 1980. "The Scavenger Cell Pathway for Lipoprotein Degradation: Specificity of the Binding Site That Mediates the Uptake of Negatively-Charged LDL by Macrophages." *Journal of Supramolecular Structure* 13 (1): 67–81. <https://doi.org/10.1002/jss.400130107>.
- Calza, Leonardo, Filippo Trapani, Michele Bartoletti, Roberto Manfredi, Vincenzo Colangeli, Marco Borderi, Gabriele Grossi, Roberto Motta, and Pierluigi Viale. 2012. "Statin Therapy Decreases Serum Levels of High-Sensitivity C-Reactive Protein and Tumor Necrosis Factor- α in HIV-Infected Patients Treated with Ritonavir-Boosted Protease Inhibitors." *HIV Clinical Trials* 13 (3): 153–61. <https://doi.org/10.1310/hct1303-153>.
- Carabello, Blase A. 2011. "Transcatheter Aortic-Valve Implantation for Aortic Stenosis in Patients Who Cannot Undergo Surgery." *Current Cardiology Reports* 13 (3): 173–74. <https://doi.org/10.1007/s11886-011-0173-6>.
- Chikwe, Joanna, Farzan Filsoufi, and Alain F. Carpentier. 2010. "Prosthetic Valve Selection for Middle-Aged Patients with Aortic Stenosis." *Nature Reviews. Cardiology* 7 (12): 711–19. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.164>.
- Cowell, S. Joanna, David E. Newby, Robin J. Prescott, Peter Bloomfield, John Reid, David B. Northridge, Nicholas A. Boon, and Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression (SALTIRE) Investigators. 2005. "A Randomized Trial of

- Intensive Lipid-Lowering Therapy in Calcific Aortic Stenosis." *The New England Journal of Medicine* 352 (23): 2389–97. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043876>.
- Dimitrow, Pawel Petkow, Marek Jawieñ, and Andrzej Gackowski. 2011. "The Influence of Statins on Levels of Calcification Biomarkers in Patients with Aortic Sclerosis or Mild Aortic Stenosis." *The Journal of Heart Valve Disease* 20 (1): 18–22.
- Drolet, Marie-Claude, Jaques Couet, and Marie Arsenault. 2008. "Development of Aortic Valve Sclerosis or Stenosis in Rabbits: Role of Cholesterol and Calcium." *The Journal of Heart Valve Disease* 17 (4): 381–87.
- El-Ahdab, Fadi, Daniel Kelly Benjamin, Andrew Wang, Christopher H. Cabell, Vivian H. Chu, Martin E. Stryjewski, G. Ralph Corey, Daniel J. Sexton, L. Barth Reller, and Vance G. Fowler. 2005. "Risk of Endocarditis among Patients with Prosthetic Valves and Staphylococcus Aureus Bacteremia." *The American Journal of Medicine* 118 (3): 225–29.
- Farivar, Robert Saeid, and Lawrence H. Cohn. 2003. "Hypercholesterolemia Is a Risk Factor for Bioprosthetic Valve Calcification and Explantation." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 126 (4): 969–75. <https://doi.org/10.1016/S0022>.
- Fernández-Ortiz, A., J. J. Badimon, E. Falk, V. Fuster, B. Meyer, A. Mailhac, D. Weng, P. K. Shah, and L. Badimon. 1994. "Characterization of the Relative Thrombogenicity of Atherosclerotic Plaque Components: Implications for Consequences of Plaque Rupture." *Journal of the American College of Cardiology* 23 (7): 1562–69.
- Golczyk, Karl, Martin Kompis, Lars Englberger, Thierry P. Carrel, and Mario Stalder. 2010. "Heart Valve Sound of Various Mechanical Composite Grafts, and the Impact on Patients' Quality of Life." *The Journal of Heart Valve Disease* 19 (2): 228–32.
- Grauss, R. W., M. G. Hazekamp, S. van Vliet, A. C. Gittenberger-de Groot, and M. C. DeRuiter. 2003. "Decellularization of Rat Aortic Valve Allografts Reduces Leaflet Destruction and Extracellular Matrix Remodeling." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 126 (6): 2003–10. <https://doi.org/10.1016/S0022>.
- Gring, Christian N., Penny Houghtaling, Gian M. Novaro, Eric Roselli, Nicholas Smedira, Michael Banbury, Eugene Blackstone, and Brian P. Griffin. 2006. "Preoperative Cholesterol Levels Do Not Predict Explant for Structural Valve Deterioration in Patients Undergoing Bioprosthetic Aortic Valve Replacement." *The Journal of Heart Valve Disease* 15 (2): 261–68.
- Hashimoto, Yoshihide, Seiichi Funamoto, Shuji Sasaki, Takako Honda, Shinya Hattori, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, et al. 2010. "Preparation and Characterization of Decellularized Cornea Using High-Hydrostatic Pressurization for Corneal Tissue Engineering." *Biomaterials* 31 (14): 3941–48. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.122>.
- Heart Protection Study Collaborative Group. 2002. "MRC/BHF Heart Protection Study of Cholesterol Lowering with Simvastatin in 20,536 High-Risk Individuals: A Randomised Placebo-Controlled Trial." *Lancet (London, England)* 360 (9326): 7–22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09327-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09327-3).
- Hodde, Jason, Abram Janis, David Ernst, David Zopf, Debra Sherman, and Chad Johnson. 2007. "Effects of Sterilization on an Extracellular Matrix Scaffold: Part I. Composition and Matrix Architecture." *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 18 (4): 537–43. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-2300-x>.
- Hoerstrup, S. P., R. Sodian, S. Daebritz, J. Wang, E. A. Bacha, D. P. Martin, A. M. Moran, et al. 2000. "Functional Living Trileaflet Heart Valves Grown in Vitro." *Circulation* 102 (19 Suppl 3): III44-49.
- Hopkins, Richard A., Alyce Linthurst Jones, Lloyd Wolfenbarger, Mark A. Moore, Arthur A. Bert, and Gary K. Lofland. 2009. "Decellularization Reduces Calcification While Improving Both Durability and 1-Year Functional Results of Pulmonary Homograft Valves in Juvenile Sheep." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 137 (4): 907–13. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.12.009>.
- Hopkinson, Andrew, Vijay A. Shanmuganathan, Trevor Gray, Aaron M. Yeung, James Lowe, David K. James, and Harminder S. Dua. 2008. "Optimization of Amniotic Membrane (AM) Denuding for Tissue Engineering." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 14 (4): 371–81. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0315>.

- Hoshina, Mizuho, Hiroshi Wada, Kenichi Sakakura, Norifumi Kubo, Nahoko Ikeda, Yoshitaka Sugawara, Takanori Yasu, Junya Ako, and Shin-Ichi Momomura. 2012. "Determinants of Progression of Aortic Valve Stenosis and Outcome of Adverse Events in Hemodialysis Patients." *Journal of Cardiology* 59 (1): 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.jcc.2011.10.003>.
- Hurks, R., I. E. Hofer, A. Vink, G. Pasterkamp, A. Schoneveld, M. Kerver, J.-P. P. M. de Vries, M. J. Tangelder, and F. L. Moll. 2010. "Different Effects of Commonly Prescribed Statins on Abdominal Aortic Aneurysm Wall Biology." *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 39 (5): 569–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2010.01.030>.
- Ikonomidis, Ignatios, Christos A. Michalakeas, John Parissis, Ioannis Paraskevidis, Konstantina Ntai, Ioannis Papadakis, Maria Anastasiou-Nana, and John Lekakis. 2012. "Inflammatory Markers in Coronary Artery Disease." *BioFactors (Oxford, England)* 38 (5): 320–28. <https://doi.org/10.1002/biof.1024>.
- Izidoro-Toledo, Tatiane C., Danielle A. Guimaraes, Vanessa A. Belo, Raquel F. Gerlach, and Jose Eduardo Tanus-Santos. 2011. "Effects of Statins on Matrix Metalloproteinases and Their Endogenous Inhibitors in Human Endothelial Cells." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 383 (6): 547–54. <https://doi.org/10.1007/s00210-011-0623-0>.
- Jain, Mukesh K., and Paul M. Ridker. 2005. "Anti-Inflammatory Effects of Statins: Clinical Evidence and Basic Mechanisms." *Nature Reviews. Drug Discovery* 4 (12): 977–87. <https://doi.org/10.1038/nrd1901>.
- Janardhanan, Rajiv, Bin Xia Yang, Pawan Vohra, Bhaskar Roy, Sarah Withers, Santanu Bhattacharya, Jaywant Mandrekar, et al. 2013. "Simvastatin Reduces Venous Stenosis Formation in a Murine Hemodialysis Vascular Access Model." *Kidney International* 84 (2): 338–52. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.112>.
- Jasińska, Magdalena, Jacek Owczarek, and Daria Orszulak-Michalak. 2007. "Statins: A New Insight into Their Mechanisms of Action and Consequent Pleiotropic Effects." *Pharmacological Reports: PR* 59 (5): 483–99.
- Jialal, I., D. Stein, D. Balis, S. M. Grundy, B. Adams-Huet, and S. Devaraj. 2001. "Effect of Hydroxymethyl Glutaryl Coenzyme a Reductase Inhibitor Therapy on High Sensitive C-Reactive Protein Levels." *Circulation* 103 (15): 1933–35.
- Kasimir, M. T., E. Rieder, G. Seebacher, G. Silberhumer, E. Wolner, G. Weigel, and P. Simon. 2003. "Comparison of Different Decellularization Procedures of Porcine Heart Valves." *The International Journal of Artificial Organs* 26 (5): 421–27.
- Kasimir, Marie-Theres, Erwin Rieder, Gernot Seebacher, Anneliese Nigisch, Barbara Dekan, Ernst Wolner, Guenter Weigel, and Paul Simon. 2006. "Decellularization Does Not Eliminate Thrombogenicity and Inflammatory Stimulation in Tissue-Engineered Porcine Heart Valves." *The Journal of Heart Valve Disease* 15 (2): 278–286; discussion 286.
- Kini, Annapoorna S., Usman Baber, Jason C. Kovacic, Atul Limaye, Ziad A. Ali, Joseph Sweeny, Akiko Maehara, et al. 2013. "Changes in Plaque Lipid Content after Short-Term Intensive versus Standard Statin Therapy: The YELLOW Trial (Reduction in Yellow Plaque by Aggressive Lipid-Lowering Therapy)." *Journal of the American College of Cardiology* 62 (1): 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.03.058>.
- Klingenberg, Roland, and Göran K. Hansson. 2009. "Treating Inflammation in Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Emerging Therapies." *European Heart Journal* 30 (23): 2838–44. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp477>.
- Koniari, Ioanna, Dimosthenis Mavrilas, Efstratios Apostolakis, Evangelia Papadimitriou, Helen Papadaki, Apostolos Papalois, Evangelia Poimenidi, Ioanna Xanthopoulou, George Hahalis, and Dimitrios Alexopoulos. 2015. "Inhibition of Atherosclerosis Progression, Intimal Hyperplasia, and Oxidative Stress by Simvastatin and Ivabradine May Reduce Thoracic Aorta's Stiffness in Hypercholesterolemic Rabbits." *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, November. <https://doi.org/10.1177/1074248415617289>.
- Kulik, Alexander, Roy G. Masters, Pierre Bédard, Paul J. Hendry, B.-Khanh Lam, Fraser D. Rubens, Thierry G. Mesana, and Marc Ruel. 2010. "Postoperative Lipid-Lowering

- Therapy and Bioprosthesis Structural Valve Deterioration: Justification for a Randomised Trial?" *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 37 (1): 139–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2009.06.051>.
- Kulik, Alexander, Pierre Voisine, Patrick Mathieu, Roy G. Masters, Thierry G. Mesana, Michel R. Le May, and Marc Ruel. 2011. "Statin Therapy and Saphenous Vein Graft Disease after Coronary Bypass Surgery: Analysis from the CASCADE Randomized Trial." *The Annals of Thoracic Surgery* 92 (4): 1284-1290; discussion 1290-1291. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.04.107>.
- Lee, Cheng-Hung, Shang-Hung Chang, Yu-Huang Lin, Shih-Jung Liu, Chao-Jan Wang, Ming-Yi Hsu, Kuo-Chun Hung, et al. 2014. "Acceleration of Re-Endothelialization and Inhibition of Neointimal Formation Using Hybrid Biodegradable Nanofibrous Rosuvastatin-Loaded Stents." *Biomaterials* 35 (15): 4417–27. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.017>.
- Légaré, J. F., M. A. Nanton, P. Bryan, T. D. Lee, and D. B. Ross. 2000. "Aortic Valve Graft Implantation in Rats: A New Functional Model." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 120 (4): 679–85. <https://doi.org/10.1067/jmtc.2000.109239>.
- Lehr, Eric J., Gina R. Rayat, Brian Chiu, Thomas Churchill, Locksley E. McGann, James Y. Coe, and David B. Ross. 2011. "Decellularization Reduces Immunogenicity of Sheep Pulmonary Artery Vascular Patches." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 141 (4): 1056–62. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.02.060>.
- Li, Z., L. Li, H. R. Zielke, L. Cheng, R. Xiao, M. T. Crow, W. G. Stetler-Stevenson, J. Froehlich, and E. G. Lakatta. 1996. "Increased Expression of 72-Kd Type IV Collagenase (MMP-2) in Human Aortic Atherosclerotic Lesions." *The American Journal of Pathology* 148 (1): 121–28.
- Libby, Peter, Yoshihisa Okamoto, Viviane Z. Rocha, and Eduardo Folco. 2010. "Inflammation in Atherosclerosis: Transition from Theory to Practice." *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 74 (2): 213–20.
- Linefsky, Jason P., Kevin D. O'Brien, Ronit Katz, Ian H. de Boer, Eddy Barasch, Nancy S. Jenny, David S. Siscovick, and Bryan Kestenbaum. 2011. "Association of Serum Phosphate Levels with Aortic Valve Sclerosis and Annular Calcification: The Cardiovascular Health Study." *Journal of the American College of Cardiology* 58 (3): 291–97. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.11.073>.
- Loftus, I. M., A. R. Naylor, S. Goodall, M. Crowther, L. Jones, P. R. Bell, and M. M. Thompson. 2000. "Increased Matrix Metalloproteinase-9 Activity in Unstable Carotid Plaques. A Potential Role in Acute Plaque Disruption." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 31 (1): 40–47.
- Lopes, Sergio Augusto Veiga, Francisco Diniz Affonso da Costa, Josué Brudginski de Paula, Pascal Dhomen, Felipe Phol, Ricardo Vilani, João Gabriel Roderjan, and Eduardo Discher Vieira. 2009. "Decellularized Heterografts versus Cryopreserved Homografts: Experimental Study in Sheep Model." *Revista Brasileira De Cirurgia Cardiovascular: Órgão Oficial Da Sociedade Brasileira De Cirurgia Cardiovascular* 24 (1): 15–22.
- Lorusso, Roberto, Domenico Corradi, Roberta Maestri, Silvia Bosio, Alessandra Curulli, Cesare Beghi, Piersilvio Gerometta, et al. 2010. "Atorvastatin Attenuates Post-Implant Tissue Degeneration of Cardiac Prosthetic Valve Bovine Pericardial Tissue in a Subcutaneous Animal Model." *International Journal of Cardiology* 141 (1): 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.11.174>.
- Lu, Lin, Wen-Hui Peng, Wei Wang, Ling-Jie Wang, Qiu-Jing Chen, and Wei-Feng Shen. 2011. "Effects of Atorvastatin on Progression of Diabetic Nephropathy and Local RAGE and Soluble RAGE Expressions in Rats." *Journal of Zhejiang University. Science. B* 12 (8): 652–59. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1101004>.
- Ma, Wenlin, Dan Shen, Jie Liu, Jiangqi Pan, Lu Yu, Weiqi Shi, Liang Deng, et al. 2015. "Statin Function as an Anti- Inflammation Therapy for Depression in Patients with Coronary Artery Disease by Downregulating Interleukin-1 β ." *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, September. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000323>.

- Meyer, Steven R., Brian Chiu, Thomas A. Churchill, Linfu Zhu, Jonathan R. T. Lakey, and David B. Ross. 2006. "Comparison of Aortic Valve Allograft Decellularization Techniques in the Rat." *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 79 (2): 254–62.
- Meyer, Steven R., Jeevan Nagendran, Leena S. Desai, Gina R. Rayat, Thomas A. Churchill, Colin C. Anderson, Ray V. Rajotte, Jonathan R. T. Lakey, and David B. Ross. 2005. "Decellularization Reduces the Immune Response to Aortic Valve Allografts in the Rat." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 130 (2): 469–76. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2005.03.021>.
- Monzack, Elyssa L., and Kristyn S. Masters. 2012. "A Time Course Investigation of the Statin Paradox among Valvular Interstitial Cell Phenotypes." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 303 (7): H903-909. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00263.2012>.
- Moura, Luis M., Sandra F. Ramos, José L. Zamorano, Isabel M. Barros, Luis F. Azevedo, Francisco Rocha-Gonçalves, and Nalini M. Rajamannan. 2007. "Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium to Slow the Progression of Aortic Stenosis." *Journal of the American College of Cardiology* 49 (5): 554–61. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.072>.
- Munakata, Hiroshi, Alexander Assmann, Bhawana Poudel-Bochmann, Kim Horstkötter, Hiroyuki Kamiya, Yutaka Okita, Artur Lichtenberg, and Payam Akhyari. 2013. "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." *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 77 (9): 2295–2302.
- Nezić, Lana, Ranko Skrbić, Silva Dobrić, Milos P. Stojiljković, Vesna Jačević, Svjetlana Stoisavljević Satara, Zoran A. Milovanović, and Natasa Stojaković. 2009. "Simvastatin and Indomethacin Have Similar Anti-Inflammatory Activity in a Rat Model of Acute Local Inflammation." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 104 (3): 185–91. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00302.x>.
- Ngo, Doan T. M., Irene Stafford, Darren J. Kelly, Aaron L. Sverdlov, Ronald D. Wuttke, Helen Weedon, Angus K. Nightingale, et al. 2008. "Vitamin D(2) Supplementation Induces the Development of Aortic Stenosis in Rabbits: Interactions with Endothelial Function and Thioredoxin-Interacting Protein." *European Journal of Pharmacology* 590 (1–3): 290–96. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.051>.
- Novaro, G. M., I. Y. Tiong, G. L. Pearce, M. S. Lauer, D. L. Sprecher, and B. P. Griffin. 2001. "Effect of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme a Reductase Inhibitors on the Progression of Calcific Aortic Stenosis." *Circulation* 104 (18): 2205–9.
- Numata, Satoshi, Toshiya Fujisato, Kazuo Niwaya, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takeshi Nakatani, and Soichiro Kitamura. 2004. "Immunological and Histological Evaluation of Decellularized Allograft in a Pig Model: Comparison with Cryopreserved Allograft." *The Journal of Heart Valve Disease* 13 (6): 984–90.
- Oei, F. B., M. J. Welters, F. Bonthuis, L. M. Vaessen, R. L. Marquet, P. E. Zondervan, W. Weimar, and A. J. Bogers. 1999. "A Size-Matching Heterotopic Aortic Valve Implantation Model in the Rat." *The Journal of Surgical Research* 87 (2): 239–44. <https://doi.org/10.1006/jsre.1999.5763>.
- Park, Moon Seok, Tae Gyun Kim, Kyoung Min Lee, Chin Youb Chung, Soon-Sun Kwon, Il-Hee Yoon, and Chung-Gyu Park. 2014. "Effects of Reduction in the Alpha-Gal Antigen on Bony Union: A Model of Xenobone Graft Using GalT Knockout Mouse." *Xenotransplantation* 21 (3): 267–73. <https://doi.org/10.1111/xen.12092>.
- Prabha, S., and S. Verghese. 2008. "Existence of Proviral Porcine Endogenous Retrovirus in Fresh and Decellularised Porcine Tissues." *Indian Journal of Medical Microbiology* 26 (3): 228–32.
- Pullan, Mark, John Chalmers, Neeraj Mediratta, Matthew Shaw, James McShane, and Michael Poullis. 2014. "Statins and Long-Term Survival after Isolated Valve Surgery: The Importance of Valve Type, Position and Procedure." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 45 (3): 419-424; discussion 424-425. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezt399>.

- Qiang, Beiping, Jonathan Toma, Hiroko Fujii, Azriel B. Osherov, Nafiseh Nili, John D. Sparkes, Paul Fefer, et al. 2012. "Statin Therapy Prevents Expansive Remodeling in Venous Bypass Grafts." *Atherosclerosis* 223 (1): 106–13. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.013>.
- Ray, Kausik K., and Christopher P. Cannon. 2005. "Early Time to Benefit with Intensive Statin Treatment: Could It Be the Pleiotropic Effects?" *The American Journal of Cardiology* 96 (5A): 54F–60F. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.06.027>.
- Rosenhek, Raphael, Florian Rader, Nicole Loho, Harald Gabriel, Maria Heger, Ursula Klaar, Michael Schemper, Thomas Binder, Gerald Maurer, and Helmut Baumgartner. 2004. "Statins but Not Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Delay Progression of Aortic Stenosis." *Circulation* 110 (10): 1291–95. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000140723.15274.53>.
- Ross, R., J. Glomset, and L. Harker. 1977. "Response to Injury and Atherogenesis." *The American Journal of Pathology* 86 (3): 675–84.
- Rossebø, Anne B., Terje R. Pedersen, Kurt Boman, Philippe Brudi, John B. Chambers, Kenneth Egstrup, Eva Gerds, et al. 2008. "Intensive Lipid Lowering with Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis." *The New England Journal of Medicine* 359 (13): 1343–56.
- Schenke-Layland, K., F. Opitz, M. Gross, C. Döring, K. J. Halbhuber, F. Schirrmeister, Th Wahlers, and U. A. Stock. 2003. "Complete Dynamic Repopulation of Decellularized Heart Valves by Application of Defined Physical Signals-an in Vitro Study." *Cardiovascular Research* 60 (3): 497–509.
- Schuett, Harald, Maren Luchtefeld, Christina Grothusen, Karsten Grote, and Bernhard Schieffer. 2009. "How Much Is Too Much? Interleukin-6 and Its Signalling in Atherosclerosis." *Thrombosis and Haemostasis* 102 (2): 215–22. <https://doi.org/10.1160/TH09-05-0297>.
- Shetty, R., P. Pibarot, A. Audet, R. Janvier, F. Dagenais, J. Perron, C. Couture, P. Voisine, J. P. Després, and P. Mathieu. 2009. "Lipid-Mediated Inflammation and Degeneration of Bioprosthetic Heart Valves." *European Journal of Clinical Investigation* 39 (6): 471–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02132.x>.
- Simionescu, A., D. Simionescu, and R. Deac. 1996. "Biochemical Pathways of Tissue Degeneration in Bioprosthetic Cardiac Valves. The Role of Matrix Metalloproteinases." *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)* 42 (5): M561-567.
- Simon, P., M. T. Kasimir, G. Seebacher, G. Weigel, R. Ullrich, U. Salzer-Muhar, E. Rieder, and E. Wolner. 2003. "Early Failure of the Tissue Engineered Porcine Heart Valve SYNERGRAFT in Pediatric Patients." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 23 (6): 1002–1006; discussion 1006.
- Sparrow, C. P., C. A. Burton, M. Hernandez, S. Mundt, H. Hassing, S. Patel, R. Rosa, et al. 2001. "Simvastatin Has Anti-Inflammatory and Antiatherosclerotic Activities Independent of Plasma Cholesterol Lowering." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21 (1): 115–21.
- St. Jude Medical. o. J. "Biologische Herzklappen (Website)." <http://www.mrtinfo.de/Downloads/Structural-Heart/Biologische-Herzklappen>. [Zuletzt abgerufen am 25.05.2018]
- St. Jude Medical. o. J. "Mechanische Herzklappen (Website)." <http://www.mrtinfo.de/Downloads/Structural-Heart/Mechanische-Herzklappen>. [Zuletzt abgerufen am 25.05.2018]
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden. 2015. "Todesursachen in Deutschland Fachserie 12 Reihe 4 - 2014." https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/To desursachen2120400147004.pdf?__blob=publicationFile. [Zuletzt abgerufen am 25.05.2018]
- Stirban, Alin, Thomas Gawlowski, and Michael Roden. 2013. "Vascular Effects of Advanced Glycation Endproducts: Clinical Effects and Molecular Mechanisms." *Molecular Metabolism* 3 (2): 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.006>.

- Stoll, Guido, and Martin Bendszus. 2006. "Inflammation and Atherosclerosis: Novel Insights into Plaque Formation and Destabilization." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 37 (7): 1923–32. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000226901.34927.10>.
- Sun, H., X. Lu, S. Wu, and W. Sun. 2009. "The Effects of C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Rat Allograft Adventitial Inflammation and Allograft Arteriosclerosis." *Transplantation Proceedings* 41 (9): 3909–12. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.06.190>.
- Tang, F. T., S. R. Chen, X. Q. Wu, T. Q. Wang, J. W. Chen, J. Li, L. P. Bao, H. Q. Huang, and P. Q. Liu. 2006. "Hypercholesterolemia Accelerates Vascular Calcification Induced by Excessive Vitamin D via Oxidative Stress." *Calcified Tissue International* 79 (5): 326–39. <https://doi.org/10.1007/s00223-006-0004-8>.
- Tawakol, Ahmed, Zahi A. Fayad, Robin Mogg, Achilles Alon, Michael T. Klimas, Hayes Dansky, Sharath S. Subramanian, et al. 2013. "Intensification of Statin Therapy Results in a Rapid Reduction in Atherosclerotic Inflammation: Results of a Multicenter Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography/Computed Tomography Feasibility Study." *Journal of the American College of Cardiology* 62 (10): 909–17. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.04.066>.
- Tsai, Tsung-Neng, John Paul Kirton, Paola Campagnolo, Li Zhang, Qingzhong Xiao, Zhongyi Zhang, Wen Wang, Yanhua Hu, and Qingbo Xu. 2012. "Contribution of Stem Cells to Neointimal Formation of Decellularized Vessel Grafts in a Novel Mouse Model." *The American Journal of Pathology* 181 (1): 362–73. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.021>.
- Vaughan, C. J., A. M. Gotto, and C. T. Basson. 2000. "The Evolving Role of Statins in the Management of Atherosclerosis." *Journal of the American College of Cardiology* 35 (1): 1–10.
- Vesely, Ivan. 2005. "Heart Valve Tissue Engineering." *Circulation Research* 97 (8): 743–55.
- Waehre, Torgun, Arne Yndestad, Camilla Smith, Terje Haug, Siv Haugen Tunheim, Lars Gullestad, Stig S. Frøland, Anne G. Semb, Pål Aukrust, and Jan K. Damås. 2004. "Increased Expression of Interleukin-1 in Coronary Artery Disease with Downregulatory Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors." *Circulation* 109 (16): 1966–72. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000125700.33637.B1>.
- Wainwright, John M., Caitlin A. Czajka, Urvi B. Patel, Donald O. Freytes, Kimimasa Tobita, Thomas W. Gilbert, and Stephen F. Badylak. 2010. "Preparation of Cardiac Extracellular Matrix from an Intact Porcine Heart." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 16 (3): 525–32. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0392>.
- Weber, Miriam, Israel Gonzalez de Torre, Ricardo Moreira, Julia Frese, Caroline Oedekoven, Matilde Alonso, Carlos J. Rodriguez Cabello, Stefan Jockenhoevel, and Petra Mela. 2015. "Multiple-Step Injection Molding for Fibrin-Based Tissue-Engineered Heart Valves." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 21 (8): 832–40.
- Wei, Qin, Xiaomei Ren, Yibo Jiang, Hong Jin, Naifeng Liu, and Jie Li. 2013. "Advanced Glycation End Products Accelerate Rat Vascular Calcification through RAGE/Oxidative Stress." *BMC Cardiovascular Disorders* 13: 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-13-13>.
- Weis, M., S. Pehlivanli, B. M. Meiser, and W. von Scheidt. 2001. "Simvastatin Treatment Is Associated with Improvement in Coronary Endothelial Function and Decreased Cytokine Activation in Patients after Heart Transplantation." *Journal of the American College of Cardiology* 38 (3): 814–18.
- Xu, Chet C., Roger W. Chan, and Neeraj Tirunagari. 2007. "A Biodegradable, Acellular Xenogeneic Scaffold for Regeneration of the Vocal Fold Lamina Propria." *Tissue Engineering* 13 (3): 551–66. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0169>.
- Xu, Yiguan, Shenghua Zhou, Zhenfei Fang, Xuping Li, Dekui Huang, Qiliang Liu, and Chunhua Zheng. 2014. "Inhibition of Neointimal Hyperplasia in Rats Treated with Atorvastatin after Carotid Artery Injury May Be Mainly Associated with down-Regulation of Survivin and Fas Expression." *Pharmaceutical Biology* 52 (9): 1196–1203. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.884605>.
- Yang, Bin, Yifen Zhang, Liuhua Zhou, Zeyu Sun, Junhua Zheng, Yun Chen, and Yutian Dai. 2010. "Development of a Porcine Bladder Acellular Matrix with Well-Preserved

- Extracellular Bioactive Factors for Tissue Engineering." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 16 (5): 1201–11. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0311>.
- Zhang, Li, Heng Jin, Jianfei Huang, Huihe Lu, Yunyuan Guan, Xiaolan Chen, and Hua Sun. 2012. "Local Delivery of Pravastatin Inhibits Intimal Formation in a Mouse Vein Graft Model." *The Canadian Journal of Cardiology* 28 (6): 750–57. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2012.01.018>.
- Zhao, X. Q., C. Yuan, T. S. Hatsukami, E. H. Frechette, X. J. Kang, K. R. Maravilla, and B. G. Brown. 2001. "Effects of Prolonged Intensive Lipid-Lowering Therapy on the Characteristics of Carotid Atherosclerotic Plaques in Vivo by MRI: A Case-Control Study." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21 (10): 1623–29.

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg danke ich für Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit in der Forschungsgruppe „Experimentelle Chirurgie“ durchführen zu können

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, für seine wertvollen Ratschläge und konstruktive Kritik.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Alexander Assmann danke ich für Anleitung und Betreuung der Experimente, für die geduldige und kompetente Unterstützung bei allen Fragen und für seine unermüdliche Hilfe bei der Erstellung dieser Dissertation.

Herrn Dr. Hiroshi Munakata danke ich für die Durchführung der Echokardiografie-Kontrollen und Aortenklappen-Operationen.

Frau Gisela Müller und Frau Franziska Schiffer danke ich für die Durchführung der Realtime-PCR-Analysen.

Herrn Christofer Delfs, Frau Friderike Heidelberg, Herrn Kai Zwirnmann und dem restlichen Team der experimentellen Chirurgie Düsseldorf danke ich für die labortechnische Einarbeitung und für die Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen.

Die Blutserumwerte konnten freundlicherweise in Zusammenarbeit mit dem Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bestimmt werden.

Und zuletzt danke ich meiner Familie und meinem Verlobten für ihre Unterstützung und Geduld in all der Zeit.