

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

**Vergleichende Untersuchungen zur Degeneration von bovinem
Herzklappen-Bioprothesenmaterial in einem
Biglykan-defizienten Mausmodell**

Dissertation

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

Vorgelegt von

Antje Schomakers

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Zweitgutachter: PD Dr. med. Timo Brandenburger

In unendlicher Liebe meinen Eltern.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve.

Barth M, Selig JI, Klose S, Schomakers A, Kiene LS, Raschke S, Boeken U, Akhyari P, Fischer JW, Lichtenberg A.

Diab Vasc Dis Res. 2019 May;16(3):254-269. doi: 10.1177/147916411881792

Zusammenfassung

Herz-Kreislaufkrankungen führen die Statistik der Todesursachen in Deutschland an, was unter anderem einer stetig steigenden Lebenserwartung geschuldet ist. Trotz umfangreicher Forschung, Erlangung neuer Erkenntnisse und Entwicklung innovativer Pharmaka ist es nicht gelungen, die Gesamtmortalität zu reduzieren.

Zur Gruppe der Herz-Kreislaufkrankungen gehören die sogenannten Valvulopathien, die Erkrankungen der Herzklappen. Häufigster Behandlungsgrund ist hierbei die symptomatische Aortenklappenstenose, deren Hauptursache in den Industrienationen eine Verkalkung der Klappe durch degenerative Prozesse ist. Eine Therapieoption ist der Ersatz der Klappe durch biologisches Material. Hierzu wird u.a. vorbehandeltes Perikard vom Rind genutzt. Die Limitation dieser Therapie besteht in der Degeneration der implantierten Klappen mit konsekutiver Re-Operation.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von Biglykan, einem Bestandteil der Extrazellulärmatrix im Prozess der Degeneration von bovinem Herzklappen-Bioprothesenmaterial genauer zu untersuchen. Dazu wurde das Modell der ektopen Implantation in Biglykan *Knockout* Mäusen angewandt. Bei diesen Tieren ist die Synthese von Biglykan unterdrückt. Stenzen aus kommerziell erworbenem vorbehandeltem Rinderperikard wurden auf den Rückenmuskel der Tiere implantiert und nach mehrwöchiger Verweildauer mit Explantaten aus Wildtyp Mäusen verglichen.

Zur histologischen Untersuchung wurden Schnitte aus den Explantaten angefertigt, an denen sowohl Übersichts- als auch immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt wurden. In den Übersichtsfärbungen wurde die Zellmigrationstiefe gemessen und diese sowohl zeitabhängig als auch in Bezug auf den Genotyp der Mäuse verglichen. Nach 8 Wochen zeigte sich zunächst eine signifikant geringere Zellmigration in der Biglykan *Knockout* Gruppe, während sich dieser Effekt nach 16 Wochen nicht mehr zeigte.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Explantate mit Antikörpern getestet, die eine Spezifizierung der eingewanderten Zellen ermöglichen. Der Nachweis sowohl von Vimentin und Matrixmetalloproteinase 2, als auch das Fehlen von Desmin, von-Willebrand-Faktor und Ki-67 wiesen auf einen fibroblastoiden Zelltyp hin.

Des Weiteren erfolgte die Bestimmung des Kalziumgehalts der Explantate. Diese zeigte nach 8 Wochen in den Biglykan *Knockout* Mäusen eine signifikant höhere Kalziumkonzentration als in den Wildtypen, während es sich nach 16 Wochen umgekehrt verhielt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse vertiefen das Verständnis für die Rolle von Biglykan im Prozess der Degeneration von biologischem Herzklappenmaterial. Dies könnte in der Zukunft zu neuen Angriffspunkten in Prävention und Therapie führen und somit eine längere Haltbarkeit von implantierten Herzklappen begünstigen.

Abstract

Cardiovascular diseases lead the statistics of causes of death in Germany, which is due, among other factors, to a steadily increasing life expectancy. Despite extensive research, constant acquisition of new knowledge and the development of innovative pharmaceuticals, overall mortality could not yet be reduced.

The group of cardiovascular diseases includes the so-called valvulopathies, diseases of the heart valves. The most common reason for treatment is symptomatic aortic valve stenosis. In industrialized nations this is mainly caused by calcification of the valve due to degenerative processes. One therapeutic option is to replace the valve with biological material. For this purpose, pretreated bovine pericardium is used. A common limitation of this therapy is caused by degeneration of the implanted valve with subsequent re-surgery.

The aim of this work was to investigate the role of biglycan, a component of the extracellular matrix, in the process of degeneration of bovine heart valve bioprosthesis material. Therefore, a model of ectopic implantation in biglycan knockout mice was applied. In these animals, the synthesis of biglycan is suppressed. Patches from commercially acquired, pretreated bovine pericardium were implanted on the back muscle of the animals and compared with explants from wild type mice after a period of several weeks.

For histological examination explant sections were produced, on which both morphological and immunohistochemical stainings with various antibodies were performed. In the overview staining the depth of cell migration was measured and compared both in terms of time and with regard to the genotype of the mice. After eight weeks there was temporarily a significantly lower migratory cell number in the biglycan knockout group, while this effect was no longer evident after 16 weeks.

To specify the immigrated cell type, explants were analysed by immunohistochemical stainings. Detection of both vimentin and matrix metalloproteinase 2 as well as lack of desmin, von Willebrand factor and Ki-67 made the immigrated cells most likely to be judged as a fibroblastoid cell type. In addition, the calcium content of the explants was measured. After eight weeks the biglycan knockout mice showed a significantly higher calcium concentration than the wild types, while the opposite was true after 16 weeks.

The knowledge gained by this work deepens the understanding of the role of biglycan in the process of degeneration of biological heart valve material. In the future, this could lead to new targets in prevention and therapy and thus promote a longer life span of implanted heart valves.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| Aqua dest. | <i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser |
| BGN | Biglykan |
| <i>Bgn</i>⁺⁰ | Biglykan Wildtyp Mäuse |
| <i>Bgn</i>⁻⁰ | Biglykan <i>Knockout</i> Mäuse |
| BSA | <i>Bovines Serum Albumin</i> |
| CAVD | <i>Calcific aortic valve disease</i> , kalzifizierende Aortenklappenerkrankung |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> , Oberflächenmarker |
| cm | Zentimeter |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| dl | Deziliter |
| DPBS | <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| et al. | und andere |
| Fa. | Firma |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> , fetales Kälberserum |
| G | Gauge |
| g | Gramm |
| GAG | Glykosaminoglykan |
| h | <i>hours</i> , Stunden |
| HCl | Gelöster Chlorwasserstoff, Salzsäure |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich- peroxidase |
| IgG | Immunglobulin G |
| KO | <i>Knockout</i> |

| | |
|---------------|---|
| I | Liter |
| LANUV | Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz |
| M | Molare Masse |
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MMP-2 | Matrixmetalloproteinase 2 |
| n | Anzahl |
| NC | <i>Normal chow</i> , Normalfutter |
| nm | Nanometer |
| OD | <i>Optical density</i> , Absorption |
| OP | Operation |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| SLRP | <i>Small leucin-rich repeat proteoglycans</i> |
| SMA | <i>Smooth muscle actin</i> |
| SN | Seriennummer |
| SVD | <i>Structural valve degeneration</i> , Strukturelle Klappendegeneration |
| TAVI | <i>transcatheter aortic valve implantation</i> , Transkatheter- Aortenklappenimplantation |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TGF- β | <i>Transforming growth factor – beta</i> |
| TLR | <i>Toll like-Rezeptor</i> |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor alpha |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |

| | |
|-------------|---|
| VIC | <i>Valvular interstitial cell</i> , valvuläre Interstitialzelle |
| VitD | Vitamin D |
| vWF | Von Willebrand Faktor |
| w | <i>Weeks</i> , Wochen |
| Wo | Wochen |
| x | Mal, -fach |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZETT | Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| °C | Grad Celsius |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Klinische Thematik | 1 |
| 1.1.1 | Herz-Kreislaferkrankungen und Valvulopathien | 1 |
| 1.1.2 | Herzklappenersatz, mechanisch versus biologisch | 2 |
| 1.1.3 | Biologisches Material für Herzklappenprothesen | 3 |
| 1.1.4 | Extrazellulärmatrix und Biglykan | 4 |
| 1.1.5 | Biglykan <i>Knockout</i> Mäuse und das Modell der ektopen Implantation | 6 |
| 1.2 | Zielsetzung | 6 |
| 2 | Material und Methodik..... | 7 |
| 2.1 | Material..... | 7 |
| 2.1.1 | Mausmodell | 7 |
| 2.1.2 | Implantation..... | 7 |
| 2.1.3 | Explantation | 8 |
| 2.1.4 | Histologie und Immunhistologie | 8 |
| 2.1.5 | Kalziummessung | 13 |
| 2.1.6 | Geräte und Software | 13 |
| 2.1.7 | Verbrauchsmaterialien | 14 |
| 2.1.8 | Herstellerverzeichnis | 14 |
| 2.2 | Methodik | 16 |
| 2.2.1 | Mausmodell | 16 |
| 2.2.2 | Implantation des Bioprothesenmaterials | 17 |
| 2.2.3 | Explantation | 21 |
| 2.2.4 | Histologie und Immunhistologie | 23 |
| 2.2.5 | Kalziummessung | 28 |
| 2.2.6 | Zellmigration..... | 30 |
| 2.2.7 | Statistische Analyse | 31 |
| 3 | Ergebnisse | 31 |
| 3.1 | Makroskopische Beurteilung | 31 |
| 3.2 | Bestimmung des Kalziumgehaltes..... | 34 |
| 3.2.1 | Einfluss einer pro-kalzifizierenden Diät auf den Kalziumgehalt | 34 |
| 3.2.2 | Einfluss des Genotyps und der Implantationsdauer auf den Kalziumgehalt | 35 |
| 3.2.3 | Einfluss des verwendeten Patchmaterials auf den Kalziumgehalt..... | 37 |
| 3.3 | Histologische Auswertung..... | 39 |
| 3.3.1 | Übersichtsfärbung: Hämatoxylin Eosin | 39 |
| 3.3.2 | Übersichtsfärbung: Movat Pentachrom | 45 |
| 3.4 | Zellmigration..... | 50 |
| 3.4.1 | Einfluss des Genotyps und der Implantationsdauer auf die Zellmigration | 50 |
| 3.4.2 | Einfluss des verwendeten Patchmaterials auf die Zellmigration | 52 |
| 3.5 | Immunhistologie: Charakterisierung der eingewanderten Zellen | 53 |
| 4 | Diskussion | 64 |
| 4.1 | Diskussion der Ergebnisse | 64 |
| 4.2 | Diskussion der Methodik und Studienlimitierung | 68 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.2.1 | Tierversuch | 68 |
| 4.2.2 | Untersuchung der Explantate..... | 69 |
| 4.3 | Fazit und Ausblick | 69 |
| 5 | Literatur- und Quellenverzeichnis | 70 |
| 6 | Danksagung | |

1 Einleitung

1.1 Klinische Thematik

1.1.1 Herz-Kreislaufkrankungen und Valvulopathien

Die häufigste Todesursache in Deutschland ist mit 39,7% der Sterbefälle eine Herz-Kreislaufkrankung, was unter anderem auf eine steigende Lebenserwartung zurück zu führen ist [1] [2] [3]. Das Auftreten von Herz-Kreislaufkrankungen wird durch das Vorhandensein kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Übergewicht, hoher Blutdruck oder Diabetes mellitus begünstigt [4]. Neben der Verkalkung der Herzkranzgefäße (koronare Herzerkrankung) gehört auch die Kalkablagerung in den Klappen des Herzens zur Gruppe der Herz-Kreislaufkrankungen. Diese kann zu einer Fehlfunktion der Herzklappen führen, welche sich entweder in einer Stenose oder in einer Insuffizienz zeigt [5].

Im menschlichen Herzen befinden sich vier Herzklappen. Die sogenannten Segelklappen (Trikuspidalklappe und Mitralklappe) trennen die Herzvorhöfe von den Herzkammern. Die sogenannten Taschenklappen (Pulmonalklappe und Aortenklappe), leiten das Blut aus den Herzkammern in die Lungenstrombahn bzw. in den Körperkreislauf [6]. Alle vier Klappen können sowohl von Geburt an als auch im Laufe des Lebens erkranken und Fehlfunktionen aufweisen. Die häufigste im höheren Alter auftretende behandlungsbedürftige Herzklappenerkrankung ist die Aortenklappenstenose, gefolgt von der Mitralklappeninsuffizienz. Der Anteil der Aortenklappenstenosen bedingt durch degenerative Prozesse liegt bei knapp 82%, gefolgt von einer rheumatischen und kongenitalen Genese. Ebenso verhält es sich bei der Mitralklappeninsuffizienz, bei der die verkalkten Klappen mit circa 61% die größte Gruppe darstellen [7]. Diese Zahlen verdeutlichen, welchen Stellenwert diese Erkrankungen sowohl in Bezug auf die Morbidität und Mortalität als auch aus ökonomischer Sicht im Gesundheitswesen einnehmen.

Zur Einordnung der Thematik der vorliegenden Arbeit in den klinischen Kontext wird im Folgenden exemplarisch auf die Verkalkung der Aortenklappen mit

konsekutiver Stenose eingegangen, da dies die häufigste Indikation zur Anwendung eines biologischen Herzklappenersatzes darstellt [8].

1.1.2 Herzklappenersatz, mechanisch versus biologisch

Studien konnten zeigen, dass in einer unselektierten Population mit einem Lebensalter über 65 Jahren bei 26% der Probanden eine Aortenklappensklerose und bei 2% eine relevante Aortenklappenstenose festzustellen war. Bei den über 75-Jährigen zeigten sich sogar bei 37% sklerotische Veränderungen und bei 2,6% eine Aortenklappenstenose [5]. Die therapeutische Option bei einer Aortenklappenstenose besteht bislang aus einem Ersatz der Klappe. Hier gibt es zum einen die Möglichkeit, die erkrankte Klappe gegen eine mechanische Klappe auszutauschen. Die andere Option ist der biologische Herzklappenersatz. Hier wird aus tierischem Material eine neue Klappe konstruiert, die entweder über eine offene Operation oder aber über ein Katheterverfahren in den Patienten eingebracht wird.

Mechanische Herzklappen werden aus verschiedenen Materialien hergestellt. Meist bestehen große Anteile der Klappenprothese aus Metall, Carbon oder Titan [9] [10]. Der Vorteil von mechanischen Herzklappen ist die lebenslange Haltbarkeit, sofern es nicht zu Komplikationen mit Klappenfehlfunktionen kommt. Jedoch ist für diese lange Haltbarkeit eine lebenslange effektive Antikoagulation zur Minimierung eines Thrombembolie-Risikos notwendig. Dies kann aber nur gelingen, wenn eine dauerhafte Blutverdünnung ohne Unterbrechung gewährleistet ist. Bei Patienten mit mangelnder Compliance oder bei erhöhtem Blutungsrisiko durch Begleiterkrankungen kann dies problematisch werden [11]. Die Alternative zu mechanischen Klappen stellt wie oben genannt der biologische Klappenersatz dar. Biologische Herzklappen lassen sich in verschiedene Untergruppen aufteilen. Zum einen sind die sogenannten Autografts zu nennen. Diese stammen vom Patienten selbst und werden in speziellen herzchirurgischen Verfahren, wie zum Beispiel der „Ross-Operation“, verwendet, in welcher die erkrankte Aortenklappe durch die Pulmonalklappe ersetzt wird. Als Homografts werden Herzklappen von humanen Köperspendern bezeichnet. Diese spielen aber aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit nur eine untergeordnete Rolle [12].

Den größten Anteil der biologischen Herzklappen machen Xenografts aus. Hierbei handelt es sich um tierisches Material vom Schwein oder Rind. Wird porcines Material verwendet, wird eine modifizierte Aortenklappe vom Schwein in den Patienten eingepflanzt. Bei bovinem Material handelt es sich um den Herzbeutel (Perikard) des Rindes, aus dem eine neue Aortenklappe konstruiert wird [10]. Patienten mit einer implantierten Bioprothese bedürfen keiner dauerhaften Antikoagulation. Als führenden Unterschied bzw. Nachteil der ersten Generationen der Bioprothesen ist die erhöhte Degenerationsrate im Vergleich zum mechanischen Ersatz zu nennen. Aktuell betragen die Re-Operationsraten 10 Jahre nach Implantation der Bioprothese 3-20%, wobei es hier erhebliche Unterschiede in den Alterspopulationen gibt [13]. In jungen Patienten verkalken die Bioklappen signifikant schneller als bei älteren Patienten. Nahezu alle implantierten Klappen verkalken innerhalb von 5 Jahren bei Patienten unter 35 Jahren, während die Rate bei den über 65-Jährigen bei 10% nach 10 Jahren liegt [10].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Limitation der Haltbarkeit der biologischen Klappenprothesen fast ausschließlich durch deren Degeneration bedingt ist. Weitere Komplikationen wie eine Entzündung der Klappensegel (Endokarditis) oder ein Ausriss der eingenähten Klappe machen nur einen geringen Teil der Indikationen für eine erneute Operation aus. Dies verdeutlicht, wie wichtig die weitere Forschung im Hinblick auf Einflussfaktoren auf die Degeneration von biologischen Herzklappen ist, um eine längere Haltbarkeit zu gewährleisten und somit die Rate an Re-Operationen zu minimieren.

1.1.3 Biologisches Material für Herzklappenprothesen

Nach der ersten Implantation einer biologischen Herzklappe in Aortenposition 1965 durch Carpentier et al. in Paris wurde das tierische Material durch verschiedenste chemische Protokolle in seinen Eigenschaften immer weiter optimiert [14]. So werden mittlerweile nahezu alle kommerziell hergestellten Bioprothesen mit Glutaraldehyd behandelt, was zu einer reduzierten Antigenität und Thrombogenität sowie erhöhter Flexibilität und Haltbarkeit des Prothesenmaterials führt [15].

Hersteller verwenden unterschiedliche Verfahren, mit denen sie das Material vorbehandeln, um eine frühzeitige Degeneration der Klappen zu vermeiden [16]. Ursachen für degenerative Prozesse werden kontrovers diskutiert. Als Möglichkeiten für die schnellere Kalzifizierung bei jungen Patienten werden ein kompetenteres Immunsystem und ein rascherer Kalziumstoffwechsel angesehen [17]. Einigkeit besteht darüber, dass die Hauptursache der Verkalkung durch eine Reaktion zwischen Phospholipiden, Aldehydgruppen und anderen Bestandteilen der Klappe mit Kalziumionen aus dem Blut bedingt wird [18]. Durch diese Reaktion kommt es zu einer Kalkablagerung in der sogenannten Extrazellulärmatrix des Gewebes [19].

1.1.4 Extrazellulärmatrix und Biglykan

Die Extrazellulärmatrix beschreibt den Zusammenschluss von nichtzellulären Bestandteilen zu einem hochspezialisierten dreidimensionalen Gerüst in einem Gewebe. Sie besteht zu einem Großteil aus Kollagen, Proteoglykanen bzw. Glykosaminoglykanen, Elastin, Fibronectin und Lamininen, die im Zusammenspiel verschiedene Aufgaben übernehmen [20] [21]. Die Extrazellulärmatrix verleiht dem Gewebe Stabilität und Form und ist essentiell für eine regelhafte Funktion des Gewebes. Sie kommuniziert über die Oberflächenrezeptoren von Zellen und vermittelt so Signale, welche beispielsweise die Zelldifferenzierung und das Wachstum regulieren. Zudem ist die Extrazellulärmatrix für die Hydratation, also den Wasserhaushalt des Gewebes verantwortlich und regelt den lokalen pH-Wert zur optimalen Funktion der beteiligten Enzyme [22]. Die Matrix ist nicht als ein starrer Verbund anzusehen, sondern als eine dynamische Struktur, welche stets einem regulierten und kontrollierten Umbau unterliegt. Hierzu vermitteln Enzyme, wie beispielsweise Matrixmetalloproteasen (MMP), den Auf-, Um- und Abbau der Extrazellulärmatrix [23]. Fehlregulationen oder Störungen in diesem hochspezialisierten System führen zu Erkrankungen des betroffenen Gewebes oder Organs, welche sich im Verlust der spezifischen Eigenschaften zeigt [24]. Ein Bestandteil der Extrazellulärmatrix sind die sogenannten kleinen Leucinreichen Proteoglykane (*small leucin-rich proteoglycans*, SLRPs). Diese bestehen aus einem Proteinkern mit hohen Anteilen der Aminosäure Leucin, welche

kovalent an Glykosaminoglykane (GAG) gebunden sind. Durch die Kombination des Proteinkernes mit GAG in unterschiedlicher Art und Anzahl entstehen SLRPs, welche vielfältige Funktionen in der Extrazellulärmatrix übernehmen und über Oberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren oder Zytokine interagieren können [25]. Zu den bis dato am besten untersuchten Leucin-reichen Proteoglykanen gehört unter anderem Biglykan. An das Kernprotein sind hier zwei sulfatierte GAG-Ketten gebunden, entweder Chondroitinsulfat oder Dermatan-sulfat [26]. Biglykan trägt zur Strukturorganisation der Extrazellulärmatrix bei und spielt eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen einzelnen Zellen sowie in Entzündungsprozessen [21]. Proteolytisch freigesetzt aus der Extrazellulärmatrix zeigt es Gewebsverletzungen an und löst so eine Immunantwort aus [27]. Es aktiviert und initiiert eine Kaskade von proinflammatorischen Signalwegen. Da Biglykan an verschiedensten Rezeptortypen auf Zelloberflächen binden kann, potenziert sich die Immunreaktion und kann so wirksam auf die Störung im Gewebe reagieren [28]. Neben den Gewebe-übergreifenden Aufgaben übernimmt Biglykan auch spezifische Funktionen im spezialisierten Gewebe. Es spielt eine wichtige Rolle in der Stabilität neuromuskulärer Synapsen, hat eine entscheidende Funktion in der Knochenbildung und ist unerlässlich für einen stabilen Muskelaufbau [29]. Im kardiovaskulären System kommt Biglykan nahezu ubiquitär vor. So finden sich beispielsweise kräftige Filamente in der Aortenklappe oder in der Wand der Aorta [30]. Weiterhin ist die Bildung von arteriosklerotischen Plaques in Blutgefäßen assoziiert mit einer erhöhten Expression von Biglykan [31]. Auch die Bindung von Biglykan an Makrophagen und deren Retention fördert das Auftreten von Arteriosklerose [32].

Des Weiteren nimmt Biglykan eine wichtige Rolle in der Regulation der Kollagenbildung und -verteilung ein [33]. Ein Fehlen von Biglykan oder eine fehlerhafte Transkription führen zu abnormalen Kollagenfibrillen und somit zu pathologischem Verhalten des betroffenen Gewebes [27]. Welche Rolle Biglykan allerdings in der Kalzifizierung von implantiertem Fremdmaterial einnimmt ist aktueller Bestandteil der Forschung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in humanen degenerativ veränderten Aortenklappen eine signifikant höhere Genexpression von Biglykan stattfindet [34].

1.1.5 Biglykan *Knockout* Mäuse und das Modell der ektopen Implantation

Um die Funktionen und die Rolle von Biglykan noch besser zu verstehen und auch um mögliche Ansätze in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen zu finden, wurde in dieser Arbeit auf das Modell von Biglykan *Knockout* Mäusen (*Bgn*⁻⁰) zurückgegriffen. Hierbei handelt es sich um Mäuse, bei denen durch gezielte Manipulation am Genom die Synthese von Biglykan verhindert wurde [35] [36]. Dies geschah durch eine homologe Rekombination embryonaler Stammzellen. Durch Verwendung zweier unabhängiger Stammzellklone wurden chimäre Organismen generiert, die auf ihrem X-Chromosom das gewünschte Merkmal weitergeben [35]. So ließen sich speziell die Auswirkungen des Fehlens von Biglykan untersuchen, in dem man sie direkt mit Wildtypen (WT) verglich.

Da in dieser Arbeit die Auswirkungen von Biglykan auf einen biologischen Herzklappenersatz untersucht werden sollten, wurde das in der Literatur etablierte Modell der ektopen Implantation angewandt [37] [38]. Hierzu wurde das oben bereits beschriebene Rinderperikard, welches in der Klinik zur Konstruktion von biologischen Herzklappen verwendet wird, auf die Faszie der Rückenmuskulatur von Mäusen genäht. Nach einer gewissen Verweildauer in den Versuchstieren konnten die Explantate aus den *Bgn*⁻⁰ mit denen der WT verglichen werden und so direkte Schlüsse auf die Rolle von Biglykan gezogen werden.

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle von Biglykan in der Degeneration von biologischem Herzklappenmaterials zu untersuchen. Dafür soll in einem ektopen Implantationsmodell Bioprothesenmaterial epifaszial in *Bgn*⁻⁰ und WT implantiert und nach 8 bzw. 16 Wochen explantiert und analysiert werden. Dabei sollen zwei Arten von Bioprothesenmaterial untersucht und verglichen werden: 1) Glutaraldehyd-fixiertes Material und 2) unfixiertes Material. Mittels (Immun-)Histologie soll hier die Analyse von Veränderungen der Extrazellulärmatrix sowie die Analyse der eingewanderten Zellen und deren Eindringtiefe erfolgen. Weiterhin soll mithilfe eines kolorimetrischen Assays der Kalziumgehalt der Explantate untersucht werden.

Wenn es gelingt, prodegenerative Einflussfaktoren besser zu verstehen, könnte dies einen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapien oder Pharmazeutika zur verlängerten Haltbarkeit von Bioprothesen bilden. Somit würde es zu einer Verbesserung der Patientensicherheit kommen und auch aus ökonomischer Sicht zur Abnahme der Hospitalisierungen führen.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Mausmodell

Es wurden für alle durchgeführten Versuche Mäuse mit einem C57BL/6J-Hintergrund verwendet.

2.1.2 Implantation

| | |
|---|--|
| Bepanthen Augen- und Nasensalbe | Bayer AG, Art.-Nr.: 6029009.00.00 |
| Betaisodona (Povidon-Jod) | mundipharma GmbH, Art.-Nr.: 6108022.00.01 |
| Biopsiestanzen 5mm | PFM Medical AG, Art.-Nr.: 48501 |
| <i>Feather Disposable Scalpel</i> | Feather Safety Razor Co., Ltd |
| <i>Bovine Pericardial Patch</i> | Edwards Lifesciences, Art.-Nr.: 4700 |
| <i>Raw Bovine Pericardium 3,0x10cm</i> | Neovasc Inc. |
| <i>Falcons 50ml</i> | Sarstedt AG & Co., Art.-Nr.: 62.559.001 |
| Incidur Spray | EcoLab, Art.-Nr.: 3186407 |
| DPBS (1x) | Thermo Scientific Fisher, Art.-Nr.: 14190-094 |
| Rompun 2% Injektionslösung (Xylazin) | Bayer AG, Art.-Nr.: 6293841.00.00 |
| Rimadyl (Carprofen) | Pfizer, Art.-Nr.: 1706155 |
| Ketanest (25mg/ml) (Ketaminhydrochlorid) | Pfizer, Art.-Nr.: 37087.00.00 |
| Injektionskanüle (20Gx1,5 Zoll) | BD Medical, Art.-Nr.: 301300 |
| Spritzen 5ml | B. Braun, Art.-Nr.: 4606051 |
| Nahtmaterial (Hautnaht) | Ethicon, Art.-Nr.: EH 7400H, |
| Prolene 6-0, 13mm 1/2c, | |

monofil, nicht resorbierbar

Nahtmaterial (Patch)

Ethicon, Art.-Nr.: VCP925H

Coated Vicryl Plus 5-0,

13mm 1/2c, resorbierbar

Haarentfernungs-Creme (Veet)

Reckitt Benckiser, Art.-Nr.: 8038893

2.1.3 Explantation

Cryo Compound Tissue Medium

VWR International, Art.-Nr.: 1620C

Einbettenschälchen Kunststoff

MEDITE Medical GmbH, Art.-Nr.:

(17x17x5mm)

31051717

Kohlenstoffdioxid

Linde plc, Art.-Nr.: 204-696-9

PBS-Tabletten

Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 79382

SuperFrost Plus Objektträger

R. Langenbrinck GmbH, Art.-Nr.: 03-

0060

2-Methybutan Isopentan

Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 59.070

2.1.4 Histologie und Immunhistologie

Hämatoxylin Eosin Färbung

Alkohol 70%, 96%, 100%

Universitätsklinikum Düsseldorf,

Zentralapotheke, Index: 603-002-00-5

Eosin G

Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 861006-100G

Essigsäure (Eisessig) 100%

Merck KGaA, Art.-Nr.:1.00063.2511

Gill 3 Hematoxylin

Thermo Scientific Fisher, Art.-Nr.:

6765009

Roti-Histokitt II

Carl Roth, Art.-Nr.: T160.1

Xylol

VWR International, Art.-Nr.:28975.325

Lösungen für die Hämatoxylin Eosin Färbung

Eosin alkoholisch

- 1,5g Eosin
- 150ml Aqua dest.
- 300µl purer Eisessig

4-5%iges Eisessigwasser

- 10ml Essigsäure
- 190ml Aqua dest.

Movat Pentachrom Färbung

| | |
|------------------------------|---|
| Alcian blue 8GX | Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: A5268-25G |
| Ammoniaklösung 30% | Carl Roth, Art.-Nr.: CP17.1 |
| Brilliant Crocein R | Waldeck GmbH & Co. KG, Art.-Nr.: 1B109 |
| Eisen-III-Chlorid | Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 157740 |
| Essigsäure (Eisessig) 100% | Merck KGaA, Art.-Nr.:1.00063.2511 |
| Filter MN 615 1/4 | Macherey-Nagel GmbH&Co KG, Art.-Nr.: 531038 |
| Formaldehydlösung 37% | Carl Roth, Art.-Nr.: 4979.1 |
| Gill 3 Hematoxylin | Thermo Scientific Fisher, Art.-Nr.: 6765009 |
| Jod 98, 5% | Carl Roth, Art.-Nr.: 7935.1 |
| Kaliumjodid 99% | Carl Roth, Art.-Nr.: 8491.1 |
| Pikrinsäure | VWR International, Art.-Nr.: 84.512.260 |
| Phosphorwolframsäure-hydrate | Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: P4006 -250G |
| Roti-Histokitt II | Carl Roth, Art.-Nr.: T160.1 |
| Säurefuchsin | Waldeck GmbH & Co. KG , Art.-Nr.: 1B-523 |
| Safran du Gatinais | Waldeck GmbH & Co. KG , Art.-Nr.: 5A-394 |
| Salzsäure rauchend 37% | Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.003.171.000 |
| Sodium thiosulfate 98% | Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 72049-250G |

Lösungen für Movat Pentachrom Färbung

Alkalischer Alkohol

- 360ml 96%iger Ethanol
- 40ml 30%iges Ammoniumhydroxid

Bouin's Lösung

- 300ml Pikrinsäure
- 100ml 37-40%iges Formaldehyd

- 20 ml 100%ige Essigsäure (Eisessig)

5%iges Natriumthiosulfat

- 10g Natriumthiosulfat
- 200ml Aqua dest.

1%iges Alcianblau

- 2g Alcianblau
- 200ml Aqua dest.

Weigert´s Eisenhämatoxylin aus 3 Stocklösungen:

60ml 2%iges alkoholisches Hämatoxylin (lichtempfindlich)

- 10g Hämatoxylin
- 500ml 96%er Ethanol

40ml Eisenchlorid

- 12,4g Eisen-Chlorid-Hexahydrat
- 500ml Aqua dest.
- 5ml 32-37%ige Salzsäure

20ml Jodlösung (lichtempfindlich)

- 10g Jod
- 20g Kaliumjodid
- 500ml Aqua dest.
- Mind. 24h lösen lassen

Crocein-Säurefuchsin besteht aus 2 Stocklösungen:

80ml Brilliant Crocein R

- 4g Brilliant Crocein R
- 398ml Aqua dest.

20ml Säurefuchsinstock

- 0,5g Säurefuchsin
- 497,5ml Aqua dest.
- 2,5ml 100%ige Essigsäure
- Filtrieren und 24 Stunden ziehen lassen

5%ige Phosphorwolframsäure

- 25g Phosphorwolframsäure
- 500ml Aqua dest.

1%iger Eisessig

- 5ml 100%iger Eisessig
- 495ml Aqua dest.

Alkoholischer Safran (lichtempfindlich)

- 12g *Safran du Gatinais*
- 200ml 100%iger Ethanol

Alkoholischer Safran wurde in einer luftdichten Flasche über 48 Stunden bei 60°C in einem Trockenschrank erhitzt, dann bei Raumtemperatur wieder abgekühlt. Anschließend wurde die Lösung durch einen groben Filter filtriert.

Immunhistologie

| | |
|------------------------|---|
| Aceton | Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.000.142.500 |
| Aquatex | Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.08562.0056 |
| Bovine Serum Albumin | Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: A6003-25G |
| DAB Substrat Buffer | Zytomed Systems GmbH, Art.-Nr.: DAB530 |
| DAB Chromogen | Zytomed Systems GmbH, Art.-Nr.: DAB530 |
| Hämalaun | Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.09249.0500 |
| PBS-Tabletten | Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 79382 |
| Salzsäure 37% | VWR International, Art.-Nr.: 20.255.290 |
| Tris-Base | Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: T1503-1KG |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: T 9284-100 ML |
| Tween 20 | Merck KGaA, Art.-Nr.: 8. 22184. 0500 |
| Wasserstoffperoxid 30% | VWR International, Art.-Nr.: 23.622.298 |

Erstantikörper

| | |
|---|----------------------------------|
| <i>Anti-Desmin antibody</i> | abcam, Art.-Nr.: ab15200 |
| <i>Anti-Human T Cell CD3 Peptide</i> | Sigma-Aldrich, Ar.-Nr.: C7930 |
| <i>Anti-Human von Willebrand Factor</i> | DakoCytomation, Art.-Nr.: A 0082 |
| <i>Anti-Ki-67 antibody</i> | abcam, Art.-Nr.: 16667 |
| <i>Anti-MMP2 antibody</i> | abcam, Art.-Nr.: ab37150 |
| <i>Anti-Rat Ki-67 Antigen</i> | DakoCytomation, Art.-Nr.: M7248 |
| <i>MMP-2 antibody</i> | abcam, Art.-Nr.: ab37150 |

Anti-Vimentin to mouse

Progen Biotechnik GmbH, Cat.-No.:
65013

Zweitantikörper

Goat anti-guinea pig IgG-HRP

Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
Art.-Nr.: sc-2438

Goat anti-mouse IgG-HRP

Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
Art.-Nr.: sc-2005

Goat anti-guinea pig IgG-HRP

Santa Cruz, Biotechnology, Inc.,
Art.-Nr.: sc-2438

Goat anti guinea pig antibody

Progen Biotechnik GmbH, Cat.-No.:
GP53

Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen

TBS (10fach):

- 24,2g Tris (MW 121,4)
- 80,0g NaCl (MW 58,44)
- Bis zu einem Volumen von 1l mit Aqua dest. auffüllen
- Mit HCl den pH auf 7,6 einstellen

Blockierung *Neovasc*®

- 450ml TBS (1fach)
- 50ml FCS
- 5g BSA

Blockierung *Edwards*®

- 5%iges BSA
- 0,1%iges Tween 20

Tris-HCl Puffer 0,5M (10x)

- Tris MW 121,14
- 1l Aqua dest.
- 65,7g *Tris base*
- pH 7,6 mit HCl einstellen

DAB

- 1ml Substrat
- 50µl Chromogen

2.1.5 Kalziummessung

Calcium Assay Kit

Cayman Chemical Company,
Item No. 700550

Im Kit enthalten sind:

Calcium Assay Buffer (10x)

Item No. 700551

Calcium Standard

Item No. 700552

Calcium Detector R1

Item No. 700553

Calcium Detector R2

Item No. 700554

96-Well Solid Plate

Item No. 400014

96-Well Cover Sheet

Item No. 400012

2.1.6 Geräte und Software

Geräte

Kryostat

Leica Camera

Koch- und Rührplatte

Heidolph Instruments

pH-Meter

WTW, inoLab

Sicherheitswerkbank

Thermo Scientific Fisher HeraSafeKS

Feinwaage

Sartorius BP 110 S

Mikroskop

Leica Camera DM 2000

Mikroskop-Kamera

Leica Camera DFC 425 C

Binokular

Carl Zeiss AG Stemi 2000 C

Lampe (Binokular)

Schott KL 1500 LCD

Spektrophotometer Nanodrop 1000

peqlab Biotechnologie

Minifuge

Rith Micro Centrifuge Model I R,
SN: 055997

Zentrifuge

Eppendorf Zentrifuge 5424 B und
5415 R

Zentrifuge

Heraeus Labofuge 300

Mischblock

Bioer Technology Mixing Block MB-102

Vortexmischer

Scientific Industries Vortex Genie 2

Vortexmischer
Kugelmühle
Wärmeschrank
Tecan Reader Infinite M1000PRO
Milli-Q®-Wassersystem
Rollenmischer

Heidolph Instruments REAX top
Retsch MM 400
Heraeus Instruments Function Line
Tecan Austria GmbH
Millipore, Art.-Nr. ZMQS50F01
Phoenix Instrument, RS-TR05

Software

Software Mikroskop
Software Nanodrop
Software ELISA
Datenanalyse

Leica Application Suite Version 3.8.0
ND-V.3.7.0
Infinite M1000Pro i-control
Microsoft Office Excel 2003

Statistische Auswertung und
grafische Ausarbeitung

GraphPad Prism 6

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäß 1,5ml
Eppendorf *Safe-Lock Tubes* 2,0ml
Tube 50ml
Milli-Q®-Wasserfilter 0,22µm
Falcons 15ml, Cellstar
Kryoröhrchen 2ml

Sarstedt, Art.-Nr.: 72.690.001
Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 0030 120.094
Sarstedt, Art.-Nr.: 62.559.001
Millipore, Art.-Nr. F5NN09961
Greiner bio-one, Art.-Nr.: 188271
VWR International, Art.-Nr.: 479-0801

2.1.8 Herstellerverzeichnis

Hersteller

Abcam
Applied Biosystems
Bayer AG
BD Medical
Bioer Technology
Biozym Scientific GmbH
B. Braun

Firmensitz

Cambridge, Vereinigtes Königreich
Foster City, Kalifornien, USA
Leverkusen, Deutschland
Franklin Lakes, New Jersey, USA
Hangzhou, China
Hessisch Oldendorf, Deutschland
Melsungen, Deutschland

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| Carlo Erba Reagents | Emmendingen, Deutschland |
| Cayman Chemical Company | Ann Arbor, Michigan, USA |
| DakoCytomation | Glostrup, Dänemark |
| Ecolab | Saint Paul, Minnesota, USA |
| Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Ethicon | Norderstedt, Deutschland |
| Edwards Lifesciences | Irvine, Kalifornien, USA |
| Feather Safety Razor Co., Ltd | Osaka, Japan |
| Greiner bio-one | Kremsmünster, Österreich |
| Heidolph Instruments | Schwabach, Deutschland |
| Heraeus | Hanau, Deutschland |
| R. Langenbrinck GmbH | Emmendingen, Deutschland |
| Leica Camera | Wetzlar, Deutschland |
| Linde plc | Guildford, Irland |
| Macherey-Nagel GmbH & Co KG | Düren, Deutschland |
| MEDITE Medical GmbH | Burgdorf, Deutschland |
| Merck KGaA | Darmstadt, Deutschland |
| Microsoft | Redmond, Washington, USA |
| Millipore | Billerica, Massachusetts, USA |
| Mundipharma GmbH | Frankfurt, Deutschland |
| Neovasc Inc. | Richmond, Kanada |
| Peqlab | Erlangen, Deutschland |
| Pfizer | New York Citi, New York, USA |
| PFM Medical AG | Köln, Deutschland |
| Phoenix Instrument GmbH | Garbsen, Deutschland |
| Progen Biotechnik GmbH | Heidelberg, Deutschland |
| Promega | Fitchburg, Wisconsin, USA |
| Qiagen | Hilden, Deutschland |
| Reckitt Benckiser | Slough, Vereinigtes Königreich |
| Retsch GmbH | Haan, Deutschland |
| Carl Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Santa Cruz Biotechnology, Inc. | Dallas, Texas, USA |
| Sarstedt AG & Co. | Nümbrecht, Deutschland |
| Sartorius | Göttingen, Deutschland |

| | |
|--------------------------|-----------------------------|
| Schott AG | Mainz, Deutschland |
| Scientific Industries | Bohemia, New York, USA |
| Sigma-Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Thermo Scientific Fisher | Waltham, Massachusetts, USA |
| Tecan Austria GmbH | Grödig/Salzburg, Österreich |
| VWR International | Radnor, Pennsylvania, USA |
| Waldeck GmbH & Co. KG | Münster, Deutschland |
| Carl Zeiss AG | Oberkochen, Deutschland |
| ZytoMed Systems GmbH | Bargteheide, Deutschland |

2.2 Methodik

2.2.1 Mausmodell

Die Tierhaltung und die Tierversuche wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Genehmigung erfolgte durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) (Aktenzeichen 84-02.04.2011.A404, 24.01.2012). Sowohl die Haltung als auch die Operation der Tiere erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Vor Beginn der Durchführung der Untersuchungen wurde der Fachkundenachweis gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes in einem 40-stündigen Kurs zur Versuchstierkunde erworben.

Tierbestand und Diät

Versuchstiere

Die Mäuse, die in dieser Versuchsreihe verwendet wurden, haben einen C57BL/6J-Hintergrund. In Vorversuchen durch die Arbeitsgruppe konnten zwar keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren gesehen werden, jedoch hat man sich entschlossen ausschließlich männliche Mäuse zu verwenden. So konnten eventuelle Effekte durch das Geschlecht des Tieres und dessen Hormonstatus vermieden werden.

Biglykan wird X-chromosomal vererbt. Die *Knockout* Tiere wurden daher als $Bgn^{-/0}$ und die Wildtypen als $Bgn^{+/0}$ bezeichnet [35]. Zur verbesserten Lesbarkeit werden im Folgenden die Bezeichnungen $Bgn^{-/0}$ und Wildtypen (WT) verwendet.

Tierhaltung und Diät

Die Operation der Mäuse erfolgte im Alter von 8 Wochen. Ab diesem Zeitpunkt erhielten sie Normalfutter oder eine pro-kalzifizierende Diät, die aus 1,5% Dicalciumphosphat, 2% Cholesterol und 300.000 IU/kg Vitamin D₃ (VitD) bestand. Die Mäuse bekamen ihre Nahrung in Form von Pellets. Die ausreichende Aufnahme wurde durch regelmäßiges Wiegen überwacht. Die pro-kalzifizierende Wirkung des Futters auf Kalziumeinlagerungen in die Patches wurde in Vorversuchen durch Mitglieder der Arbeitsgruppe überprüft. Hierfür wurden männlichen und weiblichen WT mit C57BL/6J-Hintergrund Patches der Firma *Edwards*® implantiert. Die Vorversuche erfolgten nur mit dem Material dieses Herstellers, da zu diesem Zeitpunkt das Material der Firma *Neovasc*® noch nicht zur Verfügung stand. Die Kalziummessung nach der Explantation erfolgte durch den in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Assay.

2.2.2 Implantation des Bioprothesenmaterials

Vorbehandeltes Rinderperikard

Als Material für die anzufertigen Implantate wurde auf vorbehandeltes Rinderperikard zweier Hersteller zurückgegriffen.

Rinderperikard der Firma *Edwards*® Lifesciences

Hierbei handelt es sich um ein rechteckiges Stück Rinderperikard (10 cm x 15 cm), das zur Rekonstruktion menschlicher Herzklappen sowie zur Unterstützung von Perikardverschlüssen entwickelt wurde (Abb. 1). Laut Herstellerangaben war dieses Material durch eigens entwickelte Verfahren besonders stabil und neigte nicht so rasch zu Kalkeinlagerungen wie vergleichbare Materialien. Das proprietäre *XenoLogiX*©-Verfahren sollte die Kalzifizierung im Gegensatz zur herkömmlichen Vorbehandlung mit Glutaraldehyd reduzieren. Des Weiteren diente die sogenannte *Neutralogic*©-Fixierung in gepuffertem Glutaraldehyd der Stabilität und der verringerten Antigenität.



Abb. 1 Rinderperikard der Firma *Edwards® Lifesciences* Die Abbildung zeigt ein herausgeschnittenes Stück des Perikards vor Anfertigung der Patches

Rinderperikard der Firma *Neovasc®*

Auch hier bot die Firma ein individuell anpassbares Stück Rinderperikard an. *Neovasc®* beschrieb eine besondere Quervernetzung der Kollagenfasern in ihren Produkten, die unter anderem einer besonderen Reißfestigkeit und Elastizität dienen sollte. Das Perikardstück wurde mittels Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Isopropanol fixiert.

Präparation der Implantate

Für die Implantation des Materials in die Versuchstiere wurden aus den oben genannten rechteckigen Rinderperikardstücken sogenannte Patches erzeugt. Dies geschah mit Hilfe einer Biopsiestanze mit einem Durchmesser von 5 mm unter sterilen Bedingungen (Abb. 2). Da das verwendete Material eine sehr fragile Oberfläche aufwies, musste besonders darauf geachtet werden, die Patches im weiteren Verlauf möglichst wenig mit der benutzen Pinzette zu berühren oder gar zu beschädigen. Bis zur Implantation wurden die Patches in steriler PBS gelagert.



Abb. 2 Anfertigung der Patches Mit Hilfe einer Biopsiestanze wurden unter sterilen Bedingungen Patches zur anschließenden Implantation angefertigt

Durchführung der Operation

Die im Folgenden beschriebene Operation wurde in den Operationssälen des ZETT der Universität Düsseldorf durchgeführt. Der Eingriff erfolgte unter einer intraperitoneal verabreichten Narkose mit Ketamin und Xylazin (100 mg/kg Körpergewicht Ketamin; 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin). Die Zeit bis zum Wirkungseintritt des verabreichten Medikaments betrug nur wenige Minuten, sodass kurz nach der Injektion mit der Vorbereitung des Tieres begonnen werden konnte. Das Operationsgebiet am Rücken der Maus wurde zunächst mit einem elektrischen Rasierer grob vom Fell befreit, bevor eine dünne Schicht Enthaarungscreme aufgetragen wurde. Während der Einwirkzeit wurde bereits das Analgetikum Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht) subkutan in die Nackenfalte gespritzt, um den postoperativen Wundschmerz zu reduzieren. Die Narkosetiefe wurde durch Überprüfung des Lidreflexes überwacht. Beim Ausfall desselbigen konnte mit der Operation begonnen werden. Die Maus wurde in Bauchlage auf eine Wärmeplatte zum Schutz vor einer möglichen Hypothermie gelagert. Die Augen des Versuchstieres wurden dünn mit *Bepanthen® Augen- und Nasensalbe* benetzt, um ein intraoperatives Austrocknen durch den fehlenden Lidschlag zu vermeiden. Auf eine Desinfektion und steriles Abdecken konnte verzichtet werden. Vorversuche haben gezeigt, dass auch ohne eine Vorbehandlung der Haut keine Irritationen oder gar Infektionen auftraten. Es erfolgte zunächst der Hautschnitt entlang der Wirbelsäule. Dieser betrug im Durchschnitt ca. 1,5 cm. Nun wurde die Haut stumpf vom darunterliegenden

Gewebe auf einer Fläche von ca. 2,5 x 2,5 cm unterminiert, sodass zu beiden Seiten Taschen entstanden. Bei freiem Blick auf den Rückenmuskel konnte mit der Implantation begonnen werden. Es wurden jeweils zwei Patches auf jeder Seite der Wirbelsäule auf die Faszie des Muskels genäht. Hierbei wurde darauf geachtet, sehr weit lateral die erste Naht zu setzen, damit es möglichst wenig Kontakt zur späteren Hautnaht geben würde. Die Patches wurden mit jeweils drei Einzelknopfnähten in gleichen Abständen zueinander an die Faszie genäht. Die Durchstiche befanden sich bei 2, 6 und 10 Uhr im Patch. So konnte ein eventuelles Umklappen bei Hautverschiebungen verhindert werden, was ein gutes Anwachsen gestört hätte.

Nach der Implantation aller vier Patches konnte die Haut wieder verschlossen werden. Hier wurden erneut Einzelknopfnähte angewandt. Es wurde nicht-resorbierbarer Faden verwendet. Auf eine fortlaufende Nahttechnik wurde verzichtet, da sich sonst bei eventuellen Schäden am Faden durch beispielsweise Anbeißen die komplette Naht gelöst hätte. Die Naht wurde anschließend zur Desinfektion mit *Betaisodonasalbe*® betupft. Die Aufwachphase erfolgte in Einzelkäfigen unter dauerhafter Beobachtung. Anschließend konnten die Tiere wieder gemeinsam in einen Käfig gesetzt werden.

Postoperativer Verlauf

Der postoperative Verlauf gestaltete sich bei fast allen Tieren komplikationslos. Die Mäuse zeigten kein Verhalten, das auf Schmerzen hätte schließen lassen können. Es wurde beispielsweise weder eine vernachlässigte Fellpflege, eine Schonhaltung oder ein Rückzugsverhalten beobachtet. Auch die Rückennaht wurde trotz einfacher Erreichbarkeit für die Maus gut toleriert. In sehr wenigen Fällen wurden einzelne Nähte durch die Maus selbst oder durch eine andere Maus im Käfig gelöst. Einmalig kam es zu einer Infektion der Operationsnaht, die ein verfrühtes Töten der Maus nach sich zog. Die Hautnaht war durchschnittlich nach zwei Wochen verheilt. Die Fäden mussten nicht gezogen werden, sondern lösten sich selbstständig. Nach drei Wochen war regelhaft das Fell wieder nachgewachsen. Die Tiere wurden in regelmäßigen Abständen gewogen, unter anderem auch, um eine ausreichende Futteraufnahme zu kontrollieren. Nach 8

bzw. 16 Wochen wurden die Tiere zur Explantation durch CO₂-Intoxikation getötet.

2.2.3 Explantation

Präparation

Die Explantation der Patches erfolgte nach 8 bzw. nach 16 Wochen. Die Abb. 3 und Abb. 4 veranschaulichen die Gruppeneinteilung.

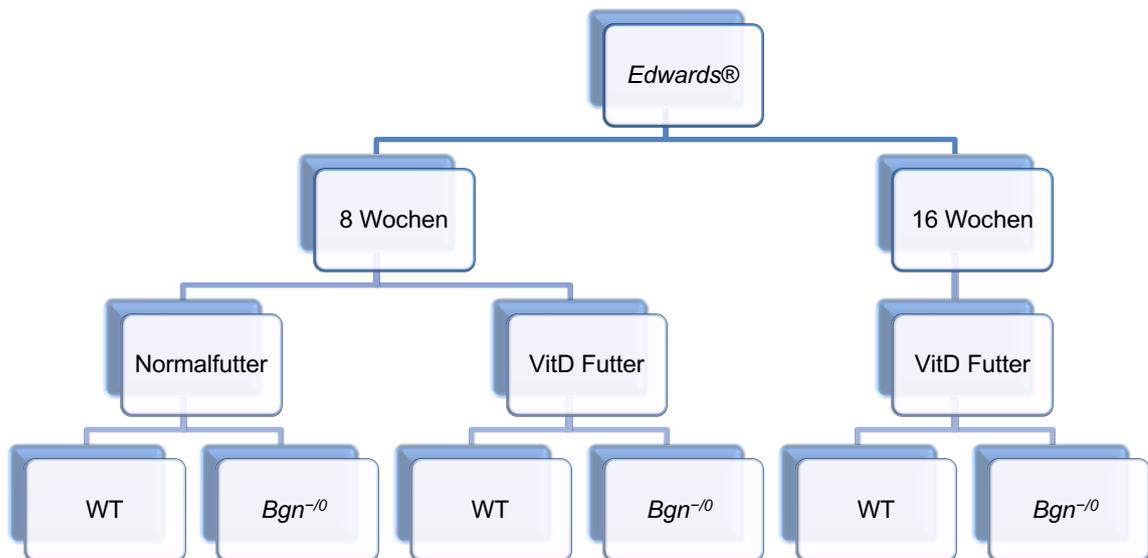


Abb. 3 Hauptversuch: Schema des Versuchsaufbaus für die Gruppe der Edwards® Implantate Die Patches wurden in einer ersten Gruppe nach 8, in einer zweiten Gruppe nach 16 Wochen explantiert. In der Gruppe der 8 Wochen Tiere wurde zunächst der Effekt des VitD Futters getestet. Die 16 Wochen Tiere erhielten ausschließlich VitD reiches Futter. (*Bgn^{-/-}*=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp, VitD=Vitamin D)

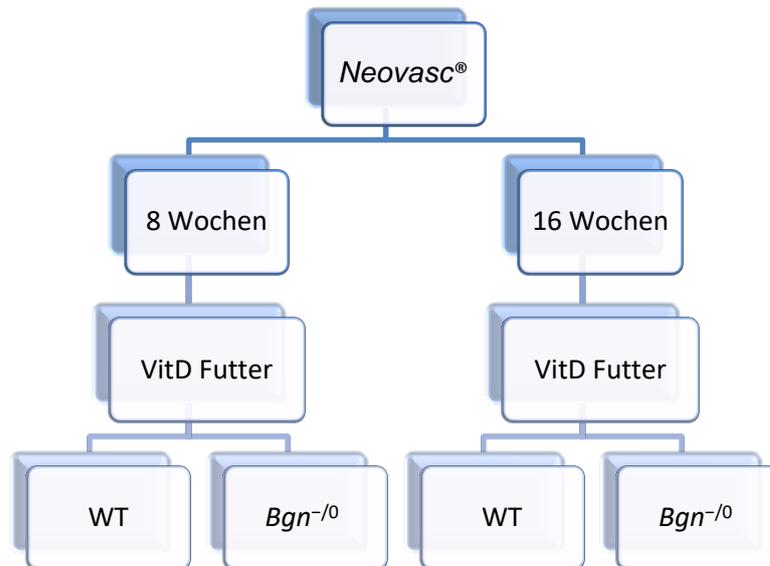


Abb. 4 Hauptversuch: Schema des Versuchsaufbaus für die Gruppe der Neovasc® Implantate Auch hier erfolgte eine Explantation entweder nach 8 bzw. nach 16 Wochen. Alle Tiere wurden ausschließlich mit VitD reichem Futter gefüttert. (*Bgn*^{-/-}=Biglykan Knockout, WT=Wildtyp, VitD=Vitamin D)

Der Hautschnitt erfolgte unter Zuhilfenahme einer Präparierschere und einer Pinzette. Da die Patches während der Implantationsdauer sehr fest in das umliegende Gewebe eingewachsen sind, musste hier mit großer Sorgfalt vorgegangen werden, um Beschädigungen an den Implantaten zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde zum Teil mit einem Binokular gearbeitet. Im nächsten Schritt wurde über allen vier Patches die Haut der Maus vom darunterliegenden Gewebe behutsam abpräpariert. Um ein Austrocknen des Gewebes zu vermeiden wurden die noch nicht präparierten Patches locker mit der Haut bedeckt und mit PBS feucht gehalten. Es erfolgte zunächst die Lösung des Patches aus der Maus, der im weiteren Verlauf für die RNA-Isolation verwendet werden sollte, da sich hier eine eventuelle Verfälschung durch Trocknung oder Ähnliches am ehesten zeigen würde. Hier war es besonders wichtig, dass kein Gewebe außen am Patch verbleibt, damit in der folgenden Verarbeitung nur die RNA der eingewanderten Zellen isoliert werden konnte. Nach kompletter Freipräparation wurde der Patch mit einem Skalpell zerkleinert und dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Analyse auf RNA-Basis ist nicht Bestandteil dieser Arbeit. Die Entnahme des zweiten und dritten Patches erfolgte auf die gleiche Weise, allerdings fand hier keine Zerteilung statt. Die Patches wurde im Ganzen ebenfalls bei -80°C aufbewahrt. Beim vierten Patch erfolgte

eine eher großzügigere Präparation, sodass auch die Entnahme des umliegenden Gewebes erfolgen konnte. Vor allem an der zur Maus gewandten Seite wurde der Patch, der hier regelhaft an die Faszie des Muskels angewachsen war, gemeinsam mit einem Teil des Muskels mit dem Skalpell herausgeschnitten. Dieser vierte Patch wurde im weiteren Verlauf für die Anfertigung histologischer Schnitte genutzt. Daher wurde er mit einem Skalpell halbiert, sodass eine Hälfte in Paraffin, die andere Hälfte in wasserlöslichem Medium eingebettet werden konnte. Die in Paraffin konservierten Patches wurden für diese Arbeit nicht verwendet. Die sich im wasserlöslichen Medium befindliche Hälfte wurde wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben behandelt.

Konservierung und Anfertigung histologischer Schnitte

Für die histologischen Untersuchungen der entnommenen Patches wurden Gefrierschnitte angefertigt. Dazu wurde das Gewebe in *Cryocompound Tissue Medium*® in ein dafür vorgesehenes Förmchen gegeben. Um die Bildung von Luftblasen im Medium zu minimieren erfolgte das Einfrieren nicht direkt in flüssigem Stickstoff. Stattdessen wurde Isopentan in ein Becherglas gegeben und in Stickstoff heruntergekühlt. In dieses Becherglas wurde dann das mit *Cryocompound Tissue Medium*® und dem Gewebe bestückte Förmchen gelegt und die Aushärtung des Einbettmediums abgewartet. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C. Zum Anfertigen der Gefrierschnitte aus den hergestellten Blöcken wurde das feste Medium aus den Förmchen gelöst und im -20°C kalten *Kryotom*® mit einer Schichtdicke von 5 µm geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert wurden.

2.2.4 Histologie und Immunhistologie

Hämatoxylin Eosin Färbung

Hierbei handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, die folgendes anfärbt:

- Zellkerne: blau
- Zytoplasma: blassrot
- Kollagene Bindegewebsfasern: rot
- Muskelgewebe: rot

Tabelle 1 veranschaulicht den Färbevorgang.

| Zeit | Vorgang |
|--------------|---|
| 1 Minute | Färbung in Hämatoxylin |
| 1 Minute | Bad in Aqua dest. |
| 1 Minute | Bad in 4-5%igem Eisessigwasser |
| 1 Minute | Bad in Aqua dest. |
| 2 Minuten | Spülen unter Leitungswasser |
| 1 Minute | Bad in 70%igem Alkohol |
| 15 Minuten | Färbung in Eosin |
| 1 Minute | Bad in 70%igem Alkohol |
| 2 x 1 Minute | Bad in 96%igem Alkohol |
| 2 x 1 Minute | Bad in 100%igem Alkohol |
| 2 x 1 Minute | Bad in Xylol |
| - | Eindecken der Objektträger mit <i>Roti-Histokitt II</i> © |
| - | Versiegelung der Objektträger mit Klarlack |

Tabelle 1 Ablaufbeschreibung der Hämatoxylin Eosin Färbung

Movat Pentachrom Färbung

Diese Färbung wurde zur Darstellung der einzelnen Komponenten des Bindegewebes genutzt.

Zur Darstellung kommen die folgenden Bestandteile:

- Zellkerne und elastische Fasern: schwarz
- Hintergrund und Muzine: blau
- Muskulatur: rot
- Kollagen und retikuläres Bindegewebe: gelb
- Glykosaminoglykane: grün
- Fibrin und Fibrinoid: rot (intensiv)

In Tabelle 2 werden die einzelnen Arbeitsschritte ausgeführt.

| Zeit | Vorgang |
|-------------|---|
| - | Erhitzen der Bouin'schen Lösung auf 100°C |

| | |
|---------------|---|
| 10 Minuten | Fixierung in Formalin |
| 5 Minuten | Bad in Aqua dest. |
| 10 Minuten | Färben in Bouin'scher Lösung |
| 10 Minuten | Spülen unter fließendem, kaltem Leitungswasser |
| 5 Minuten | Bad in 5%igem Natriumthiosulfat |
| 2+2+1 Minuten | Mehrfaches Waschen mit Aqua dest. |
| 20 Minuten | Färben mit Alcianblau |
| 3,5 Minuten | Spülen unter fließendem, kaltem Leitungswasser |
| 10 Minuten | Stabilisieren in erhitztem alkalischem Alkohol (60°C) |
| 3,5 Minute | Spülen unter fließendem, kaltem Leitungswasser |
| 9 Minuten | Färben in Weigert's Hämatoxylin |
| 1 Minute | Spülen unter fließendem, kaltem Leitungswasser |
| 2+2+1 Minuten | Mehrfaches Waschen mit Aqua dest. |
| 1 Minute | Färben mit Crocein-Säurefuchsin |
| 2+2+1 Minuten | Mehrfaches Waschen mit Aqua dest. |
| 5 Minuten | Differenzieren in 5%iger Phosphorwolframsäure |
| 5 Minuten | Spülung in 1%igem Eisessig |
| 2+2+1 Minuten | Mehrfaches Waschen mit Aqua dest. |
| 1 Minute | Dehydratisierung in 96%igem Alkohol |
| 1+1 Minute | Dehydratisierung in 100%igem Alkohol |
| 8 Minuten | Färben in alkoholischem Safran |
| 1+1 Minute | Dehydratisierung in 100%igem Alkohol |
| 5+5+5 Minuten | Entfetten in Xylol |
| - | Eindecken der Objektträger mit <i>Roti-Histokitt II</i> © |
| 12 Stunden | Lagerung im Wärmeschrank bei 37°C |

Tabelle 2 Ablaufbeschreibung der Movat Pentachrom Färbung

Immunhistologie

Immunhistochemische Färbung mit dem Indikator DAB (Diaminobenzidin)

Im Folgenden wird das allgemeine Protokoll beschrieben, das bei den für diese Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen angewandt wurde. Die verwendeten Erst- und Zweitantikörper wurden im Kapitel 2.1.4 genannt. Das

Verfahren war für alle Antikörper identisch, allerdings waren die Konzentrationen der Antikörper und die Positivkontrollen für jede Färbung spezifisch.

Da in dieser Arbeit mit zwei verschiedenen Typen von vorbehandeltem Rinderperikard gearbeitet wurde, mussten manche Arbeitsschritte im nachfolgenden Protokoll an die chemische Vorbehandlung durch die Hersteller angepasst werden. Die Unterschiede werden im Protokoll verdeutlicht (Tabelle 3).

Pro Färbedurchgang wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten Schnitte eines nicht implantierten Patches. Die Positivkontrollen werden weiter unten aufgeführt.

| Zeit | Vorgang |
|---------------|--|
| 10 Minuten | Fixierung in eiskaltem Aceton |
| 3 x 5 Minuten | Waschen in PBS |
| 10 Minuten | Bad in Triton-X 100© (nur <i>Neovasc</i> ®) |
| 3 x 1 Minute | Waschen in PBS (nur <i>Neovasc</i> ®) |
| 60 Minuten | Blockierung in der dafür hergestellten Lösung |
| 3 x 1 Minute | Waschen in 0,1%igem <i>Tween 20</i> © (nur <i>Edwards</i> ®) |
| | Lösung des Antikörpers in PBS (nur <i>Neovasc</i> ®) |
| | Lösung des Antikörpers in 1%igem BSA (nur <i>Edwards</i> ®) |

Tabelle 3 Vorbereitung vor dem Auftragen des Erstantikörpers

Auftragen des Erstantikörpers:

- Hierbei wurde darauf geachtet, die auf dem Objektträger verbleibende Menge der Blockierung so gering wie möglich zu halten, um die genaue Antikörperkonzentration zu erreichen
- Für die *Neovasc*® Patches wurde der Antikörper in PBS gelöst, für die *Edwards*® Patches in 1%igem BSA
- Es wurde nur auf einen der beiden Schnitte der verdünnte Antikörper aufgetragen, auf den zweiten Schnitt wurde lediglich PBS (*Neovasc*®) bzw. 1%iges BSA (*Edwards*®) pipettiert
- Während der Inkubation befanden sich die Objektträger zum Schutz vor Austrocknung in einer Feuchtkammer

Die Vorbehandlung der Objektträger vor Auftragen des Zweitantikörpers zeigt Tabelle 4.

| Zeit | Vorgang |
|--|--|
| 3 x 5 Minuten | Waschen in PBS (nur <i>Neovasc</i> ®) |
| 3 x 5 Minuten | Waschen in 0,1%igem <i>Tween 20</i> © (nur <i>Edwards</i> ®) |
| 5 Min. <i>Neovasc</i> ®, 10 Min. <i>Edwards</i> ® | Blockierung in 3%igem Wasserstoffperoxid |
| 3 x 5 Minuten | Waschen in PBS |

Tabelle 4 Vorbereitung vor dem Auftragen des Zweitantikörpers

Auftragen des Zweitantikörpers:

- Diesmal wurde der verdünnte Antikörper auf beide Schnitte aufgetragen
- Die Lösung des Zweitantikörpers erfolgte in den gleichen Substanzen wie der Erstantikörper
- Anschließend 60-minütige Inkubation in der Feuchtkammer
- Nachfolgend dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten in PBS

Danach erfolgte die Detektion mit DAB (Tabelle 5).

| Zeit | Vorgang |
|-------------------------|------------------------------|
| 10 Minuten | Bad in Tris-HCl-Puffer |
| variabel, je nach AK | DAB auf Schnitte pipettieren |
| 5 Minuten | Bad in Tris-HCl-Puffer |
| 1 Minute | Waschen in Aqua dest. |

Tabelle 5 Detektion mit DAB

Als letzter Schritt erfolgte die Kernfärbung (Tabelle 6).

| Zeit | Vorgang |
|-------------|-------------------------------------|
| 1 Minuten | Färbung mit Hämalaun |
| wenige Sek. | Kurzes Eintauchen in Leitungswasser |

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| wenige Sek. | Kurzes Eintauchen in 1%ige Salzsäure |
| 5 Minuten | Spülen mit Leitungswasser |
| 1 Minute | Waschen mit Aqua dest. |

Tabelle 6 Kernfärbung

Abschließend wurden die Objektträger mit dem wasserlöslichen Eindeckmedium *Aquatex*® eingedeckt und mit einem Deckgläschen versehen. Nach der Trocknung wurden auch hier die Ränder mit Klarlack versiegelt.

Positivkontrollen

Zur Überprüfung jeder immunhistochemischen Färbung wurde eine Positivkontrolle mitgeführt. Dafür wurden Organe aus den Versuchstieren entnommen, nachdem sie für die Explantation getötet wurden. Die Auswahl der Referenzorgane erfolgte nach Herstellerempfehlungen. Die verwendeten Antikörper mit ihren zugehörigen Positivkontrollen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die genauen Bezeichnungen der Antikörper finden sich im Abschnitt der verwendeten Materialien (Kapitel 2.1.4).

| Antikörper | Positivkontrolle |
|-------------------|---------------------------|
| Vimentin | Herz |
| CD 3 | Milz |
| Desmin | Quergestreifte Muskulatur |
| vWF | Leber, Milz, Herz |
| Ki-67 | Darm |
| MMP-2 | Ohrknorpel |

Tabelle 7 Verwendete Antikörper und die dazugehörigen Organe zur Positivkontrolle

2.2.5 Kalziummessung

Calcium Assay Kit der Cayman Chemical Company®

Dieses Kit zur Kalziumbestimmung in beliebigem Gewebe basiert auf einer Reaktion von Kalzium und o-Cresolphthalein Complexone zum

Kalzium-Cresolphthalein-Complexone-Komplex. Hierbei entsteht ein kräftiger lilafarbener Farbumschlag, der direkt proportional zum Kalziumgehalt in der Lösung ist. Dieser kann photometrisch bestimmt werden.

Aufbereitung der Proben

Zur Bestimmung des Kalziumgehaltes der entnommenen Patches musste das gefrorene Gewebe zuvor aufbereitet werden. Die bei -80°C gelagerten Patches wurden mit Hilfe eines in Stickstoff gekühlten Mörsers einzeln zerkleinert und annähernd pulverisiert. Anschließend wurde das hergestellte Pulver in ein Eppendorfgefäß überführt und zügig gewogen. Hierbei wurde darauf geachtet, jeden Patch im gleichen Zeitfenster zu mörsern und zu wiegen, sodass Messungenauigkeiten durch eventuelle Erwärmung minimiert werden konnten. Die Eppendorfgefäße befanden sich zwischen den einzelnen Arbeitsschritten jeweils in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde das gemörserte Gewebe in 5 ml Tris-HCl-Puffer pro Gramm Gewebe gelöst. Der Puffer wurde zuvor aus 5 ml Assaypuffer und 45 ml HPLC-reinem Wasser hergestellt. Der Assaypuffer war Bestandteil des verwendeten Kits zur Kalziummessung und bestand aus 1 M Tris-HCl mit einem pH-Wert von 7. Das Lösen geschah durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren und durch die Verwendung eines Vortexmischers. Nachfolgend wurden die entstanden Homogenisate in einer zuvor auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei einer Geschwindigkeit von 11.000 rpm zentrifugiert. Die entstandenen Überstände wurden abpipettiert, in bereitgestellte Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung erneut bei -80°C eingefroren.

Vorbereitung der Kalziumstandards

Die Messung des Kalziumgehaltes der Patches erfolgte mithilfe eines Plattenlesegeräts. Da hier eine Farbreaktion photometrisch gemessen wurde, musste zunächst eine Standardreihe hergestellt werden, mit dem die gemessenen Proben verglichen werden konnten. Hierfür wurden erneut der vorbereitete Tris-HCl-Puffer und ein Kalziumstandard aus dem Kit verwendet.

Messung des Kalziumgehaltes

Jede Probe und jede Standardkonzentration wurden als Duplikat gemessen. Pro Well wurden 10 µl pipettiert. Zur Detektion der Konzentration diente das sogenannte *Working Detector Reagent*®, welches aus den Reagenzien *Calcium Detector R1*® und *Calcium Detector R2*® aus dem verwendeten Kit im Verhältnis 1:1 hergestellt wurde. Hier musste auf einen Schutz vor Lichteinfall geachtet werden, um eine Verfälschung der Messung zu verhindern. Anschließend wurden 100 µl des hergestellten Detektors in jede Probe gegeben, in dem sich entweder der Kalziumstandard oder das Homogenisat befand. Nun erfolgte nach Vermischen der Flüssigkeiten durch vorsichtiges Schwenken der Platte die Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Die Messung der Absorption erfolgte bei 570-590nm.

Auswertung

Die Auswertung der vom Gerät ermittelten Ergebnisse erfolgte mithilfe von Microsoft Office Excel®. Da jeder Standard und jede Probe doppelt gemessen wurden, erfolgte zunächst die Bestimmung aller Mittelwerte. Anschließend wurde von allen ermittelten Standard- und Probenkonzentrationen die gemessene Absorption des Standards A subtrahiert. Nach Erstellung einer Standardkurve konnte die Konzentration der Proben berechnet werden.

2.2.6 Zellmigration

In dieser Messung wurde untersucht, wie weit Zellen während der Dauer der Implantation in den Versuchstieren in die Patches migriert sind. Hierfür wurden Movat Pentachrom Färbungen der Patches analysiert. Zunächst wurde jedes Präparat am Mikroskop verblindet untersucht. Des Weiteren wurden alle neun Messungen an jedem Patch von zwei verschiedenen Personen durchgeführt, um ein möglichst objektives Ergebnis zu erzielen. Mithilfe der Software *Leica Application Suite*® wurden drei Bilder pro Patch angefertigt. Jeweils ein Bild stellte die Randbereiche dar, ein Drittes zeigte die Mitte des Schnittes. Nun wurde mit dem Programm *ImageJ*® jedes Bild einzeln vermessen. Zunächst wurde die gesamte Dicke des Patches bestimmt, anschließend wurde der Teil des Patches gemessen, in dem sich keine bzw. nur noch vereinzelt Zellen zeigten. Durch die

Subtraktion der ermittelten Werte konnte sowohl die absolute als auch die relative Strecke der eingewanderten Zellen ermittelt werden. Die Messung erfolgte an drei verschiedenen Stellen pro Bild. Da von jedem Patch drei Bilder angefertigt wurden, ergab sich eine Zahl von neun gemessenen Strecken pro Patch. Aus diesen neun Messungen wurde der Mittelwert gebildet, der in die Statistik zum Vergleich der Tiere eingegangen ist. Abb. 5 veranschaulicht, an welchen Stellen in den Patches die Messungen durchgeführt wurden.

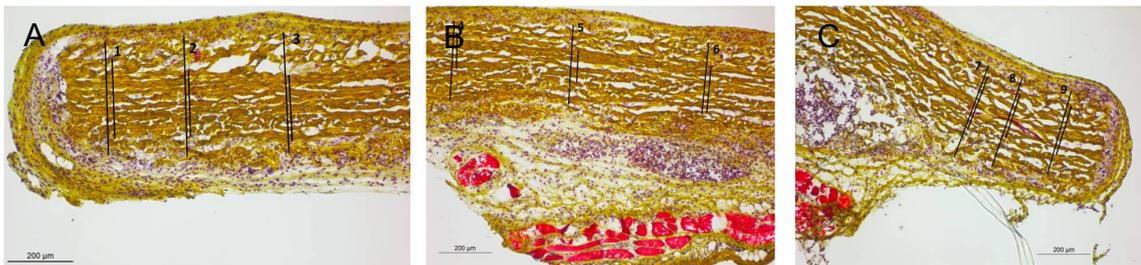


Abb. 5 Beispiel einer Messung der Zellmigration An jedem Patch wurden Messungen an neun definierten Stellen durchgeführt. Von der gesamten Dicke des Patches wurde der sich mittig befindende zellfreie Bereich subtrahiert. **(A)** Messungen 1-3 **(B)** Messungen 4-6 **(C)** Messungen 7-9

2.2.7 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde in der gesamten Arbeit *GraphPad Prism 6.0 verwendet*. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Da die Daten nicht-parametrisch waren, wurde beim Vergleich zweier Gruppen mit dem ungepaarten zweiseitigen Mann-Whitney U Test gearbeitet. Wurden mehrere Gruppen miteinander verglichen, kam der Kruskal-Wallis-Test mit einem Dunn's multiple comparison Test zur Anwendung.

Für alle statistischen Analysen wurde ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angenommen, $p < 0,01$ als hoch-signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Makroskopische Beurteilung

Die makroskopische Beurteilung der Patches bei der Explantation gab schon erste Hinweise auf ein gutes Einwachsen des Materials während der Implantationszeit. Das Perikard war in das Gewebe der Versuchstiere zwischen Haut und Muskel integriert. Die Patches wuchsen regelhaft an der

Rückenmuskulatur fest, was sich auch später in den histologischen Schnitten zeigte.

In Abb. 6 wird ein Vergleich der Patches beider Hersteller gezeigt. Die Abb. 6 A-D zeigen die Ergebnisse nach 8 Wochen Implantationsdauer. Hier wurde deutlich, dass es sowohl zwischen den WT und den *Bgn*^{-/0} als auch zwischen beiden Herstellern keinen makroskopischen Unterschied gab. Gelegentlich erfolgte jedoch ein Anwachsen direkt unter die Haut, sodass beim Eröffnen der Patch nicht am Muskel haften blieb (Abb. 6 C). Abb. 6 G zeigt exemplarisch neben dem angewachsenen Patch eine Region, in der ein eingenähter Patch explantiert wurde. Dies soll die Tiefe des Einwachsens in den Muskel verdeutlichen.

Auch nach 16 Wochen präsentierten sich die Patches sowohl in den WT als auch in den *Bgn*^{-/0} in beiden Herstellergruppen ähnlich (Abb. 6 E-H). Auffällig war jedoch, dass zum Zeitpunkt der Explantation die Patches der Firma Neovasc® weiter medial lagen als bei Implantation, also direkt lateral der Wirbelsäule (Abb. 6 D und H). Unabhängig vom Genotyp oder der Implantationsdauer bildete sich distal der Implantate eine Art dünne Bindegewebsschicht, die sich nur schwer abpräparieren ließ, was jedoch für die Untersuchungen auf Proteinebene unerlässlich war (Abb. 7 A). Zudem zeigten sich gelegentlich Lipidanlagerungen an den Patches zwischen den Annähten (Abb. 7 D). Die resorbierbaren Fäden, mit welchen die Patches angenäht wurden, waren zum Zeitpunkt der Explantation noch vollständig, soweit makroskopisch beurteilbar (Abb. 7 B). In vereinzelt Tieren konnten feinste Gefäße oberhalb der Patches gesehen werden, welche allerdings nicht in den Patch hineinzogen (Abb. 7 C).

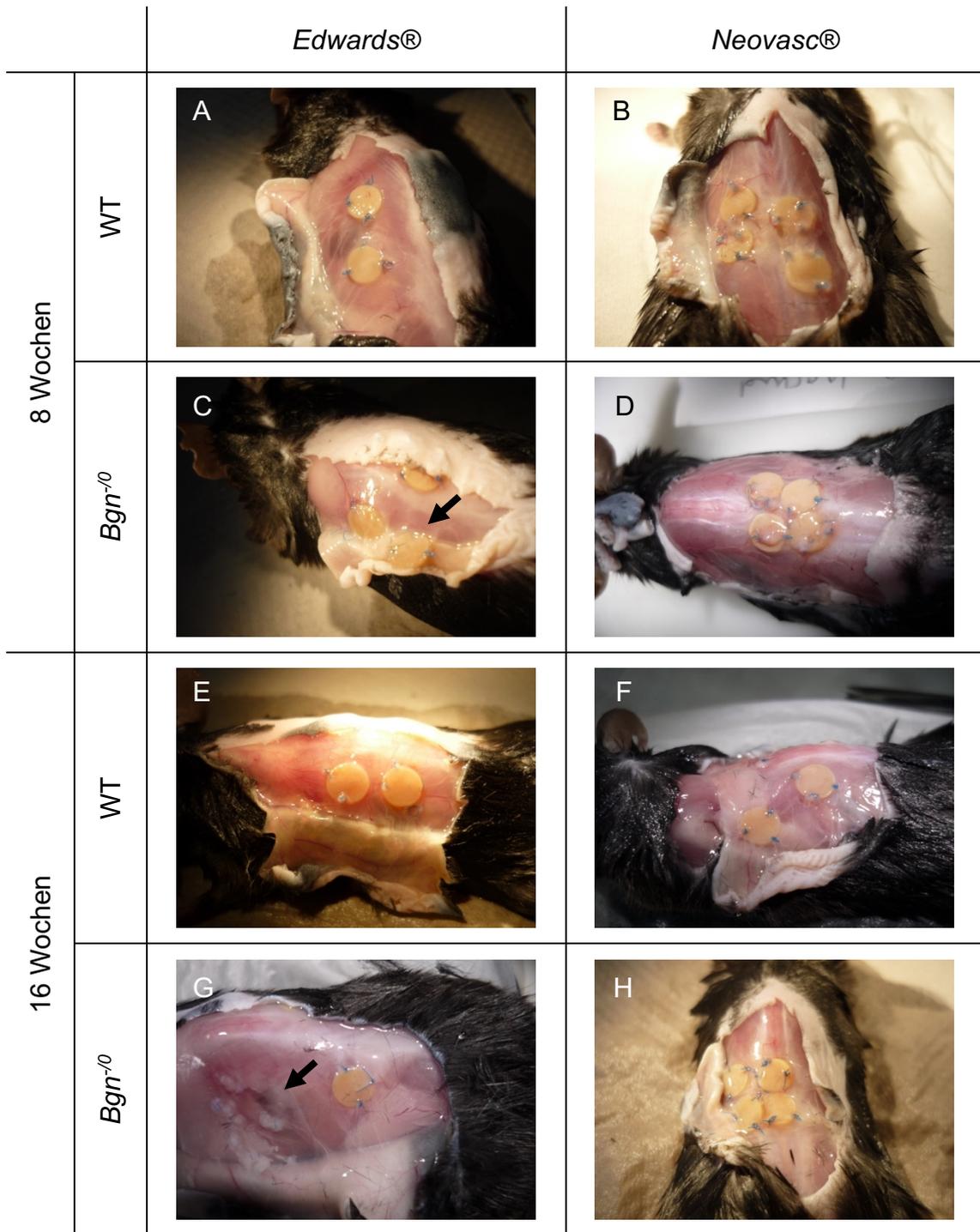


Abb. 6 Tabellarischer Vergleich zwischen den Patches vor Explantation (A) Edwards®, 8 Wochen, WT, Übersichtsaufnahme (B) Neovasc®, 8 Wochen, WT, intakte Annähte an allen vier Patches (C) Edwards® 8 Wochen *Bgn*⁻⁰, Beispiel für unter die Haut angewachsenen Patch (s. Pfeil) (D) Neovasc® 8 Wochen *Bgn*⁻⁰, Beispiel für Lage der Patches direkt lateral der Wirbelsäule (E) Edwards®, 16 Wochen, WT, gute Trennbarkeit von Haut und Implantat (F) Neovasc®, 16 Wochen, WT, Patches sind während Implantationsdauer auseinander gewichen (G) Edwards®, 16 Wochen, *Bgn*⁻⁰, Beispiel für Muskelregion nach Explantation (s. Pfeil) (H) Neovasc®, 16 Wochen, *Bgn*⁻⁰, Patches haben Lage während Implantation nach medial verändert (*Bgn*⁻⁰=Biglykan Knockout, WT=Wildtyp)

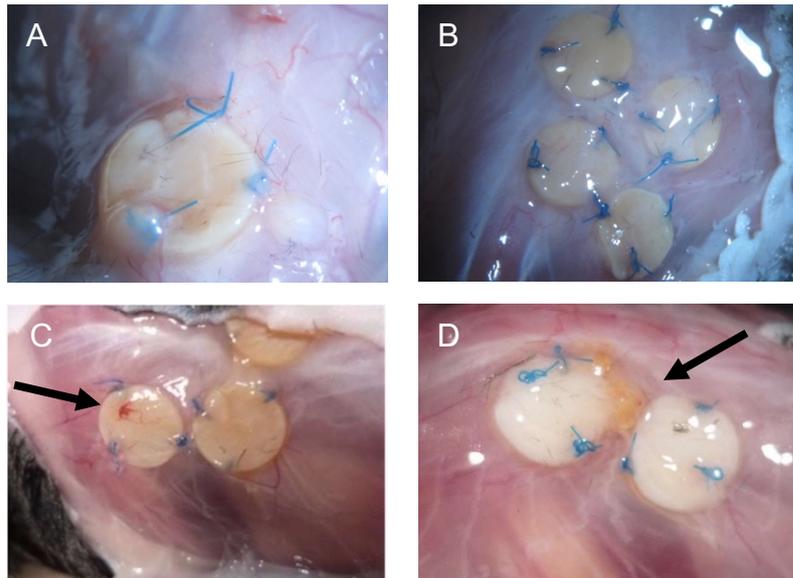


Abb. 7 Detailaufnahmen der eingewachsenen Patches (A) Patch ist überwachsen mit Bindegewebsschicht (*Edwards®*, 8 Wochen, WT) **(B)** Die resorbierbaren Fäden sind zum Zeitpunkt der Explantation alle intakt (*Edwards®*, 8 Wochen, *Bgn⁻⁰*) **(C)** Blutgefäße laufen über der Faszia an den Patch heran (s. Pfeil; *Edwards®*, 8 Wochen, WT) **(D)** Lipidanlagerung am Patch zwischen den Annähten (s. Pfeil; *Neovasc®*, 8 Wochen, WT) (*Bgn⁻⁰*=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp)

3.2 Bestimmung des Kalziumgehaltes

3.2.1 Einfluss einer pro-kalzifizierenden Diät auf den Kalziumgehalt

Zunächst erfolgten Vorversuche, in denen der Effekt der VitD reichen Nahrung geprüft wurde. Es wurde kontrolliert, ob die Spezialnahrung den Effekt der Kalzifizierung des Gewebes verstärken kann. Hierfür wurden sowohl WT als auch *Bgn⁻⁰* aus der *Edwards®* Gruppe untersucht. Die Patches aus Versuchstieren mit Normalfutter wurden mit Patches aus der Gruppe mit VitD Futter verglichen. Die Dauer der Implantation betrug in diesem Vorversuch 8 Wochen. Es zeigte sich im Vergleich der WT eine signifikant höhere Kalzifizierung in der Gruppe mit der pro-kalzifizierenden Diät (Normalfutter: $1,015 \pm 0,43$, VitD Futter: $1,486 \pm 0,21$, $p=0,0411$) (Abb. 8 A). Dieser Effekt ließ sich in der Gruppe der *Bgn⁻⁰* nicht nachweisen (Normalfutter: $0,9714 \pm 0,43$, VitD Futter: $1,341 \pm 0,41$, $p=0,1206$) (Abb. 8 B).

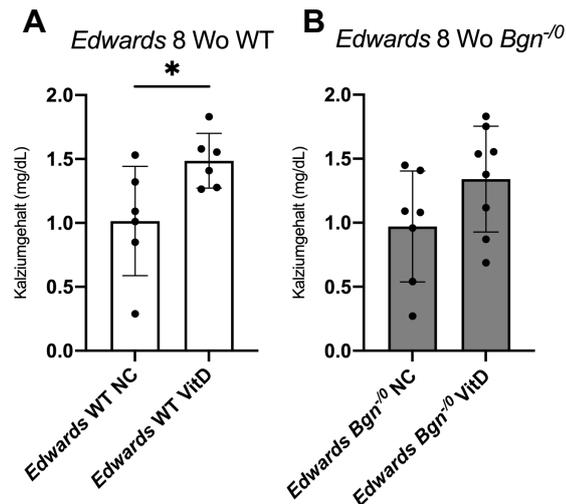


Abb. 8 Kalziumgehalt der Explantate nach 8-wöchiger Implantation unter Normalfutter und VitD Futter (A) Es zeigte sich eine signifikant höhere Kalziumkonzentration in den Explantaten aus den WT unter Vitamin D Futter ($p=0,0411$) (WT NC $n=6$, WT VitD $n=6$) **(B)** Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Gruppe der *Bgn*^{-/-} nachgewiesen werden ($p = 0,1206$) (*Bgn*^{-/-} NC $n=7$, *Bgn*^{-/-} VitD $n=8$) ($*=p<0,05$) (WT=Wildtyp, *Bgn*^{-/-}=Biglykan *Knockout*, Wo=Wochen, mg=Milligramm, dL=Deziliter, NC=Normal chow, Normalfutter, VitD=Vitamin D Futter)

Da die WT eine signifikant höhere und die *Bgn*^{-/-} in der Tendenz eine höhere Kalziumeinlagerung unter VitD reichem Futter zeigten, wurden in allen weiteren Versuchsgruppen die Tiere nur noch mit diesem Futter gehalten.

3.2.2 Einfluss des Genotyps und der Implantationsdauer auf den Kalziumgehalt

Edwards®

Zunächst wurden die Patches aus den WT zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Der Kalziumgehalt der Patches nach einer Implantationsdauer von 8 Wochen zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu denen nach 16-wöchiger Implantation (*Edwards*® WT 8 Wo: $1,486 \pm 0,21$, *Edwards*® WT 16 Wo $1,422 \pm 0,46$, $p=0,5064$) (Abb. 9 A). Ebenso verhielt es sich mit den Patches aus der *Bgn*^{-/-} Gruppe (*Edwards*® *Bgn*^{-/-} 8 Wo: $1,341 \pm 0,41$, *Edwards*® *Bgn*^{-/-} 16 Wo $1,296 \pm 0,50$, $p=0,8518$) (Abb. 9 B). Betrachtete man den Kalziumgehalt zum Explantationszeitpunkt nach 8 Wochen und verglich die beiden Genotypen miteinander, zeigte sich auch hier eine ähnliche Kalziumkonzentration der WT und *Bgn*^{-/-} (*Edwards*® WT 8 Wo: $1,486 \pm 0,21$, *Edwards*® *Bgn*^{-/-} 8 Wo

1,341±0,41, p=0,5138) (Abb. 9 C). Auch nach 16 Wochen verhielt sich der Kalziumgehalt nicht unterschiedlich (*Edwards*® WT 16 Wo: 1,422±0,46, *Edwards*® *Bgn*⁻⁰ 16 Wo 1,296±0,50, p=0,5536) (Abb. 9 D).

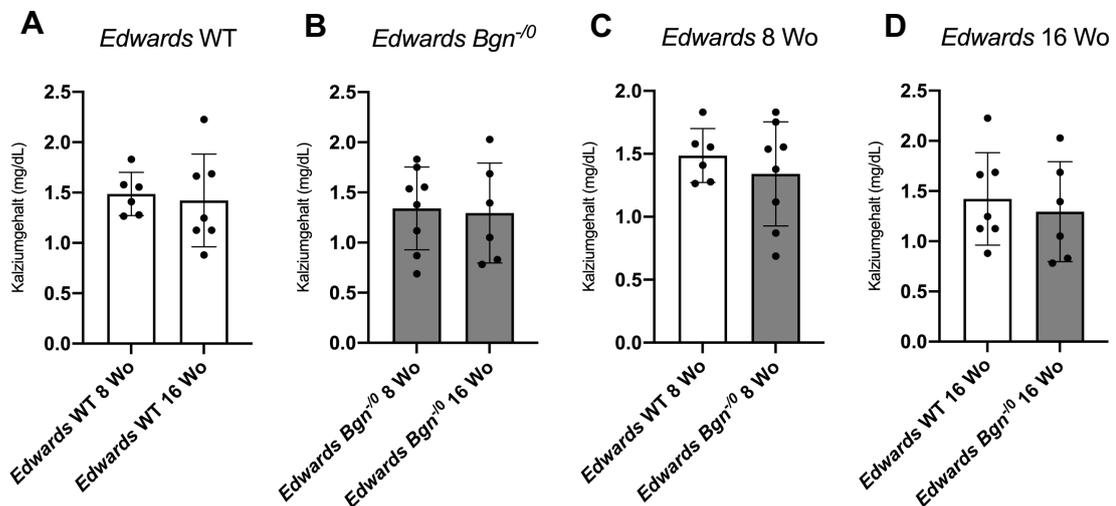


Abb. 9 Vergleich des Kalziumgehaltes der Patches der Fa. Edwards®; Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied sowohl zwischen den Genotypen als auch zwischen den Explantationszeitpunkten **(A) Vergleich der WT nach 8- und 16-wöchiger Implantation** Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Kalziumkonzentrationen (p=0,5064) (WT 8 Wo n=6, WT 16 Wo n=7) **(B) Vergleich der *Bgn*⁻⁰ nach 8- und 16-wöchiger Implantation** Die Kalziumkonzentrationen erbrachten keinen signifikanten Unterschied (p=0,8518) (*Bgn*⁻⁰ 8 Wo n=8, *Bgn*⁻⁰ 16 Wo n=6) **(C) Vergleich von WT und *Bgn*⁻⁰ nach 8-wöchiger Implantation** Es lagen ähnliche Kalziumkonzentrationen vor (p=0,5138) (WT 8 Wo n=6, *Bgn*⁻⁰ 8 Wo n=8) **(D) Vergleich von WT und *Bgn*⁻⁰ nach 16-wöchiger Implantation** Erneut ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Kalziumkonzentrationen (p=0,5536) (WT 16 Wo n=7, *Bgn*⁻⁰ 16 Wo n=6) (WT=Wildtyp, *Bgn*⁻⁰=Biglykan *Knockout*, Wo=Wochen, mg=Milligramm, dL=Deziliter, NC=Normal chow, Normalfutter, VitD=Vitamin D Futter)

Neovasc®

Im Folgenden wurden die explantierten Patches der Firma Neovasc® untersucht. Alle Tiere, welche mit diesem Material versehen wurden, erhielten die kalziumreiche Diät. Anlehnend an die Messungen der Patches der Fa. Edwards® wurde auch hier in gleicher Art untersucht. Der Kalziumgehalt der Neovasc® Patches aus den WT erbrachte zu den beiden Explantationszeitpunkten (8 und 16 Wochen) keinen Unterschied (*Neovasc*® WT 8 Wo: 0,9427±0,40, *Neovasc*® WT 16 Wo: 0,9744±0,63, p=0,7308) (Abb. 10 A). Anders hingegen verhielt es sich bei den Tieren aus der *Bgn*⁻⁰ Gruppe. Hier lag der Kalziumgehalt nach 16 Wochen signifikant niedriger als nach einer Implantationszeit von 8 Wochen (*Neovasc*® *Bgn*⁻⁰ 8 Wo: 1,745±0,48, *Neovasc*® *Bgn*⁻⁰ 16 Wo: 0,5029±0,23,

p=0,0012) (Abb. 10 B). Des Weiteren wurden die Genotypen nach 8 und 16 Wochen verglichen. Betrachtete man die Kalziumkonzentration nach 8 Wochen in den *Bgn*^{-/-} lagen diese signifikant höher als in den WT (Neovasc® WT 8 Wo: 0,9427±0,40, Neovasc® *Bgn*^{-/-} 8 Wo: 1,745±0,48, p=0,0260) (Abb. 10 C). Ein umgekehrter Effekt stellte sich nach 16 Wochen dar. Hier zeigten die WT einen signifikant höheren Kalziumgehalt als die *Bgn*^{-/-} (Neovasc® WT 16 Wo: 0,9744±0,63, Neovasc® *Bgn*^{-/-} 16 Wo: 0,5029±0,23, p=0,0233) (Abb. 10 D).

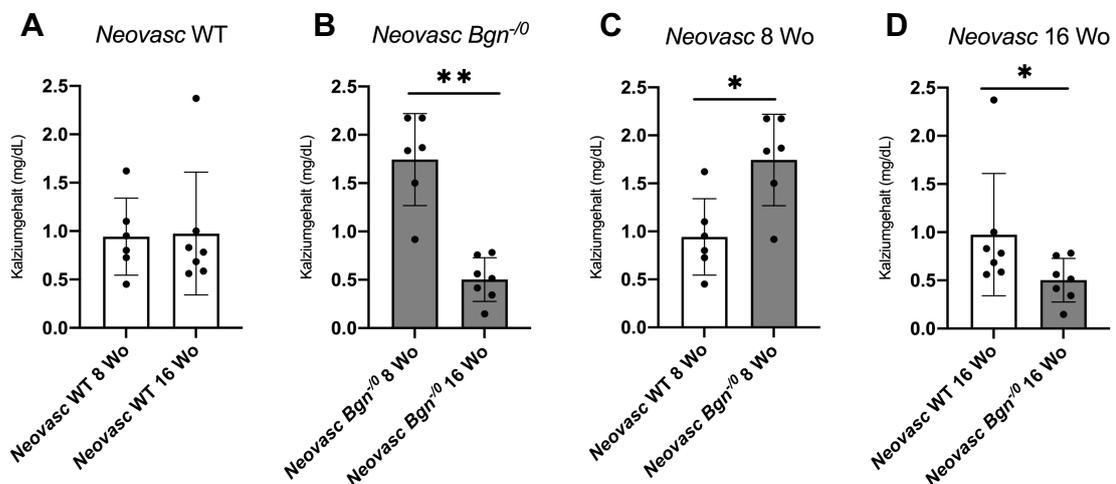


Abb. 10 Vergleich des Kalziumgehaltes der Patches der Fa. Neovasc®; Die Kalziumeinlagerung war abhängig von Genotyp und der Implantationsdauer **(A) Vergleich der WT nach 8- und 16-wöchiger Implantation** Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Kalziumkonzentrationen (p=0,7308) (WT 8 Wo n=6, WT 16 Wo n=7) **(B) Vergleich der *Bgn*^{-/-} nach 8- und 16-wöchiger Implantation** Es zeigte sich eine signifikant höhere Kalziumkonzentration nach 8 Wochen (p=0,0012) (*Bgn*^{-/-} 8 Wo n= 6, *Bgn*^{-/-} 16 Wo n= 7) **(C) Vergleich von WT und *Bgn*^{-/-} nach 8-wöchiger Implantation** Die Kalziumkonzentration in der *Bgn*^{-/-} Gruppe war signifikant höher als in der WT Gruppe (p=0,0260) (WT 8 Wo n=6, *Bgn*^{-/-} 8 Wo n=8) **(D) Vergleich von WT und *Bgn*^{-/-} nach 16-wöchiger Implantation** Es zeigte sich eine signifikant geringere Kalziumkonzentration in den *Bgn*^{-/-} (p=0,0031) (WT 16 Wo n=7, *Bgn*^{-/-} 16 Wo n=6) (*=p<0,05 und **=p<0,01) (WT=Wildtyp, *Bgn*^{-/-}= Biglykan Knockout, Wo=Wochen, mg=Milligramm, dL=Deziliter)

3.2.3 Einfluss des verwendeten Patchmaterials auf den Kalziumgehalt

Des Weiteren wurden die Patches der beiden Hersteller miteinander verglichen. Dies geschah sowohl für die WT als auch für die *Bgn*^{-/-} nach 8 bzw. 16 Wochen. Der Vergleich der WT nach 8 Wochen zeigte einen signifikant geringeren Kalziumgehalt in den Patches der Firma Neovasc® (Edwards® WT 8 Wo: 1,486±0,21, Neovasc® WT 8 Wo: 0,9427±0,40, p=0,0411) (Abb. 11 A). Der

Vergleich der *Bgn*⁻⁰ nach 8 Wochen zeigte keinen Unterschied zwischen den Herstellern (*Edwards*® *Bgn*⁻⁰ 8 Wo: 1,341±0,41, *Neovasc*® *Bgn*⁻⁰ 8 Wo: 1,745±0,48, p=0,0779) (Abb. 11 B). Die Messungen der Konzentrationen nach der Explantation der Patches nach 16 Wochen konnten sowohl in der Gruppe der WT als auch in der Gruppe der *Bgn*⁻⁰ einen Unterschied zwischen den Herstellern aufweisen. In beiden Gruppen lag die Kalziumkonzentration in den Patches der Firma *Edwards*® signifikant höher als in der *Neovasc*® Gruppe (*Edwards*® WT 16 Wo: 1,422±0,46, *Neovasc*® WT 16 Wo: 0,9744±0,63, p=0,0344 und *Edwards*® *Bgn*⁻⁰ 16 Wo: 1,296±0,50, *Neovasc*® *Bgn*⁻⁰ 16 Wo: 0,5029±0,23, p=0,0017) (Abb. 11 C und D).

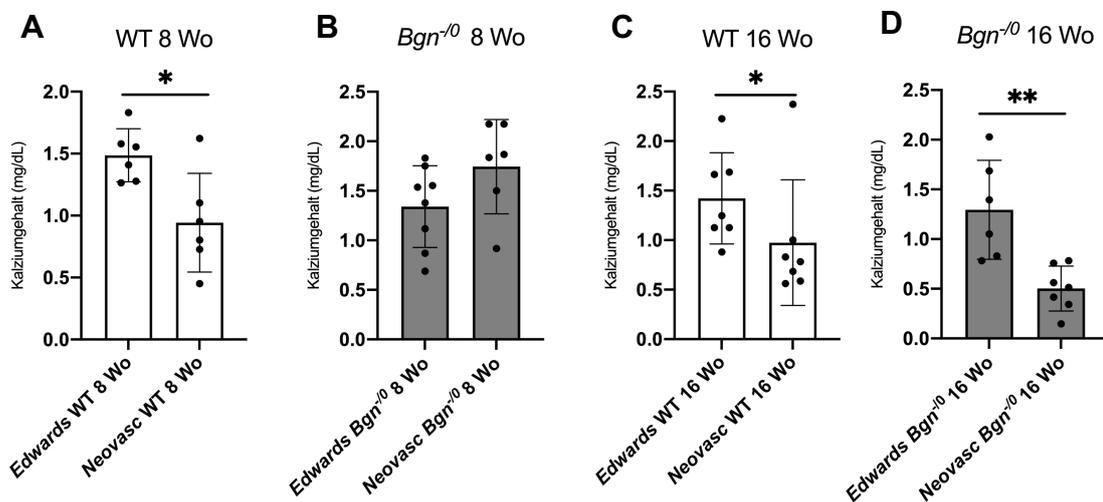


Abb. 11 Vergleich des Kalziumgehaltes der Patches zwischen beiden Herstellern
(A) Es zeigte sich ein signifikant geringer Kalziumgehalt in den *Neovasc*® Patches nach 8 Wochen bei den WT (p=0,0411) (*Edwards*® WT 8 Wo n=6, *Neovasc*® WT 8 Wo n=6)
(B) In den *Bgn*⁻⁰ zeigte sich nach 8 Wochen kein signifikanter Unterschied (p=0,779) (*Edwards*® *Bgn*⁻⁰ 8 Wo n=8, *Neovasc*® *Bgn*⁻⁰ 8 Wo n=6)
(C) Nach 16 Wochen lag die Kalziumkonzentration in den *Edwards*® WT signifikant höher als in den *Neovasc*® WT (p=0,0344) (*Edwards*® WT 16 Wo n=7, *Neovasc*® WT 16 Wo n=7)
(D) Die Patches aus den *Neovasc*® *Bgn*⁻⁰ erbrachten nach 16 Wo eine signifikant geringere Kalziumkonzentration als die der *Edwards*® *Bgn*⁻⁰ (p=0,0017) (*Edwards*® *Bgn*⁻⁰ 16 Wo n= 6, *Neovasc*® *Bgn*⁻⁰ 16 Wo n= 7) (*=p<0,05 und **=p<0,01) (WT=Wildtyp, *Bgn*⁻⁰=Biglykan *Knockout*, Wo=Wochen, mg=Milligramm, dL=Deziliter)

3.3 Histologische Auswertung

3.3.1 Übersichtsfärbung: Hämatoxylin Eosin

Die Hämatoxylin Eosin Färbung (HE Färbung) diente der Gewinnung einer Übersicht über den gesamten Patch sowie zur Kontrolle der Einwanderung von Zellmaterial. Hier konnte die Vollständigkeit der explantierten Patches begutachtet und fehlerhafte Patches, die beispielsweise bei der Explantation beschädigt wurden, aussortiert werden. Es wurden sowohl Patches der Firma *Edwards® Lifesciences* als auch der Firma *Neovasc®* gefärbt. Es wurden für beide Produkte Färbungen aus der 8- sowie aus der 16-Wochen-Gruppe angefertigt. Zunächst wurden die nativen Patches gefärbt, um einen validen Vergleich zu den explantierten Patches zu schaffen.

Es zeigte sich eine deutliche Rotfärbung des gesamten Patches und des umgebenden Gewebes. Da Eosin ein saurer Farbstoff ist, färbte er alle azidophilen Strukturen. Die Grundstruktur des Perikards bestand aus einem azidophilen Kollagengeflecht, was die intensive Färbung dieser Patches erklärte. Die basophilen Anteile des Untersuchungsmaterials wurden mittels Hämalaun angefärbt. Abb. 12 präsentiert die HE Färbung an den nativen Patches. Es stellte sich eine lockere Bindegewebsstruktur in den *Edwards®* Patches dar, mit unregelmäßig verteilten zytoplasmatischen Bereichen mit Betonung der Randareale (Abb. 12 A und A'). Die *Neovasc®* Patches erschienen in ihrer Struktur kompakter und ärmer an zytoplasmatischen Strukturen (Abb. 12 B und B').

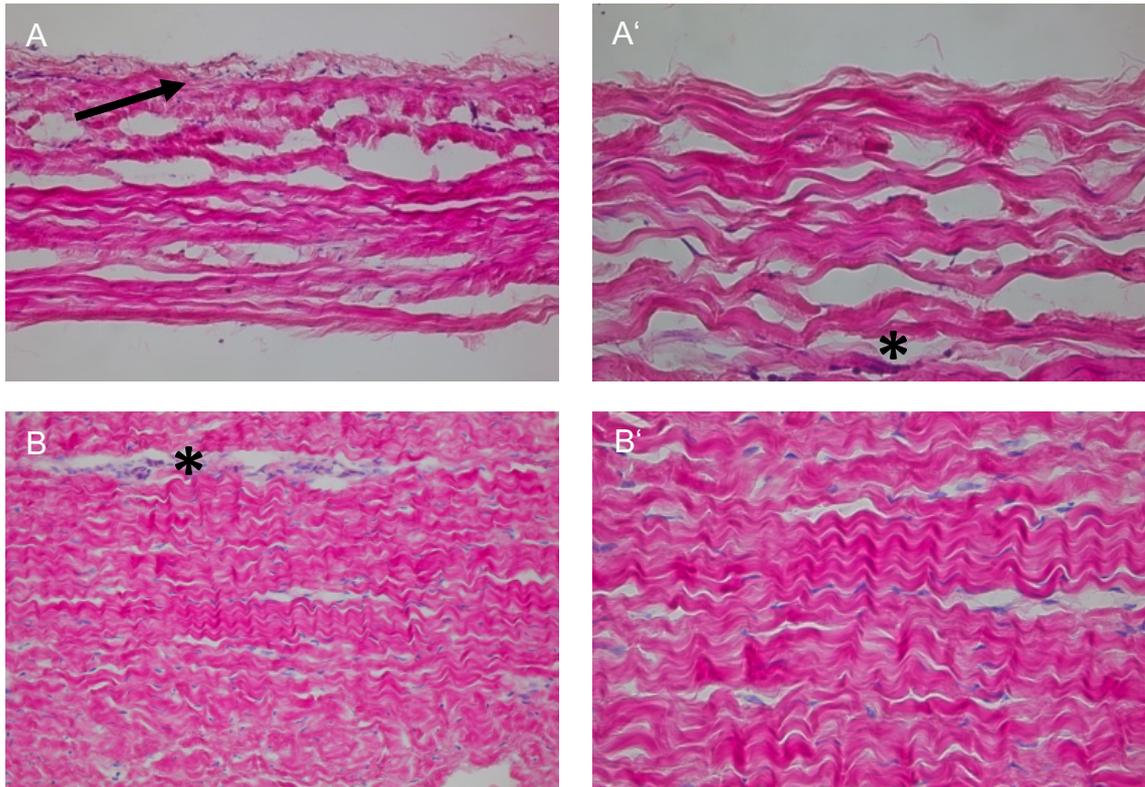


Abb. 12 HE Färbung der nativen Patches (A) Fa. *Edwards*® Lockere Bindegewebsstrukturen mit dichteren zytoplasmatischen Bereichen am äußeren Rand (s. Pfeil; 10x Vergrößerung) **(A') Fa. *Edwards*®** Kollagen in lockeren Strukturen mit eingelagerten Zellen (s. Sternchen; 20x Vergrößerung) **(B) Fa. *Neovasc*®** Dichte Bindegewebsstrukturen mit Zellkernen und Ansammlung mehrerer Zellen (s. Sternchen; 20x Vergrößerung) **(B') Fa. *Neovasc*®** Vergrößerte Ansicht (40x Vergrößerung)

Im Folgenden wurden die Patches aus den Versuchstieren untersucht. Betrachtete man zunächst die Patches der Fa. *Edwards*® zeigte sich mittig im Patch die zuvor im nativen Patch beschriebene relativ lockere Kollagenstruktur (Abb. 13). Sowohl in den Patches nach 8 Wochen als auch in denen nach 16 Wochen sah man nur in den Randbereichen des Patches zytoplasmatische Strukturen, die sich als dunkle Punkte darstellten. Diese lagen in einer kompakten Schicht relativ regelmäßig verteilt in allen Bereichen mit Kontakt zum umliegenden Gewebe. Wie tief diese Schicht in den Patch reichte wurde im Kapitel der Zellmigration näher untersucht. Umliegend um den Patch befand sich Bindegewebe der Maus, welches bei der Explantation nicht vom Patch gelöst wurde (Abb. 13 B und C). Zudem wurde regelmäßig ein Stück der Rückenmuskulatur mit herausgeschnitten, um den Patch nicht zu verletzen (Abb. 13 B-D). In der Grobstruktur als auch in den einzelnen angefärbten

Komponenten ergaben sich sowohl im Vergleich zwischen den Genotypen als auch im zeitlichen Verlauf (8 versus 16 Wochen) keine Unterschiede.

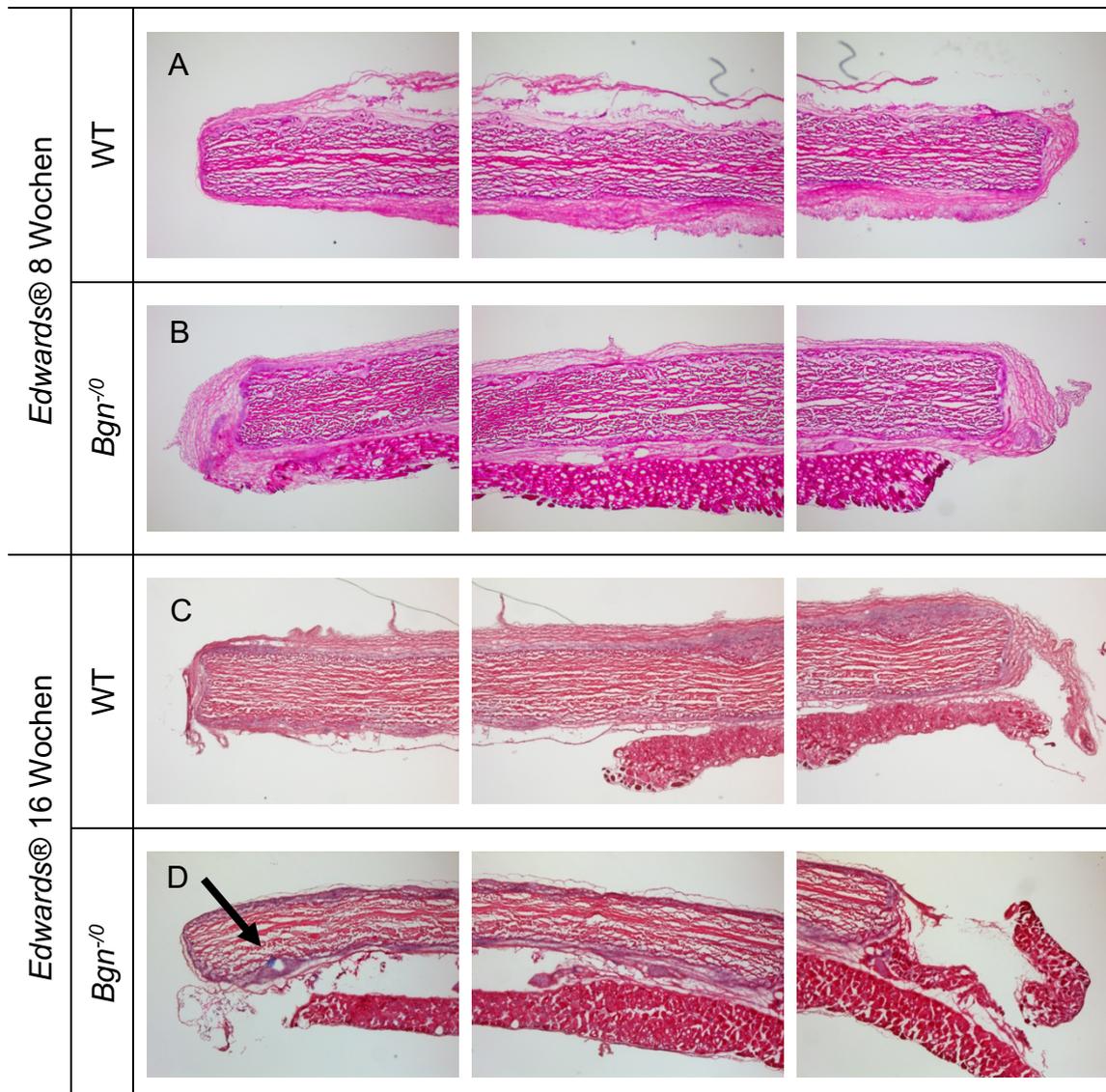


Abb. 13 Tabellarischer Vergleich der *Edwards®* Patches, HE Färbung (alle 5x Vergrößerung) (A) WT, 8 Wochen; vollständiger Patch mit umgebendem Bindegewebe (B) *Bgn*^{-/-}, 8 Wochen; Patch mit Bindegewebe sowie Muskelanschnitt (C) WT, 16 Wochen; Patch mit Binde- und Muskelgewebe (D) *Bgn*^{-/-}, 16 Wochen; Patch mit Fadenresten (s. Pfeil) (*Bgn*^{-/-}=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp)

Die Abb. 14 stellt die Patches in HE Färbung der Firma *Neovasc®* dar. In Anlehnung an die nativen Patches fiel auch hier eine dichtere Struktur des gesamten Patches im Vergleich zu den explantierten Patches aus der *Edwards®* Gruppe auf. Zudem schien es so, als würden sich diese Patches bei gleicher Ausgangsgröße (5mm Stanze) im Verlauf der Implantation geringfügig

zusammenziehen. Auch hier ließen sich in den äußeren Regionen des Patches Zellen nachweisen, die sich als dunkler Randstreifen darstellten. Es befanden sich tendenziell weniger bindegewebige Anteile des Versuchstiers um den Patch herum im Vergleich zu den *Edwards*® Patches, wobei auch hier gelegentlich Muskulatur mit herauspräpariert wurde (Abb. 14 B und D). Es fiel auf, dass in den *Neovasc*® Patches häufiger Fadenreste im Gewebe verblieben und sich somit in den histologischen Schnitten zeigten (Abb. 14 A, B' und C). Vergleichend zeigten sich in den *Edwards*® Patches häufig nur die Durchstichstellen ohne verbliebenes Nahtmaterial (Abb. 13 D). Auch bei den *Neovasc*® Patches ergaben sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen WT und *Bgn*⁻⁰, sowohl nach 8 als auch nach 16 Wochen.

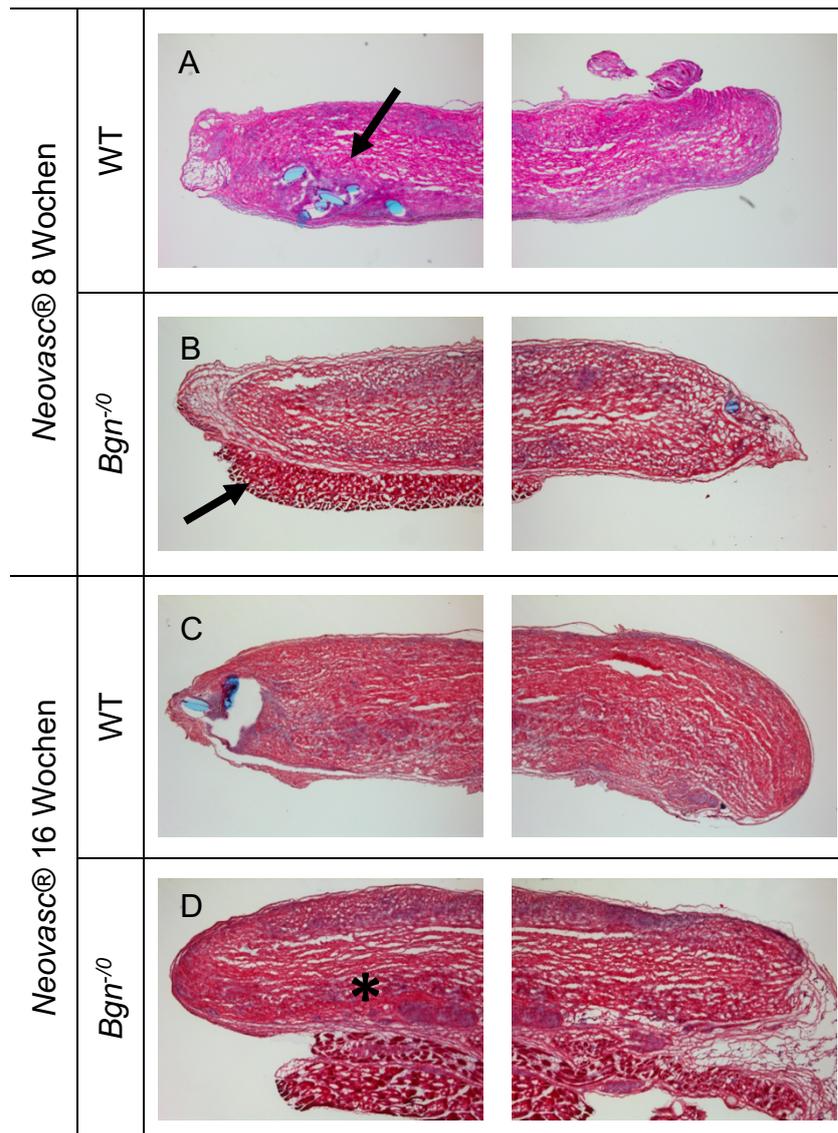


Abb. 14 Tabellarischer Vergleich der Neovasc® Patches, HE Färbung (alle 5x Vergrößerung) (A) WT, 8 Wochen, vollständiger Patch mit Fadenresten innerhalb des Patches (s. Pfeil) (B) *Bgn*⁻⁰, 8 Wochen, Patch mit Muskelanschnitt (s. Pfeil) (C) WT, 16 Wochen, kompakte Struktur des Patches (D) *Bgn*⁻⁰, 16 Wochen, Regionen mit vermehrter Zelldichte (s. Sternchen) (*Bgn*⁻⁰=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp)

Die Abb. 15 veranschaulicht in verschiedenen Detailaufnahmen die Randbereiche eines Patches der Fa. *Edwards*®. Hier wurde sichtbar, wie dicht die zytoplasmatischen Strukturen in der Randzone beieinanderliegen (Abb. 15 B). Je weiter man den Fokus ins Innere des Patches legte, desto dünner wurde die Besiedlung (Abb. 15 B'). Mittig im Patch fanden sich keine Areale mehr mit dunkler Färbung, hier befand sich lediglich das kollagene Grundgerüst (Abb. 15 B'').

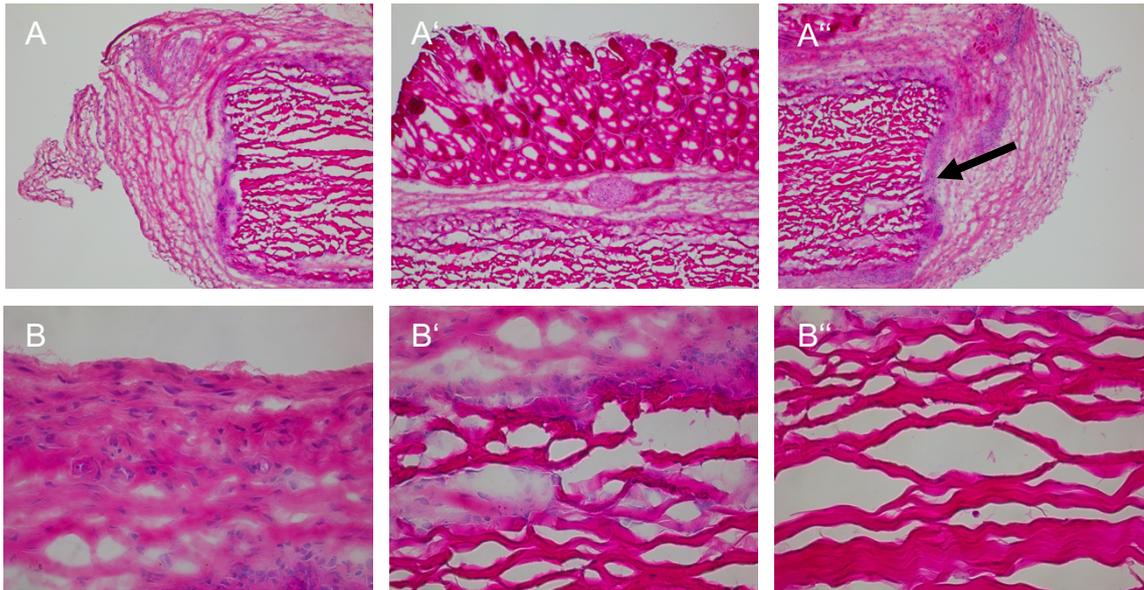


Abb. 15 Detailaufnahmen eines Edwards® Patches, *Bgn*⁻⁰, 8 Wochen (A) Patch umgeben von Bindegewebe der Maus (10x Vergrößerung) **(A')** Am Patch anliegende Muskulatur (10x Vergrößerung) **(A'')** Sehr dichte Zellschicht am Übergang zwischen Patch und umliegendem Gewebe (s. Pfeil; 10x Vergrößerung) **(B)** Dichte Zellbesiedlung im Randbereich des Patches (40x Vergrößerung) **(B')** Abnehmende Dichte der Zellen (40x Vergrößerung) **(B'')** Zellfreier zentraler Patchbereich (40x Vergrößerung)

Im Vergleich dazu zeigt Abb. 16 Detailaufnahmen aus einem Neovasc® Patch. Auch hier präsentierten sich wieder dichte zytoplasmatische Areale in den Randbereichen, mit abnehmender Dichte ins Zentrum des Patches reichend (Abb. 16 B und B'). Zudem ließ sich gut die vermehrte dunkle Färbung um die Einstichstellen herum erkennen (Abb. 16 A u. A'). Dass die Neovasc® Patches nicht von so einer anhaftenden Bindegewebsschicht umgeben waren zeigt Abb. 16 A''. Auch die kompaktere, lamellenartige Struktur des Bioprothesenmaterials dieses Herstellers war gut zu erkennen (Abb. 16 A'' und B).

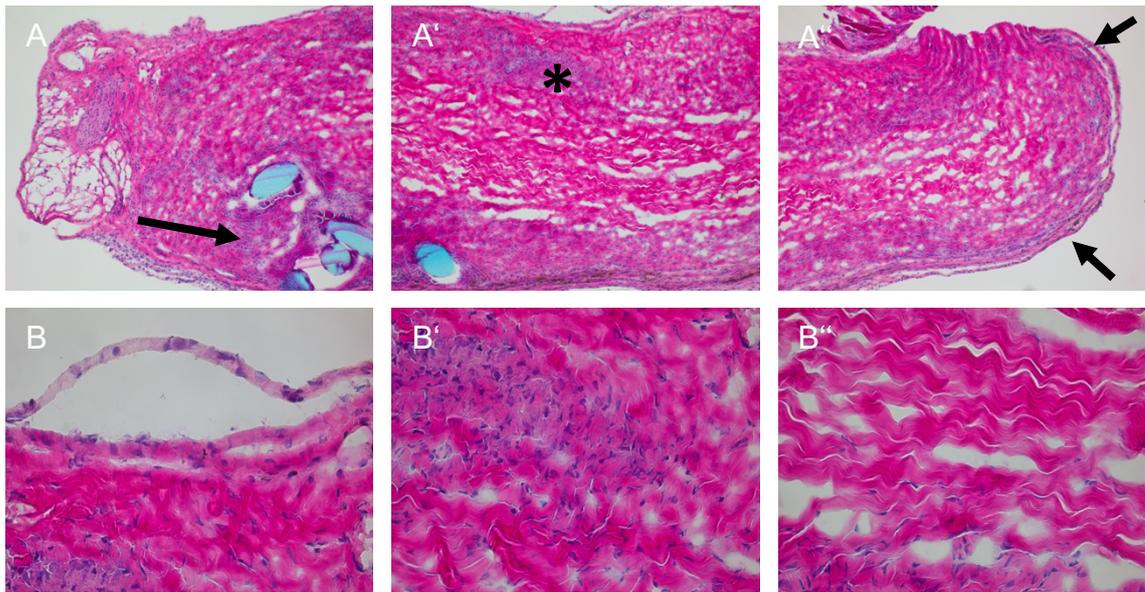


Abb. 16 Detailaufnahmen eines Neovasc® Patches, WT, 8 Wochen (A) Patch mit Resten der Annaht (s. Pfeil; 10x Vergrößerung) **(A')** Dunkle Färbung in den Randabschnitten (s. Sternchen; 10x Vergrößerung) **(A'')** Feine Abschlusschicht einseitig am Patch (s. Pfeile; 10x Vergrößerung) **(B)** Zellen bis an äußersten Rand des Patches darstellbar (40x Vergrößerung) **(B')** Dichte Zellbesiedlung im Randbereich (40x Vergrößerung) **(B'')** Abnehmende Zelldichte ins Innere des Patches (40x Vergrößerung)

3.3.2 Übersichtsfärbung: Movat Pentachrom

Die Movat Pentachrom Färbung diente zur Differenzierung der Matrixbestandteile der Patches. Initial wurde das Protokoll an nativen Patches, welche nicht in den Versuchstieren implantiert waren, angewandt.

Die Nativfärbungen zeigten für das Material beider Hersteller eine Gelbfärbung des gesamten Patches (Abb. 17). Auch hier wies das Bioprothesenmaterial von *Edwards®* und *Neovasc®* eine deutlich unterschiedliche Struktur auf. Der Patch von *Edwards®* präsentierte sich lockerer in seiner Struktur (Abb. 17 A), während der *Neovasc®* Patch dichte Kollagenlamellen zeigte (Abb. 17 B). Des Weiteren fiel auf, dass der *Neovasc®* Patch eine klare Seitenausrichtung hatte. An der oberen Seite befand sich eine kompakte dünne Schicht, während die untere Seite einen lockeren Abschluss aufwies (Abb. 17 B). Bei beiden Herstellern fanden sich diffus im Material verteilt dunkel angefärbte Strukturen zytoplasmatischen Ursprungs (Abb. 17 B').

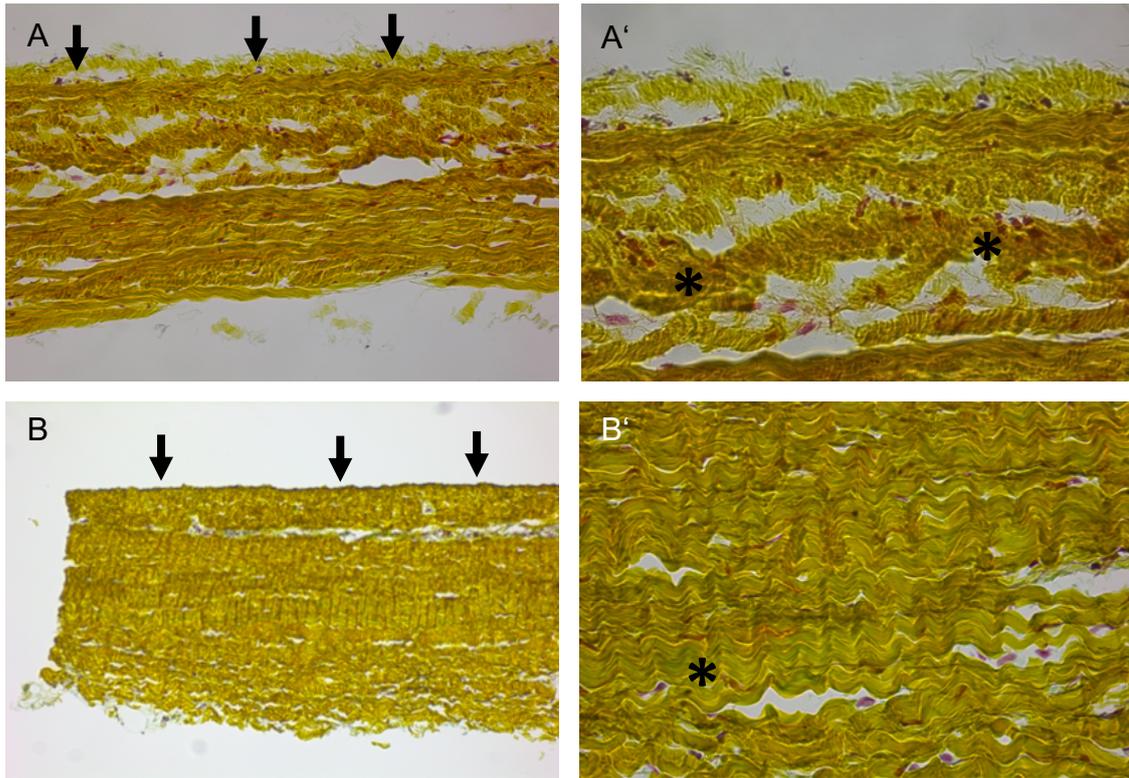


Abb. 17 Movat Pentachrom Färbung der nativen Patches (A) Fa. Edwards® Lockere Bindegewebsstrukturen mit unscharfer Oberfläche (s. Pfeile; 5x Vergrößerung) **(A') Fa. Edwards®** Zellen locker verteilt im Randbereich des Patches (s. Sternchen; 10x Vergrößerung) **(B) Fa. Neovasc®** Dichtere Struktur des Kollagengeflechtes mit kompakter dünner Schicht auf Oberseite (s. Pfeile; 10x Vergrößerung) **(B') Fa. Neovasc®** Wenige Zellen im Randbereich (s. Sternchen; 40x Vergrößerung)

Zunächst erfolgte die Betrachtung der Patches der Fa. Edwards® (Abb. 18). Es zeigte sich eine homogene Gelbfärbung des gesamten Kollagengeflechtes. Mitangeschnittener Muskel stellte sich in kräftigem Rot dar. Die Grundstruktur war auch hier, genau wie bei den gefärbten nativen Patches, deutlich lockerer (Abb. 18 A und C). Es bildeten sich zum Teil Spalten zwischen den Bindegewebssträngen. Vereinzelt ließen sich noch Fadenreste erkennen. Hier fiel jedoch auf, dass sich der Faden eher außerhalb des Patches befand und nicht direkt durch das Implantat zog (Abb. 18 A). Man erkannte deutlich dunkle kreisförmige Anfärbungen in allen Randbereichen. Insbesondere ist dies in Abb. 18 B und D gut zu erkennen. Unterschiede zwischen den WT und *Bgn*⁻⁰ bzw. den 8- und 16-Wochen Tieren ließen sich nicht erkennen.

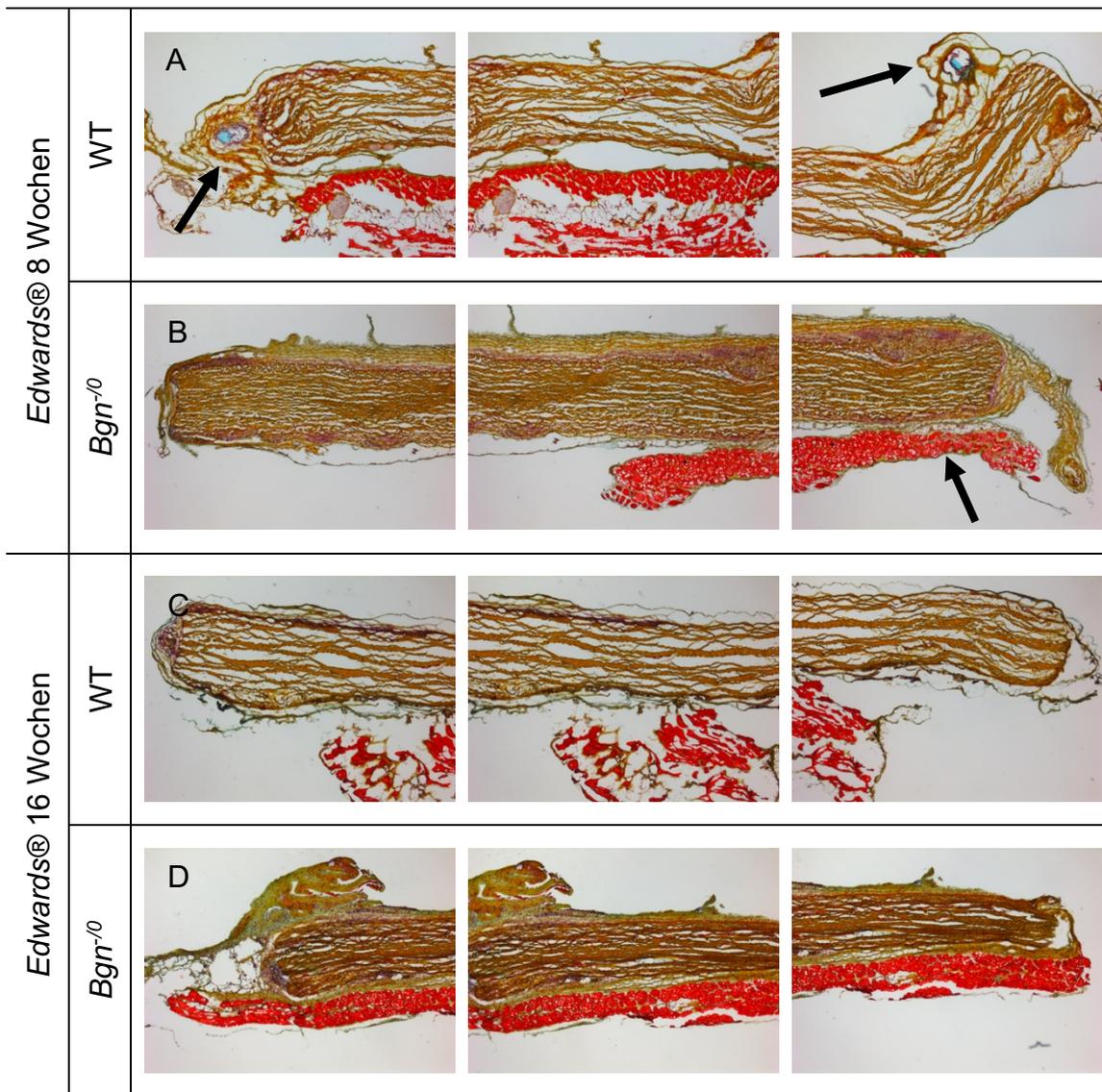


Abb. 18 Tabellarischer Vergleich der *Edwards®* Patches, Movat Pentachrom Färbung (alle 5x Vergrößerung) **(A)** WT, 8 Wochen; Patch mit stark aufgelockerter Kollagenstruktur, das Nahtmaterial liegt außerhalb des Patches (s. Pfeile) **(B)** *Bgn*⁻⁰, 8 Wochen; Patch mit Bindegewebe sowie Muskelanschnitt (s. Pfeil) **(C)** WT, 16 Wochen; Patch mit zerklüftetem Muskelgewebe **(D)** *Bgn*⁻⁰, 16 Wochen; Komplette am Muskel anliegender Patch (*Bgn*⁻⁰=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp)

Nun erfolgte die Betrachtung der Patches der Firma Neovasc®. Die zuvor bei den HE Färbungen beschriebene Kompaktheit ließ sich auch hier wiederfinden, bei gleicher Ausgangsgröße des Patches. Der Patch zeigte sich in der Anfärbbarkeit identisch zu den *Edwards®* Patches; die Kollagenstrukturen waren gelb, die zellulären Bestandteile in den Randbereichen dunkel angefärbt (Abb. 19). Die sich in diesen Patches befindenden Fadenreste zeigten sich hingegen innerhalb des Patches und waren nicht, wie in der vorherigen Abbildung beschrieben, nach außen gewandert (Abb. 19 A). Zudem ließen sich hier vor

allein im Bereich des Fadendurchtritts erneut viele dunkel angefärbte zelluläre Strukturen erkennen (Abb. 19 D). Im Vergleich zu den *Edwards®* Patches gewann man hier den Eindruck einer intakten äußeren Schicht, die den Patch umgibt (Abb. 19 B). Dieser konnte bereits einseitig bei den nativen Patches gesehen werden. Innerhalb der Gruppe der Patches der Fa. *Neovasc®* ergaben sich keine sichtbaren Unterschiede. Dies galt sowohl für die Genotypen als auch für die Patches nach 8- bzw. 16-wöchiger Implantationsdauer.

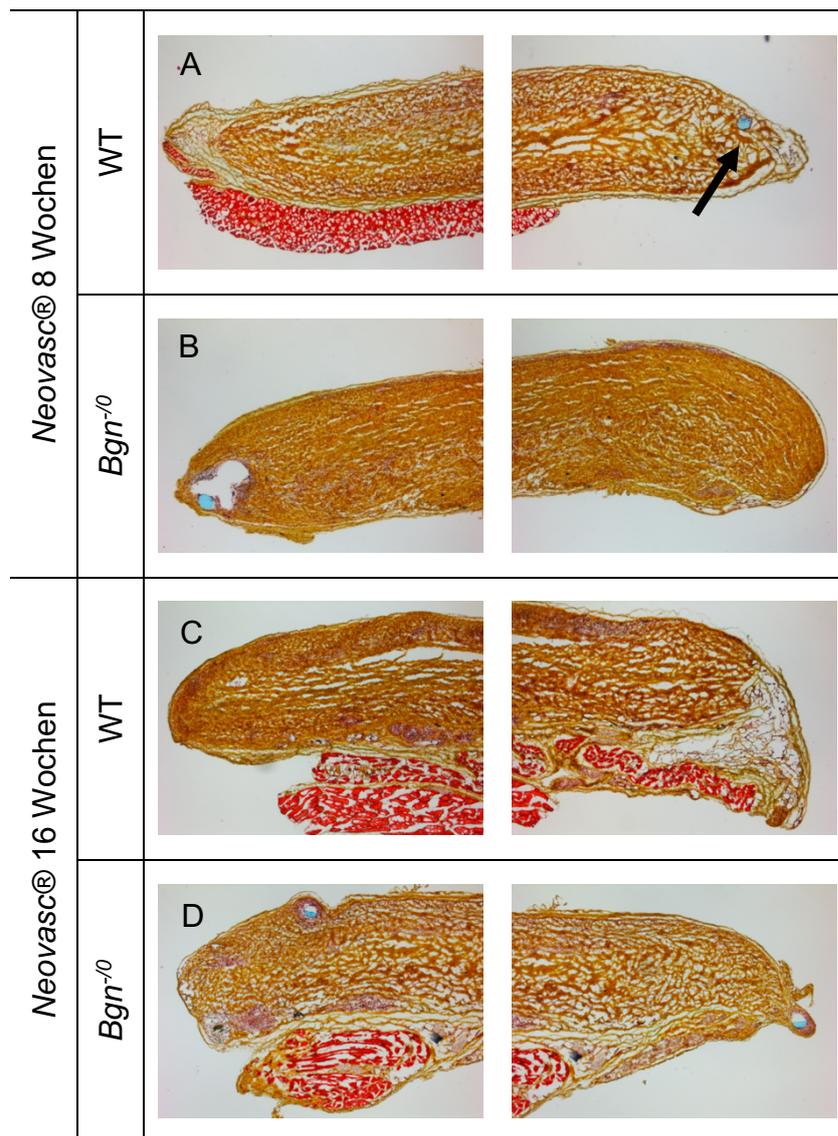


Abb. 19 Tabellarischer Vergleich der *Neovasc®* Patches, Movat Pentachrom Färbung (alle 5x Vergrößerung) (A) WT, 8 Wochen; Patch mit Fadendurchtritt innerhalb des Patches (s. Pfeil) (B) *Bgn*⁻⁰, 8 Wochen; Vollständiger Patch ohne umgebendes Gewebe (C) WT, 16 Wochen; Vollständig explantierter Patch (D) *Bgn*⁻⁰, 16 Wochen; Patch mit randständiger Annaht (*Bgn*⁻⁰=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp)

In Abb. 20 wird exemplarisch ein Patch der Firma *Edwards®* nach 8-wöchiger Implantationsdauer gezeigt. Diese verdeutlicht durch das mit herauspräparierte umliegende Gewebe die gute Integration des Implantates in das Versuchstier. Der gesamte Patch war von Bindegewebe umgeben (Abb. 20 A). Erneut schienen die Annähte im *Edwards®* Patch eher außerhalb zu liegen (Abb. 20 A'). Die zytoplasmatische Besiedlung des umliegenden Bindegewebes war sehr dicht (Abb. 20 C). Die zellulären Strukturen schienen fließend in den Patch überzugehen (Abb. 20 C''). Im zentralen Patch fanden sich deutlich weniger dunkle Strukturen (Abb. 20 C').

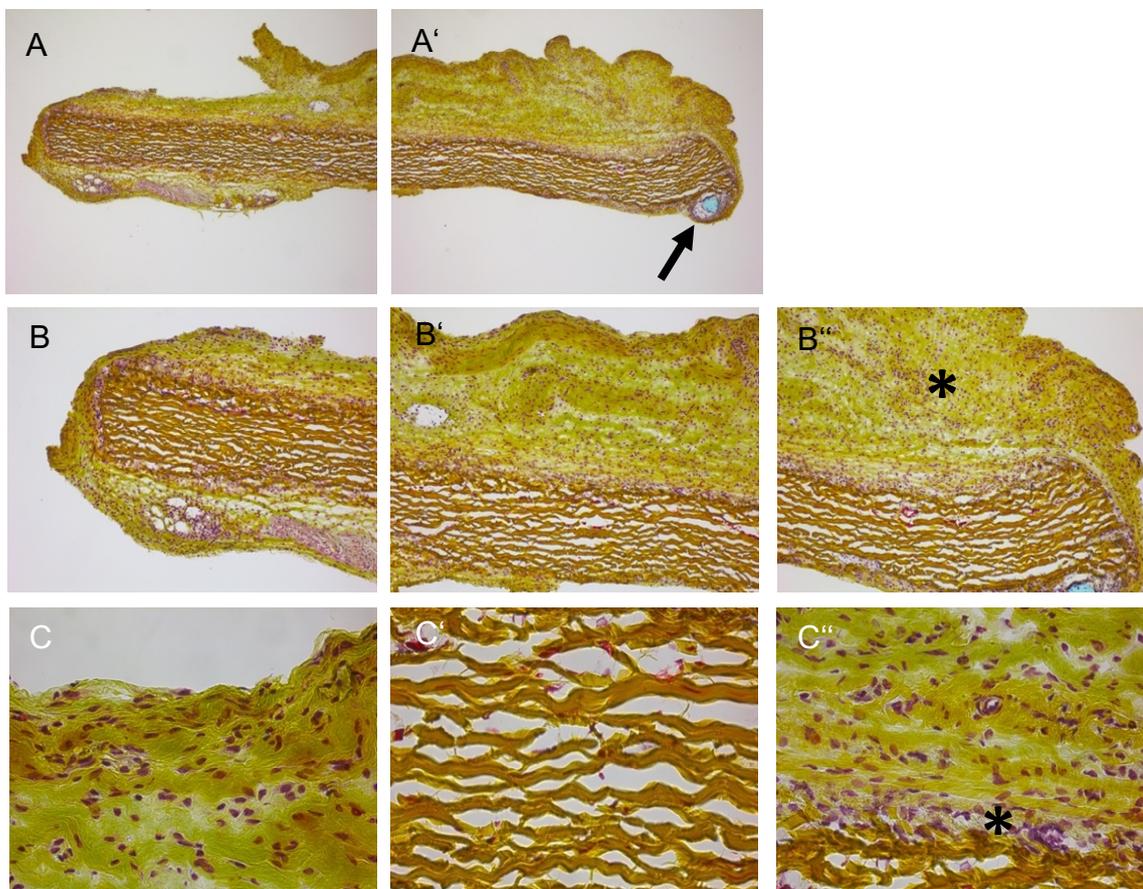


Abb. 20 Detailaufnahmen eines *Edwards®* Patches, WT, 8 Wochen, Movat Pentachrom Färbung (A) Übersichtsaufnahme mit umliegendem Gewebe (5x Vergrößerung) (A') Übersichtsaufnahme mit umliegendem Gewebe und Annäht (s. Pfeil; 5x Vergrößerung) (B) Zellen migrierten fließend in den Patch (10x Vergrößerung) (B') Zellen sowohl im Bindegewebe der Maus als auch im Randareal des Patches homogen verteilt (10x Vergrößerung) (B'') Eine Trennschicht am Rand des Patches ließ sich nicht erkennen, dichte Zellbesiedlung im Bindegewebe (s. Sternchen; 10x Vergrößerung) (C) Verteilung der Zellen im Bindegewebe des Versuchstiers (40x Vergrößerung) (C') Zellarmer Bereich mittig im Patch (40x Vergrößerung) (C'') Übergang der Zellen vom Bindegewebe der Maus in den Patch (s. Sternchen; 40x Vergrößerung)

3.4 Zellmigration

In der Auswertung der Zellmigration wurden zunächst die Patches innerhalb der beiden Herstellergruppen verglichen. Es wurde die eingewanderte Strecke in Relation zur Stärke des Patches bestimmt und prozentual bewertet.

3.4.1 Einfluss des Genotyps und der Implantationsdauer auf die Zellmigration

Edwards®

Vergleicht man die Strecke der Zellmigration in den WT nach 8 und 16 Wochen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Es deutete sich lediglich eine Tendenz zur vermehrten Zellmigration zum späteren Zeitpunkt an (*Edwards®* WT 8 Wo: $0,3235 \pm 0,07$, *Edwards®* WT 16 Wo: $0,4300 \pm 0,12$, $p=0,0734$) (Abb. 21 A). Stellte man jedoch die *Bgn^{-/-}* zu beiden Zeiten gegenüber, ließ sich eine signifikant weitere Strecke der eingewanderten Zellen nach 16 Wochen feststellen (*Edwards® Bgn^{-/-}* 8 Wo: $0,2376 \pm 0,10$, *Edwards® Bgn^{-/-}* 16 Wo: $0,3690 \pm 0,09$, $p=0,0223$) (Abb. 21 B). Innerhalb der Gruppe der Explantationszeitpunkte ergab sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Sowohl nach 8 Wochen als auch nach 16 Wochen blieb der Vergleich zwischen den WT und *Bgn^{-/-}* ohne signifikanten Unterschied (*Edwards®* WT 8 Wo: $0,3235 \pm 0,07$, *Edwards® Bgn^{-/-}* 8 Wo: $0,2376 \pm 0,10$, $p=0,1419$ und *Edwards®* WT 16 Wo: $0,4300 \pm 0,12$, *Edwards® Bgn^{-/-}* 16 Wo: $0,3690 \pm 0,09$, $p=0,3660$) (Abb. 21 C und D).

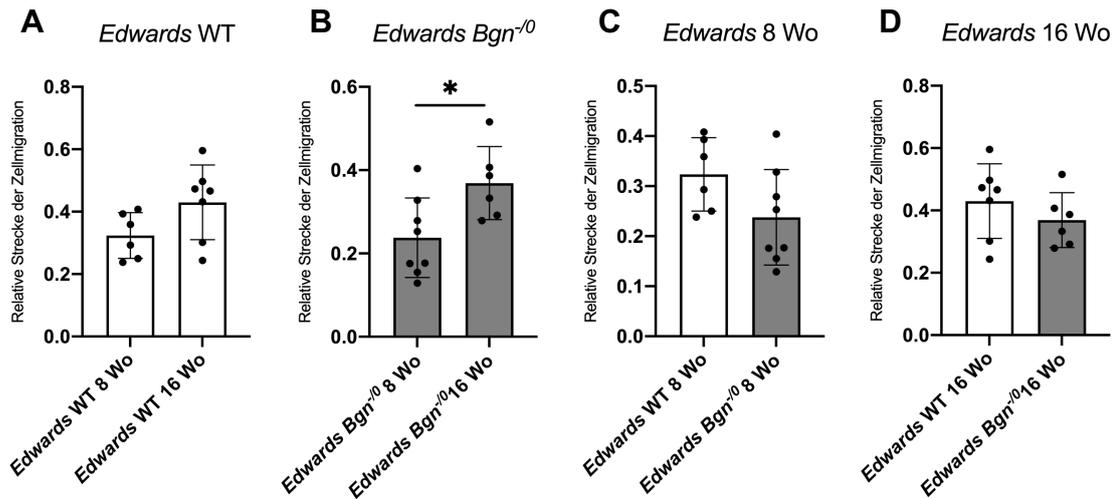


Abb. 21 Vergleich der Strecke der Zellmigration der Patches der Fa. Edwards®
(A) Vergleich der WT nach 8- und 16-wöchiger Implantation Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zellmigration ($p=0,0734$) (WT 8 Wo $n=6$, WT 16 Wo $n=7$)
(B) Vergleich der $Bgn^{-/0}$ nach 8- und 16-wöchiger Implantation Die Zellmigration in den $Bgn^{-/0}$ war signifikant höher ($p=0,0223$) ($Bgn^{-/0}$ 8 Wo $n=8$, $Bgn^{-/0}$ 16 Wo $n=6$)
(C) Vergleich von WT und $Bgn^{-/0}$ nach 8-wöchiger Implantation Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,1419$) (WT 8 Wo $n=6$, $Bgn^{-/0}$ 8 Wo $n=8$)
(D) Vergleich von WT und $Bgn^{-/0}$ nach 16-wöchiger Implantation Erneut ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Strecke der Zellmigration ($p=0,3660$) (WT 16 Wo $n=7$, $Bgn^{-/0}$ 16 Wo $n=6$) (*= $p<0,05$ und **= $p<0,01$) (WT=Wildtyp, $Bgn^{-/0}$ = Biglykan Knockout, Wo=Wochen)

Neovasc®

Im Vergleich der Genotypen verhielten sich die Patches dieses Herstellers ähnlich wie die Patches der Fa. Edwards®. Sowohl in den WT als auch in den $Bgn^{-/0}$ zeigte sich nach 16 Wochen eine Tendenz zur stärkeren Zellmigration, hier jedoch in beiden Fällen ohne Signifikanz (Neovasc® WT 8 Wo: $0,6763\pm 0,09$, Neovasc® WT 16 Wo: $0,7413\pm 0,12$, $p=0,3524$ und Neovasc® $Bgn^{-/0}$ 8 Wo: $0,4576\pm 0,08$, Neovasc® $Bgn^{-/0}$ 16 Wo: $0,6287\pm 0,15$, $p=0,0732$) (Abb. 22 A und B). Betrachtete man nun jedoch getrennt die Explantationszeitpunkte, ließ sich nach einer Verweildauer von 8 Wochen ein signifikanter Unterschied in der Zellmigration feststellen. Die Strecke der Einwanderung in die $Bgn^{-/0}$ war signifikant kürzer als die der WT (Neovasc® WT 8 Wo: $0,6763\pm 0,09$, Neovasc® $Bgn^{-/0}$ 8 Wo: $0,4576\pm 0,08$, $p=0,0087$) (Abb. 22 C). Nach 16 Wochen war die Signifikanz aufgehoben, es zeigte sich lediglich eine Tendenz zur geringeren Migration in die Patches der $Bgn^{-/0}$ (Neovasc® WT 16 Wo: $0,7413\pm 0,12$, Neovasc® $Bgn^{-/0}$ 16 Wo: $0,6287\pm 0,15$, $p=0,2303$) (Abb. 22 D).

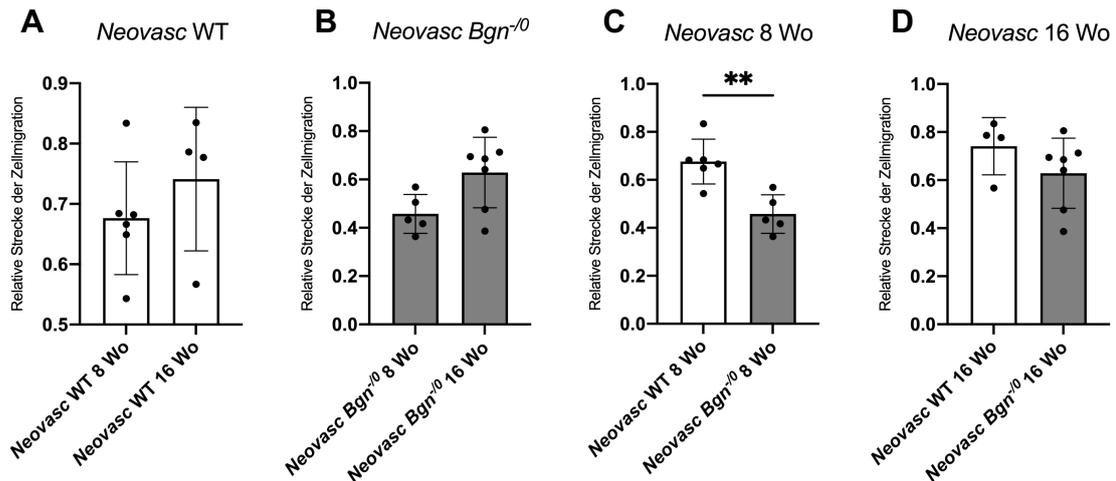


Abb. 22 Vergleich der Strecke der Zellmigration der Patches der Fa. Neovasc®
(A) Vergleich der WT nach 8- und 16-wöchiger Implantation Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zellmigration ($p=0,3524$) (WT 8 Wo $n=6$, WT 16 Wo $n=4$)
(B) Vergleich der *Bgn*^{-/-} nach 8- und 16-wöchiger Implantation Es zeigt sich lediglich eine Tendenz zur vermehrten Zellmigration in den *Bgn*^{-/-} ($p=0,0732$) (*Bgn*^{-/-} 8 Wo $n=5$, *Bgn*^{-/-} 16 Wo $n=7$)
(C) Vergleich von WT und *Bgn*^{-/-} nach 8-wöchiger Implantation Es zeigte sich eine signifikant längere Strecke der Migration in den WT ($p=0,0087$) (WT 8 Wo $n=6$, *Bgn*^{-/-} 8 Wo $n=5$)
(D) Vergleich von WT und *Bgn*^{-/-} nach 16-wöchiger Implantation Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Strecke der Zellmigration ($p=0,2303$) (WT 16 Wo $n=4$, *Bgn*^{-/-} 16 Wo $n=7$) (*= $p<0,05$ und **= $p<0,01$) (WT=Wildtyp, *Bgn*^{-/-}=Biglykan Knockout, Wo=Wochen)

3.4.2 Einfluss des verwendeten Patchmaterials auf die Zellmigration

Abschließend erfolgte die Untersuchung des Einflusses des Patchmaterials auf die relative Strecke der Zellmigration. Zunächst wurden die WT mit Explantation nach 8 Wochen untereinander verglichen. Hier zeigte sich eine signifikant weitere Strecke in den Patches der Fa. Neovasc® (*Edwards*® WT 8 Wo: $0,3235\pm 0,07$, Neovasc® WT 8 Wo: $0,6763\pm 0,09$, $p=0,0022$) (Abb. 23 A). Ebenso verhielt es sich mit den *Bgn*^{-/-} nach 8 Wochen (*Edwards*® *Bgn*^{-/-} 8 Wo: $0,2376\pm 0,10$, Neovasc® *Bgn*^{-/-} 8 Wo: $0,4576\pm 0,08$, $p=0,0031$) (Abb. 23 B). Auch nach 16-wöchiger Implantation war die eingewanderte Strecke in beiden Genotypen in den Patches der Fa. Neovasc® signifikant länger (*Edwards*® WT 16 Wo: $0,4300\pm 0,12$, Neovasc® WT 16 Wo: $0,7413\pm 0,12$, $p=0,0121$, *Edwards*® *Bgn*^{-/-} 16 Wo: $0,3690\pm 0,09$, Neovasc® *Bgn*^{-/-} 16 Wo: $0,6287\pm 0,15$, $p=0,0140$) (Abb. 23 C und D).

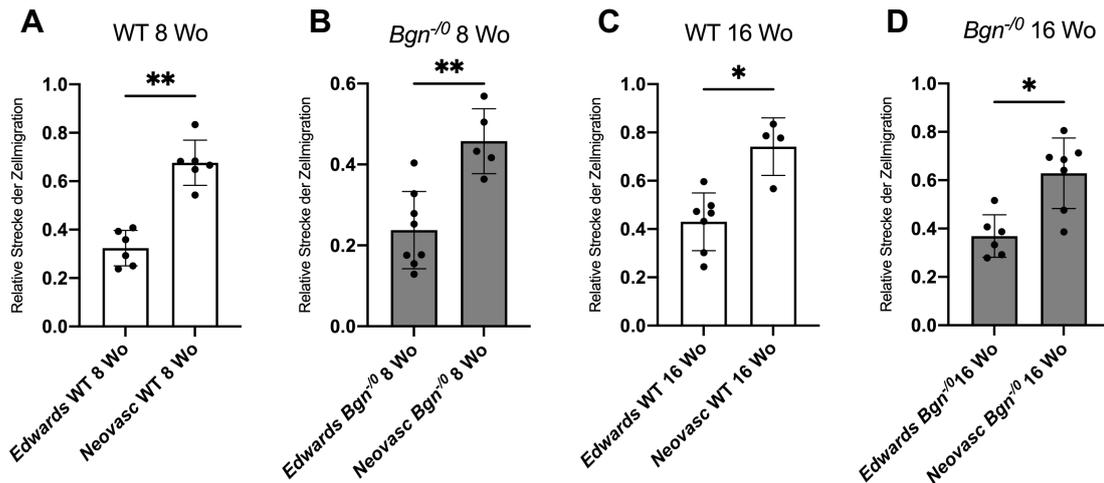


Abb. 23 Vergleich der relativen Strecke der Zellmigration der Patches zwischen beiden Herstellern (A) Es zeigte sich ein signifikant weitere Strecke in den Neovasc® Patches nach 8 Wochen bei den WT ($p=0,0022$) (Edwards® WT 8 Wo $n=6$, Neovasc® WT 8 Wo $n=6$) **(B)** Auch in den *Bgn*^{-/-} zeigte sich nach 8 Wochen eine signifikant stärkere Migration in den *Bgn*^{-/-} ($p=0,0031$) (Edwards® *Bgn*^{-/-} 8 Wo $n=8$, Neovasc® *Bgn*^{-/-} 8 Wo $n=5$) **(C)** Nach 16 Wochen lag die Zelleinwanderung in den Neovasc® WT signifikant höher als in den Edwards® WT ($p=0,0121$) (Edwards® WT 16 Wo $n=7$, Neovasc® 16 WT 16 Wo $n=7$) **(D)** Die Patches aus den Neovasc® *Bgn*^{-/-} erbrachten nach 16 Wochen eine signifikant größere Strecke der Zellmigration als die der Edwards® *Bgn*^{-/-} ($p=0,0140$) (Edwards® *Bgn*^{-/-} 16 Wo $n=6$, Neovasc® *Bgn*^{-/-} 16 Wo $n=7$) (*= $p<0,05$ und **= $p<0,01$) (WT=Wildtyp, *Bgn*^{-/-}=Biglykan Knockout, Wo=Wochen)

3.5 Immunhistologie: Charakterisierung der eingewanderten Zellen

Wie bereits im Abschnitt der Methodik erwähnt, wurden für die verschiedenen vorbehandelten Patches zwei eigene Protokolle verwendet. Leider ist es trotz diverser Modifikationen des Protokolls nicht gelungen, das Perikard der Firma Edwards® Lifesciences so vorzubehandeln bzw. einem entsprechenden Protokoll zu unterziehen, das aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden konnten. Es zeigte sich nach Abschluss der DAB Färbung eine starke unspezifische Anreicherung des Indikators 3,3'-Diaminobenzidin im gesamten Patch, sodass keine Differenzierung der einzelnen Strukturen möglich war. Aufgrund der fehlenden Beurteilbarkeit wurden alle weiteren Färbungen ausschließlich am Material der Firma Neovasc® durchgeführt. Zudem wurde sich auf die Verwendung der Patches aus den 16 Wochen Tieren beschränkt, da hier mit einem deutlicheren Ergebnis zu rechnen war.

Vimentin

Als Positivkontrolle dieses Antiköpers wurde Myokard aus der Maus verwendet. Die Herzen für diese Kontrollen wurden allesamt aus den Versuchstieren des Gesamtversuches entnommen, nachdem diese zur Explantation der Patches getötet wurden (Abb. 24 A). Es zeigten sich in allen Schnitten im Bereich der Zelleinwanderung Vimentin-positive Zellen. Es fand sich vor allem eine starke Anreicherung in Bereichen, in denen eine große Oberfläche durch die Nadeleinstiche entstanden war (Abb. 24 B). Die Färbung zeigte sich größtenteils „wellenförmig“ zwischen den einzelnen Lamellen, welche das verwendete Bioprothesenmaterial im Färbungsprozess bildete (Abb. 24 C). Im mittleren Bereich der Patches, in dem sich auch noch vereinzelt Zellkerne darstellen ließen, fanden sich keine Vimentin-positiven Zellen (Abb. 24 B und D). Unterschiede zwischen den WT und den *Bgn*⁻⁰ ergaben sich nicht.

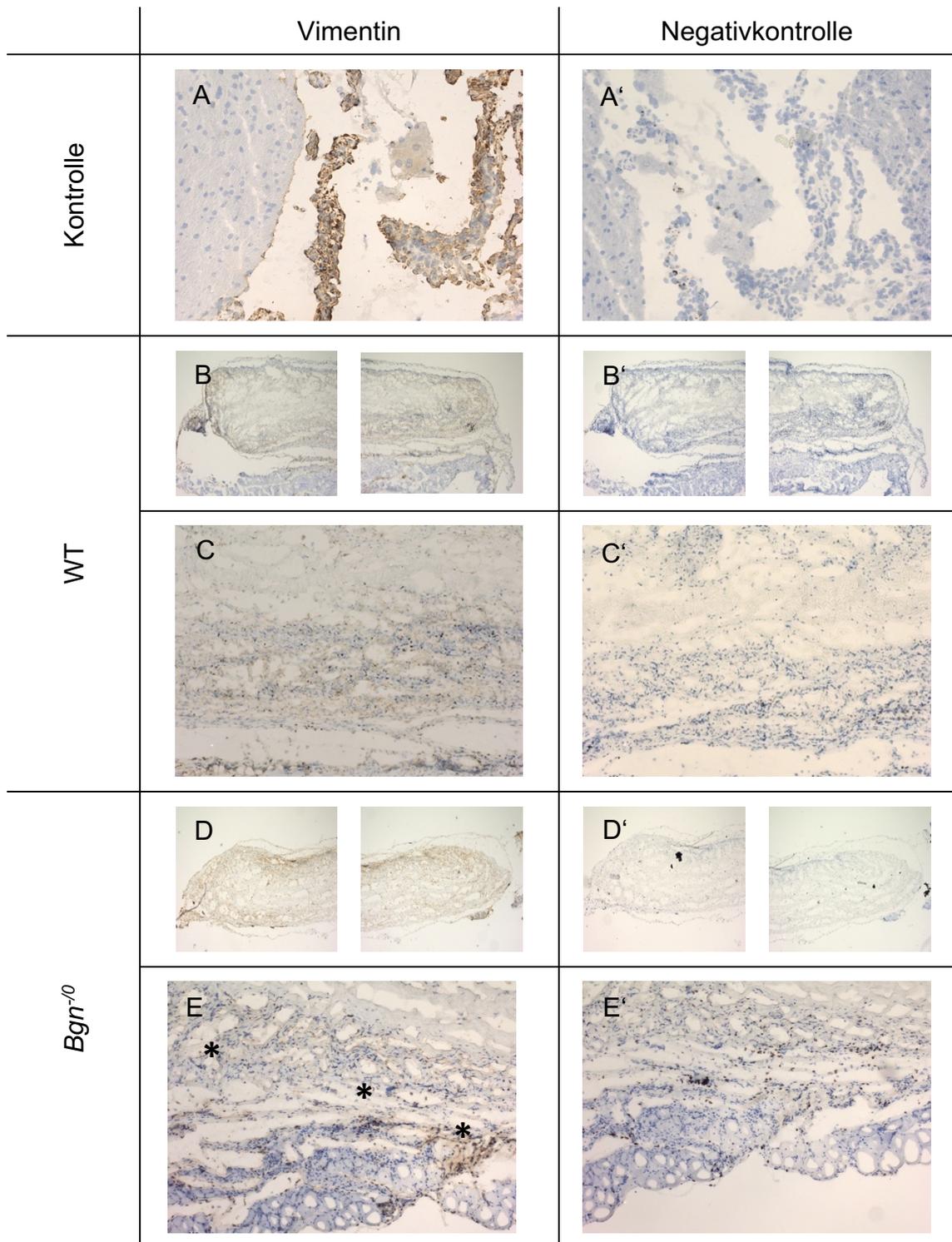


Abb. 24 Immunhistologischer Nachweis Vimentin-positiver Zellen (A) Myokard der Maus als Positivkontrolle (20x Vergrößerung) **(A')** Myokard der Maus als Negativkontrolle (20x Vergrößerung) **(B)** WT, positives Signal für Vimentin in den Randbereichen des Patches (5x Vergrößerung) **(B')** WT, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(C)** WT, Detailaufnahme, positives Signal für Vimentin (20x Vergrößerung) **(C')** Negativkontrolle für die Detailaufnahme (20x Vergrößerung) **(D)** *Bgn*⁻⁰, positives Signal für Vimentin in den Randbereichen des Patches (5x Vergrößerung) **(D')** *Bgn*⁻⁰, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(E)** *Bgn*⁻⁰, Detailaufnahme, positives Signal für Vimentin (s. Sternchen; 20x Vergrößerung)

(E') Negativkontrolle für die Detailaufnahme (20x Vergrößerung) (*Bgn*^{-/-}=Biglykan Knockout, WT=Wildtyp)

Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2)

Als Positivkontrolle dieses Antiköpers wurde ein Querschnitt durch das Ohr einer Maus aus der bestehenden Versuchstierreihe verwendet (Abb. 25 A). Es zeigte sich in allen untersuchten Schnitten eine positive Reaktion in Bereichen in denen Zellen in den Patch eingewandert waren (Abb. 25 B und E). Zellfreie Bereiche hingegen zeigten kein positives Signal für MMP-2 (Abb. 25 C). In manchen Präparaten wurde angeschnittener Muskel eingefärbt. Hier ließ sich kein positives Signal erkennen (Abb. 25 D). Auch hier ließen sich keine Unterschiede bezüglich des Signals zwischen den Genotypen feststellen. Sowohl die WT als auch die *Bgn*^{-/-} zeigten ein positives Signal.

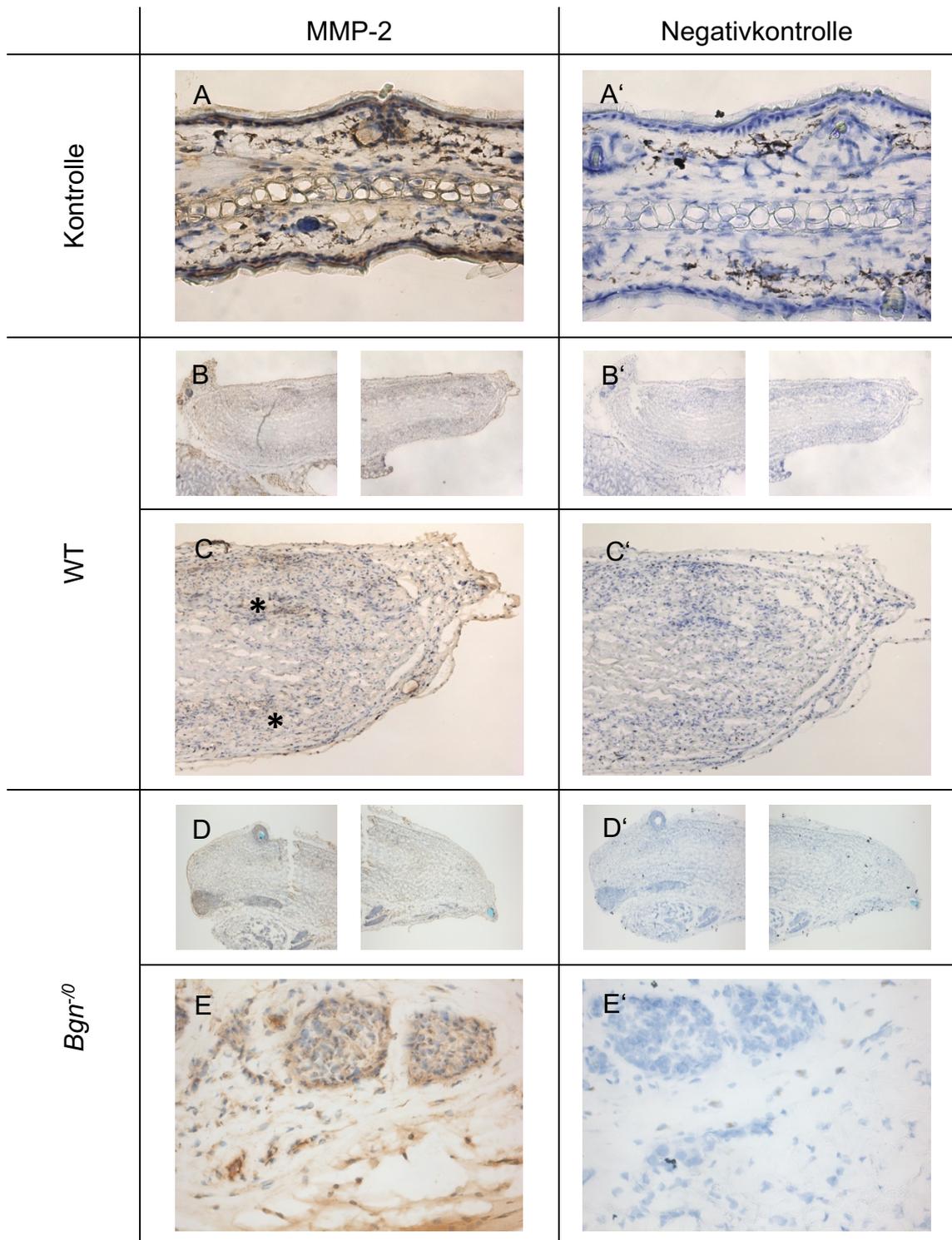


Abb. 25 Immunhistologischer Nachweis MMP-2-positiver Zellen (A) Ohr der Maus als Positivkontrolle (40x Vergrößerung) **(A')** Ohr der Maus als Negativkontrolle (40x Vergrößerung) **(B)** WT, positives Signal für MMP-2 in den Randbereichen des Patches (5x Vergrößerung) **(B')** WT, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(C)** WT, Detailaufnahme, positives Signal für MMP-2 (s. Sternchen; 20x Vergrößerung) **(C')** Negativkontrolle für die Detailaufnahme (20x Vergrößerung) **(D)** *Bgn*⁻⁰, positives Signal für MMP-2 in den Randbereichen des Patches (5x Vergrößerung) **(D')** *Bgn*⁻⁰, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(E)** *Bgn*⁻⁰, Detailaufnahme, positives Signal für MMP-2, sehr deutliches Signal im Bereich vermehrter Zelldichte (40x Vergrößerung)

(E') Negativkontrolle für die Detailaufnahme (40x Vergrößerung) (*Bgn*⁻⁰=Biglykan Knockout, WT=Wildtyp)

Desmin

Für diese Färbung wurde Rückenmuskulatur der Versuchstiere als Positivkontrolle verwendet (Abb. 26 A). Sowohl bei den *Bgn*⁻⁰ als auch bei den WT zeigte sich keine Färbung in den untersuchten Patches (Abb. 26 B und D). Der mitangeschnittene Muskel zeigte eine positive Reaktion (Abb. 26 B).

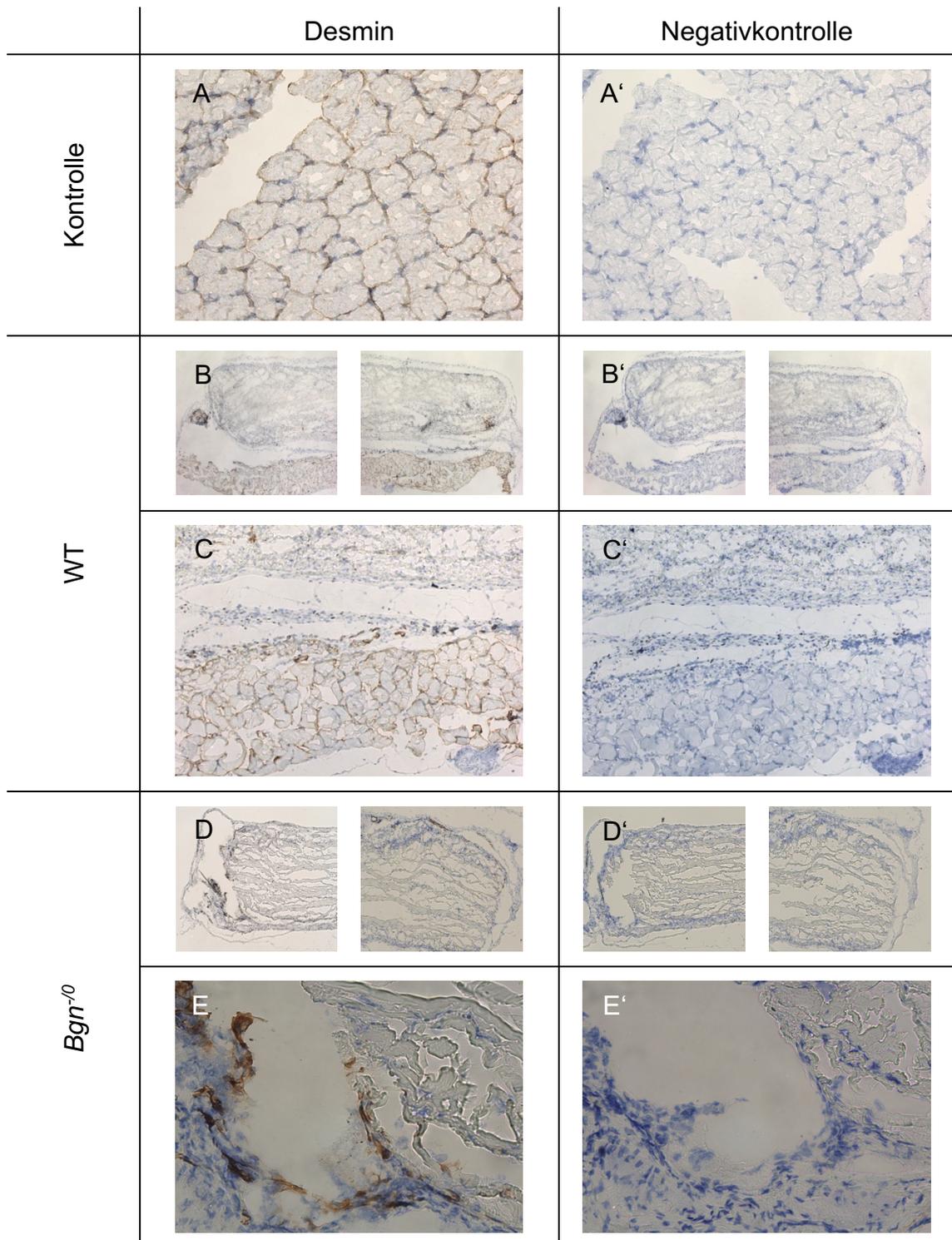


Abb. 26 Immunhistologischer Nachweis Desmin-positiver Zellen (A) Muskel der Maus als Positivkontrolle (20x Vergrößerung) **(A')** Muskel der Maus als Negativkontrolle (20x Vergrößerung) **(B)** WT, kein Signal für Desmin im gesamten Patch (5x Vergrößerung) **(B')** WT, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(C)** WT, Detailaufnahme, kein Signal für Desmin (20x Vergrößerung) **(C')** Negativkontrolle für die Detailaufnahme (20x Vergrößerung) **(D)** *Bgn*⁻⁰, kein Signal für Desmin im gesamten Patch (5x Vergrößerung) **(D')** *Bgn*⁻⁰, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(E)** *Bgn*⁻⁰, Detailaufnahme, kein Signal im Patch, positives Signal außerhalb des Patches im Bindegewebe (40x Vergrößerung) **(E')** Negativkontrolle für die Detailaufnahme (40x Vergrößerung) (*Bgn*⁻⁰=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp)

Von Willebrand Faktor

Zum Nachweis des von Willebrand Faktors (vWF) wurde Lebergewebe der Versuchsmäuse immunhistologisch untersucht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass Schnitte mit Gefäßquerschnitten verwendet wurden, um den Effekt zu verdeutlichen (Abb. 27 A). Die Grundstruktur der untersuchten Patches zeigte kein positives Signal für vWF (Abb. 27 B). Jedoch ließen sich punktuell positive Signale in den Randarealen detektieren (Abb. 27 C). Dies trat unabhängig vom Genotyp auf. Somit ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

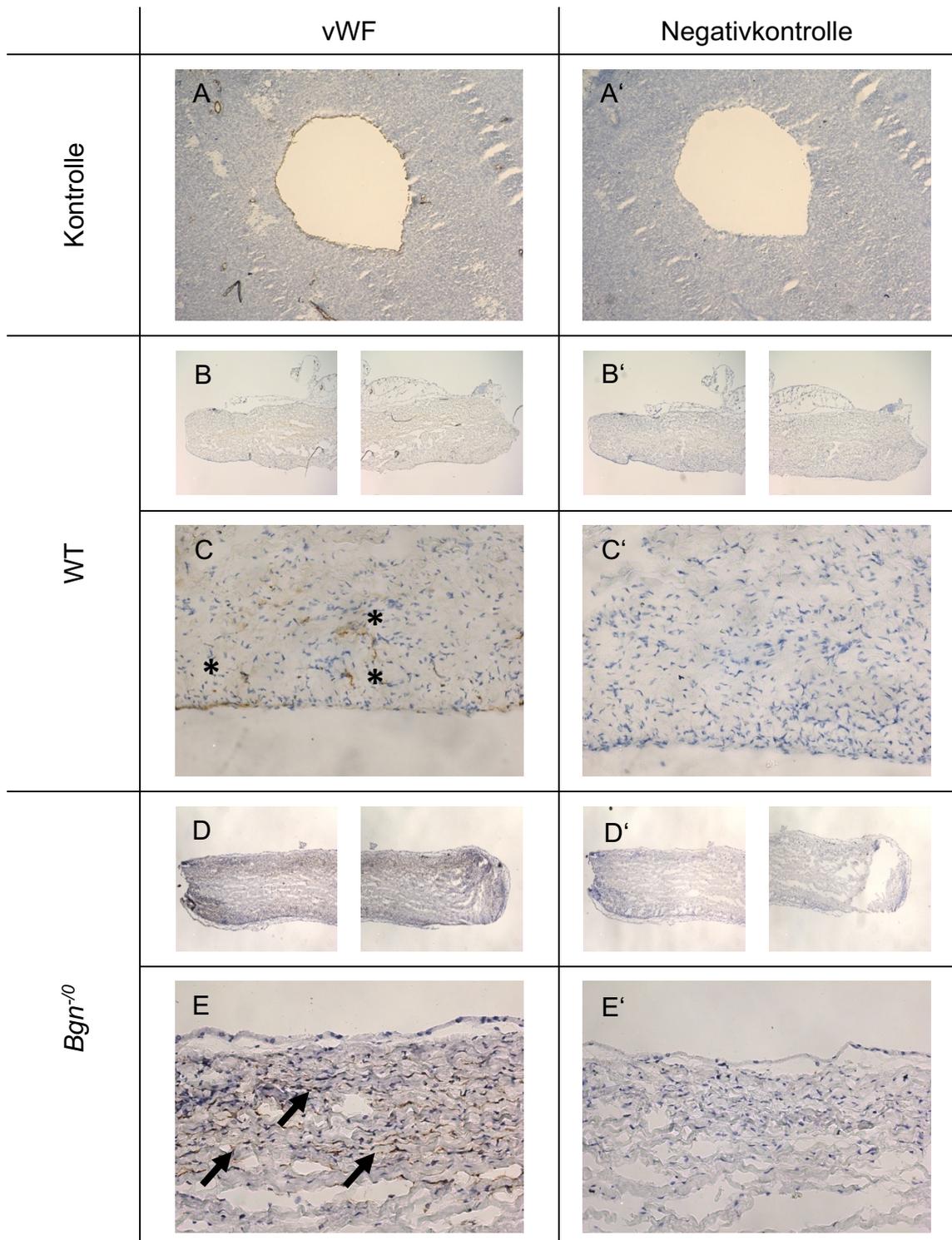


Abb. 27 Immunhistologischer Nachweis vWF-positiver Zellen (A) Lebergewebe der Maus als Positivkontrolle (5x Vergrößerung) (A') Lebergewebe der Maus als Negativkontrolle (5x Vergrößerung) (B) WT, Übersichtsaufnahme ohne erkennbar positives Signal (5x Vergrößerung) (B') WT, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) (C) WT, Detailaufnahme, punktuell positives Signal für vWF (s. Sternchen; 20x Vergrößerung) (C') Negativkontrolle für die Detailaufnahme (20x Vergrößerung) (D) *Bgn*⁻⁰, Übersichtsaufnahme ohne deutlich positives Signal (5x Vergrößerung) (D') *Bgn*⁻⁰, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) (E) *Bgn*⁻⁰, Detailaufnahme, vereinzelte positive Signale im Bereich mit zytoplasmatischen Anteilen (s. Pfeile; 40x Vergrößerung)

(E') Negativkontrolle für die Detailaufnahme (40x Vergrößerung) (*Bgn*⁻⁰=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp)

Ki-67

Für diese Färbung wurde als Positivkontrolle ein Querschnitt des Kolons der Maus verwendet. Abb. 28 zeigt die Expression von Ki-67 in der Darmschleimhaut. Sowohl im Bereich mit zytoplasmatischen Strukturen als auch im zellarmen Bereich im Zentrum des Patches konnte kein Signal erkannt werden. In den Patches der WT als auch in denen der *Bgn*⁻⁰ ließ sich kein positives Signal für Ki-67 nachweisen (Abb. 28 B und C).

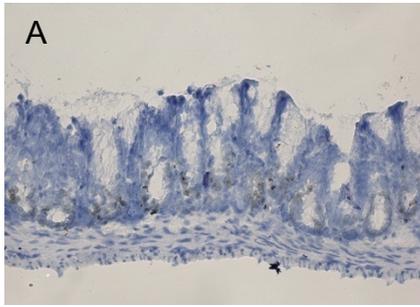
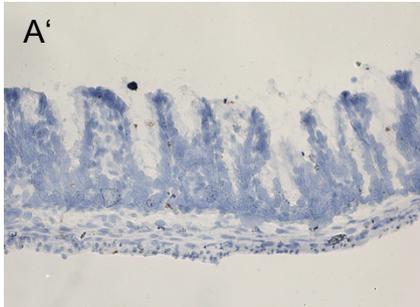
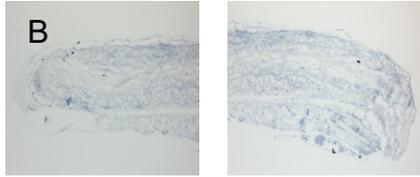
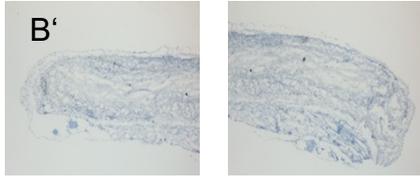
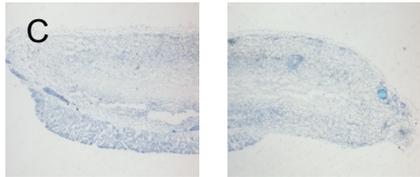
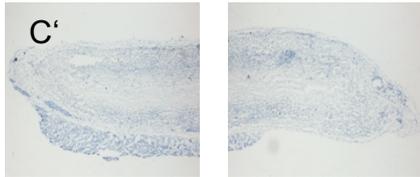
| | Ki 67 | Negativkontrolle |
|--------------------------|---|--|
| Kontrolle |  |  |
| WT |  |  |
| <i>Bgn</i> ⁻⁰ |  |  |

Abb. 28 Immunhistologischer Nachweis Ki-67-positiver Zellen (A) Kolon der Maus als Positivkontrolle (5x Vergrößerung) **(A')** Kolon der Maus als Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(B)** WT, Übersichtsaufnahme ohne erkennbar positives Signal (5x Vergrößerung) **(B')** WT, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(C)** *Bgn*⁻⁰, Übersichtsaufnahme ohne erkennbar positives Signal (5x Vergrößerung) **(C')** *Bgn*⁻⁰, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) (*Bgn*⁻⁰=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp)

CD 3

Zum Nachweis eines möglicherweise positiven Signales für CD 3 wurde Milzgewebe der Versuchstiere verwendet (Abb. 29 A). Im Bereich der migrierten Zellen konnte kein positives Signal erkannt werden. Auch der zellarme Bereich

mittig im Patch ließ keine Färbung erkennen (Abb. 29 B und C). Lediglich in der Region der Annaht konnte gelegentlich ein positives Signal beschrieben werden (Abb. 29 A). Dies war jedoch nicht repräsentativ. Zwischen den WT und den *Bgn*⁻⁰ ergab sich kein Unterschied.

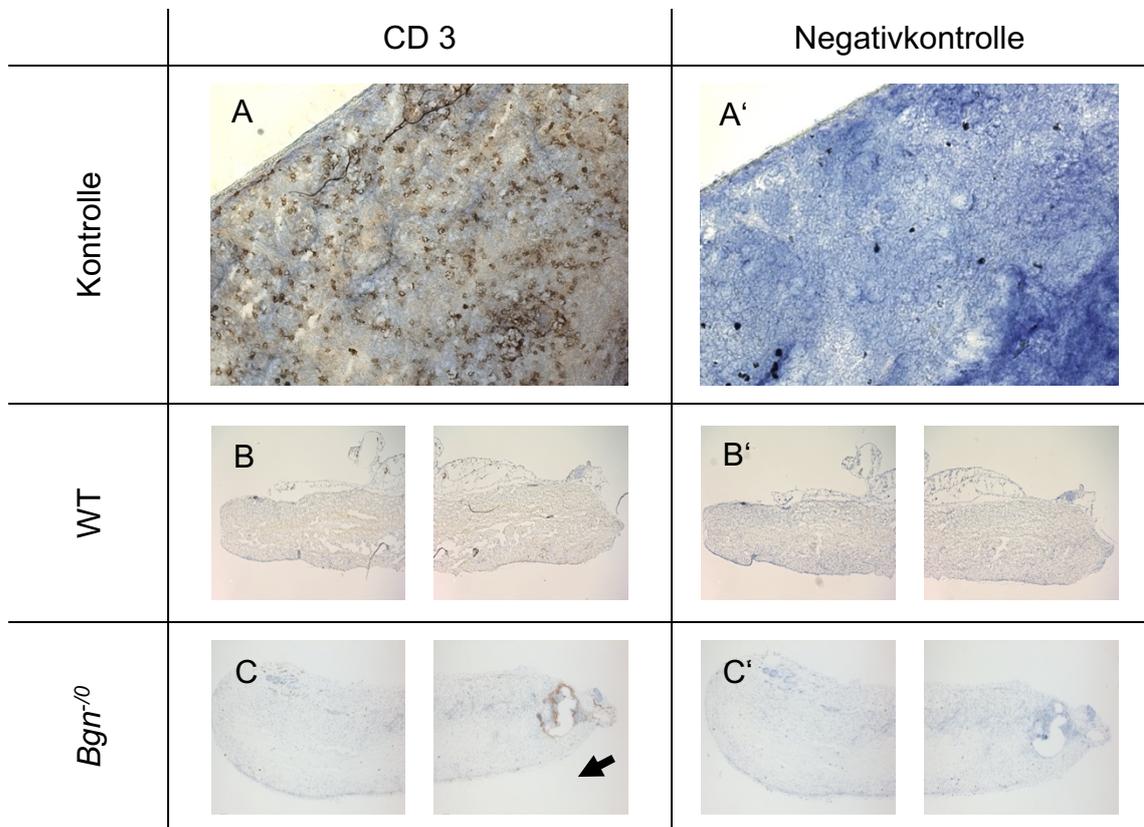


Abb. 29 Immunhistologischer Nachweis CD 3-positiver Zellen (A) Milz der Maus als Positivkontrolle (5x Vergrößerung) (A') Milz der Maus als Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(B)** WT, Übersichtsaufnahme ohne erkennbar positives Signal (5x Vergrößerung) **(B')** WT, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) **(C)** *Bgn*⁻⁰, Übersichtsaufnahme ohne erkennbar positives Signal im Patch selbst. Geringfügig positives Signal im Bereich der Annaht (s. Pfeil; 5x Vergrößerung) **(C')** *Bgn*⁻⁰, Negativkontrolle (5x Vergrößerung) (*Bgn*⁻⁰=Biglykan *Knockout*, WT=Wildtyp)

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es sich bei den eingewanderten Zellen um Vimentin-positive, also mesenchymale nicht-endotheliale Zellen gehandelt hat, die keine erhöhte Proliferationsrate aufwiesen, aber Umbauprozesse im Rahmen von MMP-2 Aktivität zeigten.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Degeneration von Herzklappen-Bioprothesenmaterial ist ein Zusammenspiel aus patientenseitigen Risikofaktoren sowie materialbedingtem Funktionsverlust im Laufe der Jahre nach der Implantation. Aufgrund intensiver Forschung und somit stetiger Verbesserung des Materials erhöht sich die Haltbarkeit des klinisch eingesetzten Prothesenmaterials stetig. Zudem werden die Patienten möglichst optimal medikamentös eingestellt und bezüglich eines angepassten Lebensstils beraten. Jedoch ist es bis dato noch nicht gelungen einen perfekten biologischen Klappenersatz mit unbegrenzter Haltbarkeit zu entwickeln. Dies verdeutlicht, dass jeder Faktor, welcher eine mögliche Rolle im Degenerationsprozess spielen kann, genau untersucht werden sollte.

Der Markt von kommerziell hergestelltem bzw. behandeltem biologischen Material ist groß, wobei die Protokolle der chemischen Behandlung stets ein Firmengeheimnis bleiben. Dies zeigte sich auch bei dem Rinderperikard der Hersteller in der vorliegenden Arbeit.

Bereits makroskopisch fiel auf, dass die Patches der Firma *Neovasc*® von einer bindegewebsartigen Schicht überzogen waren, die bei den Patches aus der *Edwards*® Gruppe in dieser Stärke nicht vorhanden war. Dies lässt sich höchstwahrscheinlich auf die Vorbehandlung zurückführen, da die OP-Methode zu jeder Zeit gleich durchgeführt wurde. Hierdurch könnte man vermuten, dass die *Neovasc*® Patches eine bessere Gewebsintegration aufweisen. In der Analyse der Zellmigration lässt sich dies jedoch nicht belegen. Hier gab es zu keinem Explantations-Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der Zellmigration zwischen den beiden Herstellern. Um die Fragen der Unterschiede in der Zellmigration zu diskutieren sollte zunächst eine genauere Betrachtung der Zelltypen, die in das implantierte Material eingewachsen sind, erfolgen.

Dazu wurden zum einen die Übersichtsfärbungen, vor allem jedoch die immunhistologischen Präparate angefertigt. Leider gelang es nicht, ein geeignetes Färbeprotokoll zum Antikörpernachweis in *Edwards*® Patches zu generieren. Dies könnte auf eine zu starke Quervernetzung der Proteine im Patch

zurückzuführen sein, die einer spezifischen Detektion im Wege standen. So lassen sich hier nur Vermutungen aufstellen, dass es sich bei den eingewanderten Zellen in den Patches beider Hersteller um den gleichen Zelltyp handelt. Im Folgenden bezieht sich die Diskussion immunhistologischer Befunde ausschließlich auf die Analyse der Neovasc® Patches.

Hier ließ sich in zellreichen Regionen der Patches MMP-2 nachweisen. Die MMP-2 ist ein Enzym, welches zur Proteolyse und Umbau von Extrazellulärmatrix-Bestandteilen wie Kollagen befähigt ist und auch im kardiovaskulären System vorkommt [39] [40] [41].

Des Weiteren ließ sich in zellreichen Gebieten der Patches verstärkt Vimentin nachweisen. Vimentin ist ein Intermediärfilament, welches von mesenchymalen Zellen exprimiert wird [42] [43] [44]. Es kommt vor allem in Zellen vor, die eine hohe Beweglichkeit aufweisen und ins Gewebe migrieren [45]. Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, ließ sich Vimentin besonders in den Bereichen nachweisen, wo durch die Anhaftung des Patches eine große Oberfläche und somit die Möglichkeit zum Zelleintritt geschaffen wurde. Die Tatsache, dass in den mit Zellen besiedelten Bereichen eine starke Anreicherung von MMP-2 und Vimentin nachgewiesen werden konnte, lässt also annehmen, dass es sich bei den eingewanderten Zellen um Fibroblasten und nicht um Muskelzellen handelt [46] [47] [48]. Diese These wird dadurch unterstützt, dass das Intermediärfilament Desmin nicht in den Patches nachgewiesen werden konnte. Lediglich in den mit angeschnittenen Muskelfasern zeigte sich hier eine positive Reaktion.

Die Frage nach stattgehabter Angiogenese wurde durch die Testung eines Antikörpers gegen den vWF geklärt. Dieser Faktor ist unter anderem Bestandteil des Endothels von Gefäßen [49]. Da dieser negativ ausfiel, konnte somit keine Gefäßneubildung in den Patches gezeigt werden.

Eine übermäßig hohe Proliferationsrate der eingewanderten Zellen konnte durch eine Färbung des Antikörpers gegen den Proliferationsmarker Ki-67 ausgeschlossen werden [34]. Ki-67 ließ sich in Geweben mit einem sehr hohen Zellumsatz wie beispielsweise Tumorgewebe oder Darmschleimhaut nachweisen [50] [51]. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für Fibroblasten, welche *in vitro* in dreidimensionale Extrazellulärmatrix-Gerüste eingewandert waren, beschrieben [52].

Um zu untersuchen, welchen Einfluss Biglykan auf die migratorischen Eigenschaften der eingewanderten Zellen hat, wurde die relative Strecke der Zellmigration in die Patches verglichen. Hier fiel bei den *Neovasc*® Patches eine signifikant geringere Einwanderung bei den *Bgn*^{-/0} nach 8 Wochen im Vergleich zu den WT auf. Dieser Effekt verliert sich allerdings nach 16 Wochen Implantationsdauer [34]. Dies lässt sich mit den Erkenntnissen von Andrlová et al. in Verbindung bringen, die zeigen konnten, dass *Bgn*^{-/0} Tiere eine niedrigere Festigkeit des Bindegewebes aufweisen als *Bgn*^{+/0} Tiere [53]. Dies könnte durch die verminderte Zellbesiedlung bedingt sein.

Weiterhin gibt es Arbeiten, die Biglykan eindeutig eine pro-migratorische Rolle zuschreiben [54] [55]. Daraus lässt sich die Vermutung aufstellen, dass für die initiale Reaktion auf das implantierte Gewebe Biglykan eine förderliche beziehungsweise beschleunigende Funktion aufweist, in der späteren Phase jedoch keine tragende Rolle für die Geschwindigkeit der Zellmigration hat. Zudem scheint die Funktion des Biglykans abhängig vom Gewebetyp des Implantates zu sein, weil sich das beschriebene Phänomen nicht in den *Edwards*® Patches zeigte. Dies bedeutet, dass die Vorbehandlung des Rinderperikards keinen unerheblichen Einfluss auf die anschließende Reaktion des Empfängers hat und somit über die Geschwindigkeit der Zellantwort mitbestimmt. Dies könnte bedeuten, dass die Behandlung mit Glutaraldehyd den Effekt des Biglykans auf die Zellmigration abschwächt, während der pro-migratorische Effekt im eher lockeren Gewebe von *Neovasc*® deutlich wird.

Anlehnend daran sollten die Ergebnisse aus der Kalziummessung bewertet werden. Betrachtet man zunächst diejenigen der *Edwards*® Patches zeigte sich, dass sich sowohl nach 8 als auch nach 16 Wochen keine Unterschiede im Kalziumgehalt der Patches aus den WT im Vergleich zu den *Bgn*^{-/0} ergaben. In Anlehnung an die verminderte Zellmigration lässt sich dies wahrscheinlich auch durch die Vorbehandlung mit Glutaraldehyd erklären. Die Firma *Edwards*® selbst wirbt damit, dass bei ihrem Verfahren zur Vorbehandlung des Perikards mittels Glutaraldehyd wichtige Bindungsstellen für Kalzium blockiert werden [56]. Die Firma *Neovasc*® macht hierzu in ihrem Produktkatalog keine Angaben. Untersucht man jedoch den Kalziumgehalt der *Neovasc*® Patches zeigten sich deutlich abweichende Ergebnisse. Hier muss jedoch zwischen den kurzfristigen

und den langfristigen (8 bzw. 16 Wochen) Ergebnissen unterschieden werden. Nach 8 Wochen zeigten die Patches aus den *Bgn*⁻⁰ eine höhere Kalziumkonzentration bei geringerer Einwanderungsstrecke. Nach 16 Wochen war die eingewanderte Strecke zwar nicht mehr signifikant niedriger bei den *Bgn*⁻⁰, es zeigte sich jedoch weiterhin eine Tendenz zu geringerer Strecke. Interessanterweise war die gemessene Kalziumkonzentration jedoch signifikant geringer in den Patches der *Bgn*⁻⁰. Somit führte das Fehlen von Biglykan in der Frühphase zu einer geringeren Zellmigration und vermehrter Kalzifizierung, in der Spätphase tendenziell weiterhin zu geringerer Einwanderung mit geringerer Kalzifizierung.

Da *Bgn*⁻⁰ einen osteoporoseähnlichen Phänotyp aufweisen, haben sie eine verminderte Fähigkeit, Kalzium zu speichern. Dies gilt insbesondere für ältere Mäuse [35] [36]. Zusammenfassend lässt dies also vermuten, dass die Rolle von Biglykan in der Kalzifizierung zeitabhängig ist.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Biglykan in der Degeneration von Herzklappen und Herzklappenzellen eine pro-inflammatorische Rolle einnimmt [57] [58] [59].

Daher wäre anzunehmen, dass in den *Bgn*⁻⁰ im Vergleich zum WT eine verminderte Immunreaktion in den Patches zu erwarten gewesen wäre. Um diese Funktion im vorliegenden Tiermodell zu überprüfen erfolgten immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen CD 3. CD 3 befindet sich u.a. auf der Oberfläche von Makrophagen und dient somit als Marker einer immunologischen Antwort [60]. Bezüglich eingewanderter inflammatorischer Zellen konnten hier jedoch keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen WT und *Bgn*⁻⁰ als auch zwischen Kurz- und Langzeitmodell gefunden werden. Um dieses Ergebnis weiterzuverfolgen wurden nach Abschluss der Experimente dieser Arbeit zusätzliche immunhistochemische Färbungen durch Mitglieder der Arbeitsgruppe durchgeführt. Barth et al. untersuchten als weiteren Marker für Makrophagen das Vorhandensein von MAC2 in den Patches. Auch hier ergab sich kein Unterschied zwischen den Genotypen und den Explantationszeitpunkten [34].

Dass sich keine vermehrte Inflammation in dem hier verwendeten Modell zeigte, mag daran liegen, dass sich eine solche Reaktion in einem anderen Zeitraum abgespielt hat als in den von uns gewählten Zeitpunkten von 8 bzw. 16 Wochen nach Implantation. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Reaktion auf das

xenogene Implantat zu mild war, um einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Genotypen festzustellen. Diese Überlegungen würde zu dem generell schwach ausgeprägten Vorhandensein inflammatorischer Zellen im Patch abseits der Nahtregion passen. Somit kann eine überbordende Immunreaktion auch nicht die Ursache für die beobachtete stärkere Kalziumeinlagerung im frühen Zeitpunkt sein.

4.2 Diskussion der Methodik und Studienlimitierung

4.2.1 Tierversuch

Die Limitationen eines Tierversuches zum besseren Verständnis humaner Pathologien sind naheliegend. Inwieweit Rückschlüsse aus gewonnenen Versuchsergebnissen auf den menschlichen Organismus zu ziehen sind lässt sich meist nur vermuten. Zahlreiche Arbeiten haben jedoch in der Vergangenheit bereits gezeigt, dass unter Berücksichtigung gewisser Standards das Mausmodell vielversprechende Erkenntnisse für die Humanmedizin liefern kann [61].

Die Daten in der vorliegenden Arbeit hätten bei höherer Anzahl an Versuchstieren eventuell eindeutigere Ergebnisse geliefert, bzw. Tendenzen verstärkt. Hierbei sei jedoch erwähnt, dass im Vorfeld der Tierversuche eine Poweranalyse erfolgt ist, auf deren Basis die Gruppengröße gewählt wurde.

In Bezug auf die gewählten Zeitpunkte der Patch-Explantation wurde bereits der Einfluss des geeigneten Zeitfensters diskutiert. Interessant wäre hier eine längere Beobachtung der Tiere mit Explantationen der Patches zu späteren Zeitpunkten. Der Prozess der Verkalkung im menschlichen Organismus verläuft über viele Jahre und nicht über wenige Wochen. Zwar wurde im Tierversuch die Kalzifizierung durch die Gabe von VitD reichem Futter verstärkt, jedoch auch nur in begrenztem Ausmaß, wie die Daten der Kalziummessung zeigten.

Zudem beinhaltet das Modell der ektopen Implantation, dass das Rinderperikard an atypischer Stelle platziert wird. Während nach Klappenrekonstruktion das implantierte Material im Menschen hohen Scherkräften ausgesetzt ist und durchgehend von Blut und dessen zellulären Bestandteilen umspült wird, liegt es im Mausmodell angeheftet am Rückenmuskel unter der Haut, was eine direkte Vergleichbarkeit nicht zulässt.

Diese Punkte zeigen, dass die erzielten Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden können. Jedoch geben sie richtungsweisende Erkenntnisse für weitere Forschungsansätze.

4.2.2 Untersuchung der Explantate

Auch die in dieser Arbeit angewandte Methodik weist ihre Grenzen auf. Die Unkenntnis der exakten Vorbehandlung des verwendeten Rinderperikards erschwerte deutlich die weitere Behandlung, insbesondere die immunhistochemischen Färbungen. Gerade hier wäre eine differenzierte Betrachtung der Zelltypen auch zwischen den verschiedenen Fabrikaten interessant gewesen. Wünschenswert wäre für zukünftige Betrachtungen die Entwicklung von Färbeprotokollen, die auf alle vorbehandelten Materialien anzuwenden sind und somit eine optimale Vergleichbarkeit erzielen.

Auch das Zurückgreifen auf kommerziell hergestelltes Rinderperikard ist kritisch zu beurteilen, da hier nur ein minimaler Ausschnitt aus einer großen Bandbreite an Produkten abgebildet werden konnte.

4.3 Fazit und Ausblick

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit können Hinweise auf die Rolle von Biglykan in der frühen Phase der Degeneration von bovinem Herzklappen-Bioprothesenmaterial geben und somit Ansatzpunkt für mögliche antikalzifizierende Therapien werden. Als Ausblick wäre eine Erweiterung der Versuchsreihe um spätere Explantationszeitpunkte denkbar, um die sich hier andeutende zeitabhängige Funktion von Biglykan besser zu verstehen. Zudem wurde aus den Versuchstieren ein Patch explantiert, welcher bei -80°C konserviert wurde und für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stünde. Dieser könnte in weiteren Analysen zur Verifizierung der in der vorgelegten Arbeit dargestellten Ergebnisse z.B. auf Genexpressionsebene verwendet werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. (Destatis), S.B., *Statistisches Bundesamt (Destatis), Genesis-Online, 01.01.2018; Datenlizenz by-2-0*. 2018.
2. Diederichs, C., et al., [*Regional differences in the prevalence of cardiovascular risk factors in men and women in Germany*]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2017. **60**(2): p. 151-162.
3. *Robert Koch-Institut, Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring (20013): Studie DEGS1, Erhebung 2008–2011*
4. Lennon, R.P., K.A. Claussen, and K.A. Kuersteiner, *State of the Heart: An Overview of the Disease Burden of Cardiovascular Disease from an Epidemiologic Perspective*. Prim Care, 2018. **45**(1): p. 1-15.
5. Stewart, B.F., et al., *Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease* *fn1fn1This study was supported in part by Contracts NO1-HC85079 through HC-850086 from the National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*. Journal of the American College of Cardiology, 1997. **29**(3): p. 630-634.
6. Schoen, F.J., *Morphology, Clinicopathologic Correlations, and Mechanisms in Heart Valve Health and Disease*. Cardiovascular Engineering and Technology, 2018. **9**(2): p. 126-140.
7. lung, B., *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease*. European Heart Journal, 2003. **24**(13): p. 1231-1243.
8. <herzbericht-2016 (1).pdf>.
9. Kostrzewa, B. and Z. Rybak, [*History, present and future of biomaterials used for artificial heart valves*]. Polim Med, 2013. **43**(3): p. 183-9.
10. Siddiqui, R.F., J.R. Abraham, and J. Butany, *Bioprosthetic heart valves: modes of failure*. Histopathology, 2009. **55**(2): p. 135-44.
11. <2018_Pocket_Leitlinien_Herzklappenerkrankung_Version_2017.pdf>.
12. Nagele, H., et al., [*Aortic valve replacement with homografts. An overview*]. Herz, 2000. **25**(7): p. 651-8.
13. Forcillo, J., et al., *Carpentier-Edwards pericardial valve in the aortic position: 25-years experience*. Ann Thorac Surg, 2013. **96**(2): p. 486-93.
14. Binet, J.P., et al., [*Implantation of heterogenic valves in the treatment of aortic cardiopathies*]. C R Acad Hebd Seances Acad Sci D, 1965. **261**(25): p. 5733-4.
15. Manji, R.A., W. Lee, and D.K.C. Cooper, *Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future*. Int J Surg, 2015. **23**(Pt B): p. 280-284.
16. Carpentier, A., et al., *Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 1969. **58**(4): p. 467-483.
17. <Human blood lymphocyte subpopulations from birth to eight years.pdf>.
18. Simionescu, D.T., *Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives*. Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**(12): p. 1971-85.
19. Toussaint, N.D., *Extracellular matrix calcification in chronic kidney disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2011. **20**(4): p. 360-8.
20. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: p. 4-27.
21. Theocharis, A.D., D. Manou, and N.K. Karamanos, *The extracellular matrix as a multitasking player in disease*. FEBS J, 2019. **286**(15): p. 2830-2869.
22. Mouw, J.K., G. Ou, and V.M. Weaver, *Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(12): p. 771-85.

23. Bonnans, C., J. Chou, and Z. Werb, *Remodelling the extracellular matrix in development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(12): p. 786-801.
24. Martignetti, J.A., et al., *Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome*. Nat Genet, 2001. **28**(3): p. 261-5.
25. Merline, R., R.M. Schaefer, and L. Schaefer, *The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs)*. Journal of Cell Communication and Signaling, 2009. **3**(3): p. 323-335.
26. Iozzo, R.V., *MATRIX PROTEOGLYCANS: From Molecular Design to Cellular Function*. Annual Review of Biochemistry, 1998. **67**(1): p. 609-652.
27. Schaefer, L., et al., *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2223-33.
28. Chen, G.Y. and G. Nuñez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
29. Mercado, M.L., et al., *Biglycan regulates the expression and sarcolemmal localization of dystrobrevin, syntrophin, and nNOS*. Faseb j, 2006. **20**(10): p. 1724-6.
30. <Localization and Pattern of Expression of Extracellular Matrix Components in Human Heart Valves.pdf>.
31. Riessen, R., et al., *Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries*. Am J Pathol, 1994. **144**(5): p. 962-74.
32. Santiago-García, J., T. Kodama, and R.E. Pitas, *The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 6942-6.
33. Wiberg, C., et al., *Biglycan and decorin bind close to the n-terminal region of the collagen VI triple helix*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18947-52.
34. Barth, M., et al., *Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve*. Diab Vasc Dis Res, 2019. **16**(3): p. 254-269.
35. Xu, T., et al., *Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice*. Nature genetics, 1998. **20**(1): p. 78-82.
36. Young, M.F., et al., *Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases*. Glycoconj J, 2002. **19**(4-5): p. 257-62.
37. Steitz, S.A., et al., *Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification*. Am J Pathol, 2002. **161**(6): p. 2035-46.
38. Ohri, R., et al., *Mitigation of ectopic calcification in osteopontin-deficient mice by exogenous osteopontin*. Calcif Tissue Int, 2005. **76**(4): p. 307-15.
39. Kandasamy, A.D., et al., *Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(3): p. 413-23.
40. Van Doren, S.R., *Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin*. Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 224-31.
41. Fields, G.B., *Interstitial collagen catabolism*. J Biol Chem, 2013. **288**(13): p. 8785-93.
42. Franke, W.W. and R. Moll, *Cytoskeletal components of lymphoid organs. I. Synthesis of cytokeratins 8 and 18 and desmin in subpopulations of extrafollicular reticulum cells of human lymph nodes, tonsils, and spleen*. Differentiation, 1987. **36**(2): p. 145-63.
43. Kartenbeck, J., et al., *Attachment of vimentin filaments to desmosomal plaques in human meningioma cells and arachnoidal tissue*. J Cell Biol, 1984. **98**(3): p. 1072-81.
44. Dave, J.M. and K.J. Bayless, *Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting*. Microcirculation, 2014. **21**(4): p. 333-44.
45. Mendez, M.G., S. Kojima, and R.D. Goldman, *Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition*. Faseb j, 2010. **24**(6): p. 1838-51.

46. Cheng, F., et al., *Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(30): p. E4320-7.
47. Howard, E.W., et al., *MMP-2 expression by fibroblasts is suppressed by the myofibroblast phenotype*. Exp Cell Res, 2012. **318**(13): p. 1542-53.
48. Kobayashi, T., S. Hattori, and H. Shinkai, *Matrix metalloproteinases-2 and -9 are secreted from human fibroblasts*. Acta Derm Venereol, 2003. **83**(2): p. 105-7.
49. Rubio, C.A., *Differences in angiogenesis and collagenesis between exophytic and flat adenomas of the colorectal mucosa*. Anticancer Res, 1997. **17**(1b): p. 737-42.
50. Sun, X. and P.D. Kaufman, *Ki-67: more than a proliferation marker*. Chromosoma, 2018. **127**(2): p. 175-186.
51. He, W., Y. Xiao, and W.M. Chen, *[Expression of Ki-67 and P53 protein in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance]*. Shanghai Kou Qiang Yi Xue, 2015. **24**(2): p. 228-31.
52. Barth, M., et al., *The adhering junctions of valvular interstitial cells: molecular composition in fetal and adult hearts and the comings and goings of plakophilin-2 in situ, in cell culture and upon re-association with scaffolds*. Cell Tissue Res, 2012. **348**(2): p. 295-307.
53. Andrlová, H., et al., *Biglycan expression in the melanoma microenvironment promotes invasiveness via increased tissue stiffness inducing integrin- β 1 expression*. Oncotarget, 2017. **8**(26): p. 42901-42916.
54. Shimizu-Hirota, R., et al., *Extracellular matrix glycoprotein biglycan enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Circ Res, 2004. **94**(8): p. 1067-74.
55. Tufvesson, E. and G. Westergren-Thorsson, *Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 23): p. 4857-64.
56. Lifesciences, E. *Edwards Portfolio an Aorten-Perikardklappen*. 2020; Available from: <https://www.edwards.com/de/devices/heart-valves/aortic-pericardial>.
57. Song, R., et al., *Soluble biglycan induces the production of ICAM-1 and MCP-1 in human aortic valve interstitial cells through TLR2/4 and the ERK1/2 pathway*. Inflamm Res, 2014. **63**(9): p. 703-10.
58. Roedig, H., et al., *Breaking down chronic inflammatory diseases: the role of biglycan in promoting a switch between inflammation and autophagy*. Febs j, 2019. **286**(15): p. 2965-2979.
59. Derbali, H., et al., *Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2*. Am J Pathol, 2010. **176**(6): p. 2638-45.
60. Rodriguez-Cruz, A., et al., *CD3(+) Macrophages Deliver Proinflammatory Cytokines by a CD3- and Transmembrane TNF-Dependent Pathway and Are Increased at the BCG-Infection Site*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2550.
61. Justice, M.J. and P. Dhillon, *Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility*. Dis Model Mech, 2016. **9**(2): p. 101-3.

6 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg bedanken. Er hat es mir durch die Überlassung des Dissertationsthemas ermöglicht, in seinem außergewöhnlichen, engagierten Team die wissenschaftlichen Arbeiten durchzuführen und die Dissertation zu verfassen. Ich habe mich jederzeit sehr glücklich geschätzt, Teil dieses Teams zu sein.

Selbstverständlich gilt mein großer Dank auch Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari. Durch seine offene Art hat er mich sofort für die Arbeit in seinem Labor motiviert und war jederzeit für das Team und mich da. Er hat mir gezeigt, wie man auf höchstem Niveau wissenschaftlich und klinisch arbeiten kann und dabei eine freundschaftliche Art zu bewahren.

Ohne meine Betreuerin Dr. rer. nat. Mareike Barth wäre diese Arbeit jedoch nie möglich gewesen. Durch ihr unermüdliches Engagement, ihre weite Expertise und letztendlich ihre Freundschaft hat sie mich jederzeit geleitet und unterstützt. Ich verdanke ihr sehr, sehr viel.

Zudem gilt mein Dank der gesamten Forschungsgruppe der Klinik für Herzchirurgie. Ich wurde mit offenen Armen empfangen und habe zu jederzeit außergewöhnliche fachliche als auch persönliche Unterstützung erfahren. Der ständige kollegiale Austausch und das gemeinsame wissenschaftliche Arbeiten waren stets bereichernd.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner besten Freundin Svenja Klose bedanken, mit der ich viele gemeinsame Stunden im Labor verbracht habe. Unsere tiefe Verbundenheit hat die manchmal späten Abendstunden im Labor wie im Flug vergehen lassen. Ich kann mich sehr glücklich schätzen, einen so besonderen Menschen in meinem Leben zu haben.

Dem Mann an meiner Seite, Thomas Bartsch, bin ich zudem zu tiefem Dank verpflichtet. Vor allem auf den letzten Metern hat er mir den nötigen Zuspruch gegeben und mich motiviert. Seine kritische Korrektur hat mir die richtigen Denkanstöße gegeben und mich die Arbeit abschließen lassen.

Abschließend möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meinen Eltern bedanken. Zu jeder Zeit in meinem Leben haben sie mich bedingungslos unterstützt. Nie lasteten überhöhte Erwartungen oder Ansprüche auf mir, sie haben mir immer ihr volles Vertrauen und ihre Liebe geschenkt. Das werde ich ihnen nie vergessen.