

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

Charakterisierung der ex-vivo-Aortenklappenkalzifizierung in einem  
vollautomatisierten Bioreaktor-Modell unter prokalzifizierenden  
Bedingungen

Dissertation

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

vorgelegt von  
Babak Shakiba  
2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: PD Dr. med. Florian Simon

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Niazy N, Barth M, Selig JI, Feichtner S, Shakiba B, Candan A, Albert A, Preuß K, Lichtenberg A, Akhyari P (2021), Degeneration of Aortic Valves in a Bioreactor System with Pulsatile Flow. *Biomedicines* 9, no. 5: 462

## Zusammenfassung

Die kalzifizierende Aortenklappenstenose (engl. CAVD) ist die häufigste erworbene Herzklappenerkrankung in Industrienationen. Die Früherkennung in den asymptomatischen Stadien gestaltet sich schwierig, der Aortenklappenersatz in den Spätstadien stellt bis heute die Therapie der Wahl dar. Darüber hinaus ist jedoch auch die Lebensdauer der sodann häufig eingesetzten biologischen Klappenprothesen durch Degenerationsprozesse begrenzt. Die zugrundeliegende Pathophysiologie ist aufgrund weniger verfügbarer Modelle, die die komplexen Zusammenhänge hinreichend detailliert widerspiegeln können, bisher nur unvollständig verstanden. Als *ex-vivo*-Modellsystem wurde in dieser Arbeit ein voll automatisierter computergesteuerter Bioreaktor verwendet, dessen Eignung für die Simulation der Aortenklappenkalzifikation bereits in vorangegangenen Arbeiten anhand von histologischen und immunohistologischen Methoden belegt werden konnte. Dieser erlaubt, die Herzklappentaschen dynamischen Druckveränderungen und einem Scherstress auszusetzen. Zur Charakterisierung der *ex-vivo*-Aortenklappenkalzifizierung wurden ovine Aortenkonduits unter Zugabe prokalzifizierender Substanzen sowie unter Standardbedingungen im vollautomatisierten computergesteuerten Bioreaktor (BR) über einen Zeitraum von sieben Tagen kultiviert, wobei die Messdaten während des Versuches fortlaufend erfasst wurden. Analog dazu wurden ovine Aortenkonduits über sieben Tage statisch kultiviert sowie native Aortenkonduits gewonnen. Anschließend wurde die Expression etablierter Degenerationsmarker in den Klappentaschen per qPCR und Western-Blot untersucht. Die Klappentaschen zeigten eine Schrumpfung mit Dickenzunahme nach BR-Kultur. In der qPCR zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Osteopontin-Expression nach BR-Kultivierung. Bei der Untersuchung der Osteopontin-Expression im Western-Blot zeigten sich mehrere Banden, darunter eine Bande des C-terminalen Osteopontin-Fragments bei 15kDa, die in der prokalzifizierenden BR-Kultur signifikant höher exprimiert war als in der prokalzifizierenden statischen Bedingung. Dieser Unterschied konnte in den Standardbedingungen nicht beobachtet werden. Darüber hinaus wurden signifikant höhere Level des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  nach BR-Kultivierung gegenüber statisch kultivierten Segeln gemessen. In den im BR kultivierten Aortenklappen blieb die Alpha1-Typ1-Kollagen-Expression im Gegensatz zur statischen Bedingung weitgehend erhalten.

Die Kultivierung der Aortenklappenkonduits im BR bewirkt somit bereits nach sieben Tagen Veränderungen der Gen- und Proteinexpression, die für eine CAVD-typische Degeneration sprechen.

## Abstract

Calcific aortic valve disease (CAVD) is the most common acquired heart valve disease in developed countries. Early diagnosis in asymptomatic stages is difficult, aortic valve replacement in the late stage remains the therapy of choice. Moreover, the lifespan of frequently used biological valve prostheses is limited by degeneration processes. Due to a lack of models reflecting the complex interactions sufficiently, the underlying pathophysiology is still poorly understood.

In this study, an *ex vivo* model consisting of a fully automated computer-controlled bioreactor was used, which has already been established for the simulation of aortic valve calcification in previous studies focussing on histological and immunohistological findings. This model allows for the exposure of aortic valve leaflets to dynamic pressure changes and shear stress. In order to characterize the *ex vivo* aortic valve calcification on the gene and protein expression level, ovine aortic conduits were cultivated under procalcific and standard conditions for seven days in the fully automated and computer-controlled bioreactor, while cultivation parameters were continuously logged. Analogously, ovine aortic conduits were statically cultivated for seven days and native aortic conduits were harvested.

Afterwards, the expressions of established degeneration markers were analyzed by qPCR and western blot. The leaflets showed significant shrinking and increased optical density after bioreactor cultivation. In the qPCR analysis, a significant increase in osteopontin expression after BR-cultivation was shown. In the western blot analysis, multiple bands of osteopontin were detected. One band of c-terminal osteopontin at 15kDa showed a significantly increased expression in the procalcific BR-condition compared to the procalcific static condition. This difference could not be demonstrated under the corresponding standard conditions.

Moreover, the expression of hypoxia-inducible factor 1-alpha was significantly increased due to bioreactor cultivation. Contrary to statically cultivated aortic leaflets, the expression of collagen type 1 was not significantly altered after bioreactor cultivation. Collectively, the aortic valve leaflets showed changes in protein and gene expression levels indicative of CAVD-like degeneration after seven days of bioreactor cultivation.

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin
Abb.	Abbildung
AKE	Aortenklappenersatz
AKS	Aortenklappenstenose
ALP	Alkalische Phosphatase
BR	Bioreaktor
CAVD	Kalzifizierende Aortenklappenstenose
CC	Statische Kultivierung
cDNA	komplementäre DNS
Deg	Prokalzifizierende Kulturbedingung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EZM	Extrazellularmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
kDa	Kilo-Dalton
KÖF	Klappenöffnungsfläche
KOLL1A1	Alpha1-Typ1-Kollagen
LPA	Lipoprotein(a)
MMP	Matrix-Metallo-Protease
NEAA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
OPN	Osteopontin
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RIN	RNA-Integritätswert
RS	Rückwärtssequenz
Std	Standard-Kulturbedingung

Tab.	Tabelle
TAVI	<i>transcatheter aortic valve implantation</i>
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
VEC	Valvuläre Endothelzellen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIC	Valvuläre Interstitialzellen
VS	Vorwärtssequenz

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die Aortenklappenstenose .....	1
1.1.1 Struktur und Funktion der Aortenklappe.....	1
1.1.2 Epidemiologie, Verlauf und Diagnostik der Aortenklappenstenose .....	2
1.1.3 Therapie der Aortenklappenstenose .....	4
1.2 Stand der Ursachenforschung und Therapieansätze .....	6
1.3 Das Bioreaktor-Modell.....	9
1.4 Fragestellung der Arbeit .....	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Material .....	11
2.1.1 Präparation und Kultivierung.....	11
2.1.2 Histologische Färbungen .....	13
2.1.3 Gel-Elektrophorese und Western-Blot.....	14
2.1.4 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR .....	14
2.1.5 Statistische Auswertung und Darstellung .....	15
2.1.6 Lösungen .....	16
2.2 Methoden .....	17
2.2.1 Präparation der Aortenkonduits .....	17
2.2.2 Kultivierung im Bioreaktor unter physiologischen Bedingungen.....	18
2.2.3 Laufdatenanalyse.....	20
2.2.4 Ernte und Dokumentation .....	21
2.2.5 Statische Kultivierung.....	22
2.2.6 Gel-Elektrophorese und Western-Blot.....	22
2.2.7 qPCR .....	23
2.2.8 Histologische Färbungen .....	24
2.2.9 Statistische Auswertung.....	26
3. Ergebnisse.....	28
3.1 Analyse der BR-Läufe .....	28
3.2 Makroskopie .....	29
3.3 Histologie .....	33
3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	33
3.3.2 Movat-Pentachrom-Färbung .....	35
3.3.3 Alizarin-Färbung.....	37
3.4 Veränderungen der Genexpression .....	38
3.5 Veränderungen auf Proteinebene .....	41
4. Diskussion .....	44
4.1 Fragestellung und Erweiterung der Methodik.....	44
4.2 Beurteilung der Ergebnisse .....	45
4.2.1 Makroskopie, Mikroskopie und Genexpression.....	46

4.2.2 Pulsatiler Fluss und die Rolle von Osteopontin .....	49
4.3 Eignung und Limitationen der angewandten Methoden .....	50
4.4 Ausblick.....	51
5. Literatur .....	53
Danksagung .....	63

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Aortenklappenstenose

### 1.1.1 Struktur und Funktion der Aortenklappe

Die Aortenklappe (Valva aortae) wird neben der Pulmonalklappe zu den sogenannten Taschenklappen gezählt. Diese befinden sich zwischen dem Ventrikel und der sich jeweils anschließenden großen Arterie. Sie sind aus drei halbmondförmigen Taschen (Valvulae semilunares) aufgebaut, die der Gefäßwand anliegen und deren freie Ränder in das Gefäßlumen hineinragen. Am freien Rand weisen sie einen bindegewebigen Knoten (Nodus valvae semilunaris) und einen seitlichen Saum (Lunula valvarum semilunarium) auf, die einen dichten Klappenschluss sicherstellen. Sinkt der Ventrikeldruck nach der Systole unter den Druck der Ausflussbahn, füllen sich die Taschen wieder mit Blut, woraufhin sich ihre freien Ränder flächig aneinanderlegen und somit ähnlich einem Ventil den Rückstrom des Blutes verhindern [1].

Die Aortenklappe ist *in vivo* somit abwechselnd Dehnungs-, Scher- und Biegestressbelastungen ausgesetzt, die aufgrund ihrer anatomischen Lage stärker sind als an anderen Herzklappen [2].

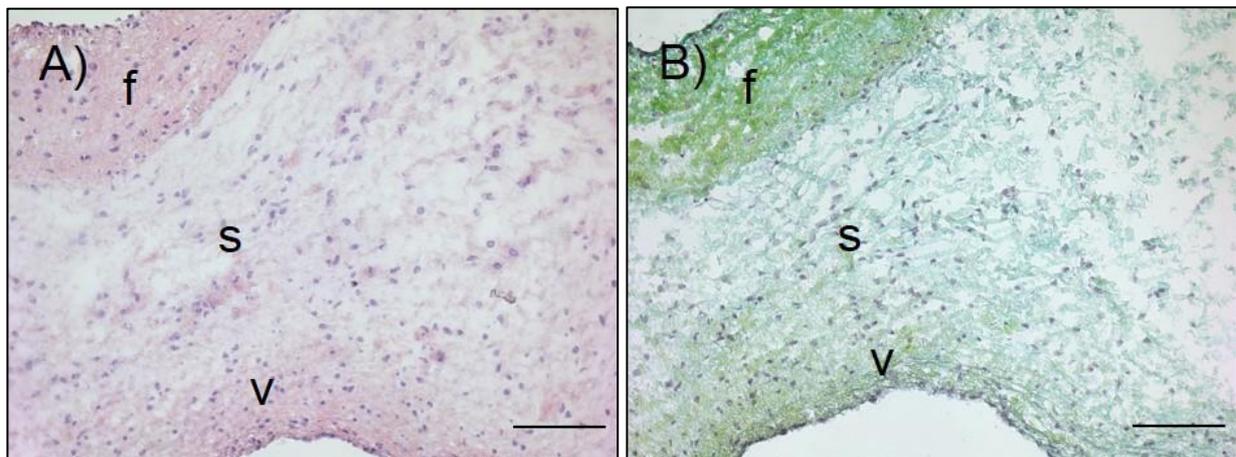
Aus histologischer Perspektive ist die Aortenklappe wie alle Herzklappen Teil des Endokards und ist bis auf ihre Basis gefäßfrei, sodass sie durch Diffusion aus dem umströmenden Blut mit Nährstoffen versorgt wird [3, 4].

Die Klappentaschen sind vollständig mit valvulären Endothelzellen (VEC) überzogen und bestehen grundsätzlich aus den drei Schichten Lamina fibrosa auf der Aortenseite, Lamina ventricularis auf der Ventrikelseite sowie der dazwischen liegenden Lamina spongiosa (Abb. 1) [4].

Die Schichten weisen allesamt valvuläre Interstitialzellen (VIC) auf, die unter anderem an der Bildung der Extrazellulärmatrix (EZM) beteiligt sind. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich in der Zusammensetzung der EZM [5, 6].

Die Lamina fibrosa besteht größtenteils aus einem dichten Fasernetzwerk des Strukturproteins Kollagen Typ 1, das entscheidend zur Stabilität der Klappentaschen beiträgt. Die Lamina ventricularis weist zahlreiche radiär angeordnete Elastinfasern auf, die wichtig für die Elastizität der Aortenklappe sind. Glatte Muskelzellen sind ebenfalls hauptsächlich in der Lamina ventricularis gelegen [7]. Die vor allem aus

Glykosaminoglykanen aufgebaute Lamina spongiosa bildet eine Verschiebeschicht zwischen den Laminae fibrosa und ventricularis [2, 5, 8].



**Abb. 1: Native ovine Aortenklappentasche in 20-facher Vergrößerung.** A) nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung B) nach Movat-Pentachrom-Färbung. Man erkennt die Dreischichtung: f=Fibrosa; s=Spongiosa; v=Ventricularis  
Maßstab = 100µm

### 1.1.2 Epidemiologie, Verlauf und Diagnostik der Aortenklappenstenose

In westlichen Industrienationen stellen Herz-Kreislaufkrankungen die führende Todesursache dar. Nach Zahlen des statistischen Bundesamts sind 35,3 Prozent aller Todesfälle im Jahr 2019 in Deutschland auf Herz-Kreislaufkrankungen zurückzuführen, darunter allein 10.875 auf nicht-rheumatische Aortenklappenerkrankungen [9, 10].

Angesichts des zunehmenden Durchschnittsalters der Bevölkerung sind die Prävention und Therapie dieser hauptsächlich im fortgeschrittenen Alter relevanten Krankheiten von immer größerer Bedeutung [11].

Hierbei ist die Aortenklappenstenose (AKS) mit einem Anteil von 43% der häufigste aller Herzklappenfehler in Europa und Nordamerika und betrifft insbesondere die ältere Bevölkerung. Es wird angenommen, dass in westlichen Industrienationen bei über 25% der Bevölkerung über 65 Jahren eine AKS oder ihre Vorstufen (Aortenklappensklerose) vorliegen [12]. Die kalzifizierende Aortenklappenstenose (CAVD) stellt ihre häufigste Ursache in westlichen Industrienationen dar [13].

Davon abzugrenzen als die zweithäufigste Ursache ist das rheumatische Fieber, das jedoch aufgrund konsequenter antibiotischer Therapie der zugrundeliegenden Streptokokken-Infektion in westlichen Industrienationen an Bedeutung verloren hat, sowie sehr

seltene angeborene Aortenklappenstenosen. Diese Formen der AKS betreffen in der Regel deutlich jüngere Patienten [13].

Neben angeborenen anatomischen Besonderheiten (bikuspide Aortenklappe) und hohem Lebensalter sind insbesondere die Zugehörigkeit zum männlichen Geschlecht, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie sowie Diabetes Mellitus und Adipositas als Risikofaktoren identifiziert worden und entsprechen somit weitgehend denen der Arteriosklerose [7, 14].

Bei der AKS kommt es zu einer Verdickung der Klappentaschen, die aufgrund kompensatorischer linksventrikulärer Hypertrophie zunächst keine Auswirkungen auf die Auswurfleistung des Herzens hat [15]. Unabhängig von der Ätiologie weisen symptomatische AKS in der Regel eine starke Kalzifizierung auf [16]. Mit fortschreitender Kalzifizierung nimmt die Beweglichkeit der Aortenklappentaschen ab und die Stenosierung nimmt zu, sodass ein ausreichender Blutfluss durch die Aortenklappe erschwert wird. Durch die kompensatorische Hypertrophie steigt der linksventrikuläre Sauerstoffbedarf. Kann dieser nicht mehr gedeckt werden, tritt eine subendokardiale Ischämie mit Linksherzversagen ein [17].

Die AKS ist meist geprägt durch einen langen asymptomatischen Verlauf mit abruptem Auftreten kardiovaskulärer Symptome bei relevanter Beeinträchtigung der Auswurfleistung. Klassisch ist hierbei die Symptom-Trias aus Dyspnoe, Synkopen bzw. Schwindel und Angina Pectoris [13, 17].

Als zentraler objektiver Progressionsmarker hat sich die Klappenöffnungsfläche (KÖF) im klinischen Alltag etabliert, die physiologisch zwischen 2 und 4cm<sup>2</sup> liegt und meist mittels Echokardiographie bestimmt wird. Dabei kommt es in der Regel erst bei einer hochgradigen AKS (KÖF <1,0cm<sup>2</sup>) mit relevanter Einschränkung der Auswurfleistung zu den oben genannten Symptomen [13, 18].

Darüber hinaus werden der Druckgradient sowie die Flussgeschwindigkeit an der Aortenklappe apparativ bestimmt. Anhand der Untersuchungsergebnisse kann die AKS vereinfacht in drei Schweregrade eingeteilt werden (Tab. 1) [13].

	Beginnende AKS	Mittelgradige AKS	Hochgradige AKS
KÖF (cm <sup>2</sup> )	> 1,5	1,0 - 1,5	< 1
KÖF/Körperoberfläche (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	> 0,85	0,6 - 0,85	< 0,6
Druckgradient (mmHg)	< 20	20 – 40	> 40
Maximale Flussgeschwindigkeit (m/s)	< 3,0	3,0 – 4,0	≥ 4,0

Tab. 1: Einteilung des AKS-Schweregrades [13]

### 1.1.3 Therapie der Aortenklappenstenose

Die Früherkennung der AKS gestaltet sich angesichts der langen Beschwerdefreiheit sowie weniger etablierter Screeningsmarker schwierig, sodass die meisten AKS erst in fortgeschrittenen Stadien erkannt werden. Da der Degenerationsprozess von Aortenklappen und seine Ursachen bisher nur unvollständig verstanden sind, steht aktuell keine spezifische medikamentöse Therapie zur Verfügung. Zur Überbrückung oder palliativ können gemäß der Leitlinie zur Herzinsuffizienz-Therapie bspw. Angiotensin-Rezeptor-Inhibitoren oder Betablocker eingesetzt werden. Die Progression der AKS kann durch eine medikamentöse Therapie jedoch nicht unterbrochen werden [18, 19].

Aktuell werden unter anderem Bisphosphonate [20, 21], Sildenafil [22] und Lipoprotein-A-Senker [23, 24] als potentielle medikamentöse Therapieansätze diskutiert, spielen im klinischen Alltag jedoch noch keine nennenswerte Rolle.

Der Aortenklappenersatz in den Spätstadien stellt daher bis heute die Therapie der Wahl dar [18]. Die Symptomlast des Patienten ist dabei entscheidend für die Wahl der Therapie, weil jene den wichtigsten Prognosemarker darstellt. Da asymptotische Patienten in Frühstadien hohe 10-Jahres-Überlebensraten aufweisen, stehen die Reduktion vermeidbarer Risikofaktoren und die Behandlung eventueller Komorbiditäten im Vordergrund. Es kann zunächst von einer invasiven Therapie abgesehen werden, da diese einem konservativen Vorgehen nicht überlegen ist [18, 25, 26].

Ältere Studien zeigen ein durchschnittliches Überleben von 2 bis 3 Jahren bei Patienten mit schwerer Symptomatik, die somit an einer hochgradigen AKS leiden und zeitnah einer invasiven Therapie bedürfen [18, 27].

Darüber hinaus ist bei einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von unter 50%, einem mittleren Druckgradienten von >40mmHg oder bei Auftreten typischer AKS-Symptome unter Belastung bei einer KÖF von <1cm eine invasive Therapie indiziert [18].

Hierbei kommen entweder der chirurgische Aortenklappenersatz (AKE) oder der katheterbasierte Aortenklappenersatz (englisch *transcatheter aortic valve implantation*, TAVI) zum Einsatz. Im Vorfeld kann bei hämodynamisch instabilen oder symptomatischen Patienten mit hochgradiger AKS eine Ballondilatation zur Überbrückung erfolgen [18, 28].

Beim AKE wird zwischen mechanischen Herzklappenprothesen sowie biologischen Klappenprothesen xenogenen Ursprungs unterschieden. Bei jüngeren Patienten werden aufgrund der längeren Haltbarkeit in der Regel mechanische Klappenprothesen eingesetzt. Hierbei muss jedoch aufgrund der Thrombogenität eine lebenslange Antikoagulation erfolgen.

Biologische Klappenprothesen bieten den entscheidenden Vorteil, dass keine dauerhafte Antikoagulation nötig ist, sodass sie für Patienten ab dem 70. Lebensjahr oder mit erhöhtem Blutungsrisiko empfohlen werden [18, 29]. Die Lebensdauer der biologischen Klappenprothesen ist jedoch wiederum durch Degenerationsprozesse begrenzt, sodass insbesondere bei jüngeren Patienten Folgeeingriffe nötig werden können [30]. In aktuellen Studien zeigt sich eine hohe Einjahresüberlebensrate nach katheterbasierten *Valve-in-Valve*-Implantationen bei degenerierten Bioprothesen, wodurch jene derzeit als Alternative zur konventionellen Reoperation diskutiert werden [31, 32].

Beim chirurgischen AKE wird die mediane Sternotomie, eine partielle obere Sternotomie oder auch ein gänzlich sternotomiefreier Zugang wie bspw. die rechtsseitige anterolaterale Mini-Thorakotomie gewählt. Nachdem der Patient an eine Herz-Lungen-Maschine angeschlossen wurde, wird durch eine kaliumreiche Kardioplegie-Lösung ein Herzstillstand herbeigeführt. Nach vollständiger Entfernung der stenosierten Aortenklappe wird die Klappenprothese implantiert [33]. Laut Deutscher Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie ist der Herzklappenersatz mit 36.650 Eingriffen im Jahr 2019 nach Koronararterienbypass-Operationen der am zweithäufigsten durchgeführte kardiovaskuläre Eingriff in Deutschland [34].

Bei älteren Patienten mit hohem und mittlerem Operationsrisiko wird heute vermehrt die TAVI eingesetzt [18]. Dabei wird meist transfemorale ein Katheter eingeführt, über den die Klappenprothese in die stenosierte native Aortenklappe eingebracht und entfaltet wird [7].

Angesichts geringer Komplikations- und guter Überlebensraten in ersten Studien zum TAVI-Verfahren erscheint eine Ausweitung der Indikation auf Patienten mit einem geringeren Operationsrisiko in naher Zukunft denkbar. Aufgrund der unzureichenden Evidenzlage zur Haltbarkeit und eingeschränkter Vergleichbarkeit verschiedener TAVI-Modelle wird jedoch bei jüngeren Patienten derzeit weiterhin der chirurgische AKE empfohlen [18, 35, 36].

Einen Sonderfall stellt der AKE bei Kindern dar, der meist bei angeborenen Aortenklappenstenosen nötig wird. Hierbei kann die nach ihrem Entwickler Donald Nixon Ross benannte *Ross procedure* zum Einsatz kommen, in der die Aortenklappe entfernt und durch die eigene Pulmonalklappe (sogenanntes Autograft) ersetzt wird. Anstelle der Pulmonalklappe wird eine allogene Spender-Pulmonalklappe transplantiert [37]. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen darin, dass die so implantierten Klappen im Laufe des Lebens mitwachsen können und keine dauerhafte Antikoagulation notwendig ist [38].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der chirurgische Aortenklappenersatz die derzeitige Standardtherapie darstellt. Aufgrund der oben genannten Limitationen dieses Verfahrens bedarf es einer besseren Früherkennung und bestenfalls einer medikamentösen Therapie der Frühstadien, wozu ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Krankheitsentstehung beitragen kann.

## 1.2 Stand der Ursachenforschung und Therapieansätze

Lange Zeit wurde die Ursache der AKS in Alterungsprozessen sowie passiver Kalziumablagerung gesehen und die Krankheit wurde weitgehend mit der Arteriosklerose gleichgesetzt. Heute ist jedoch bekannt, dass es sich vielmehr um einen aktiven, multifaktoriellen Prozess handelt, an dem Lipoprotein-Ablagerungen, chronische Entzündungsgeschehen, osteogene VIC-Differenzierung und die aktive Kalzifizierung der Klappentaschen mitwirken [15, 39].

Es konnte gezeigt werden, dass Kalzifizierung und Fibrose in der Lamina fibrosa beginnen und hier am deutlichsten ausgeprägt sind. Es wird davon ausgegangen, dass es infolge der starken mechanischen Beanspruchung zu Endothelschäden an der Fibrosa kommt. Diese Hypothese stützt auch die Beobachtung, dass Patienten mit biskupider Aortenklappe, deren Klappentaschen somit unphysiologischer mechanischer Belastung ausgesetzt sind, deutlich früher eine AKS entwickeln, histologisch jedoch bereits eine vergleichbare Kalzifizierung aufweisen [40].

Infolgedessen kommt es hier zur Verlängerung der Glykosaminoglykan-Ketten und plaqueartigen Lipoproteinablagerungen, insbesondere von Lipoprotein(a) (LPA) [7, 41]. Auf die Ablagerung folgt eine Lipidoxidation, durch die eine Entzündungsreaktion mit Makrophagen-Infiltration des Gewebes in Gang gesetzt wird. Dies führt wiederum zu einer Zunahme von oxidativem Stress vor Ort [42]. Gleichzeitig aktiviert LPA die VICs und fördert die Expression wichtiger Gene der Osteogenese, sodass es zu einer aktiven Kalzifizierung kommt [43].

Durch Untersuchungen an explantierten stenosierten Aortenklappen sowie Versuche *in vitro* konnten zahlreiche potenzielle Biomarker verschiedener AKS-Komponenten identifiziert werden. Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) trägt entscheidend zur Verlängerung der Glykosaminoglykan-Ketten bei und erleichtert somit die Ablagerung von Lipoproteinen. In stenosierten Aortenklappen konnte immunhistochemisch eine erhöhte TGF $\beta$ -Expression nachgewiesen werden [44].

In klinischen Studien wurden hohe LPA-Plasmaspiegel als Risikofaktor für die AKS-Entstehung identifiziert [45–47]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Mutation des LPA-Gens zu erhöhten LPA-Spiegeln führen kann und somit auch genetische Faktoren das AKS-Risiko beeinflussen [48]. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wird derzeit zu LPA-senkenden Substanzen als vielversprechende Therapieansätze geforscht [23, 24].

Zu den wichtigsten Regulatoren der Osteogenese gehören Osteopontin (OPN) und die Alkalische Phosphatase (ALP). Die nach Abschluss der Aortenklappen-Reifung inaktiven VICs werden durch pathologische Stimuli erneut aktiviert und transformieren sich zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen mit pathologisch erhöhter Genexpression von u.a. OPN und ALP, sodass es zu einer Kalzifizierung der EZM kommt. An erkrankten humanen Aortenklappen konnte gezeigt werden, dass sowohl OPN als auch ALP vermehrt exprimiert werden. So wurden eine erhöhte OPN-Genexpression und eine erhöhte ALP-Proteinexpression in stenosierten Aortenklappen gemessen [39]. In Versuchen *in vitro* konnte eine ALP-abhängige Kalzifizierung humaner VICs induziert werden [49].

Darüber hinaus zeigten Untersuchungen an gesunden porcinen Aortenklappen, dass am Endothel über der Lamina fibrosa eine deutlich geringere Expression anti-osteogener Gene wie Osteoprogenin stattfindet [50].

Die Annahme, dass die aktive Kalzifizierung eine wichtige Rolle bei der AKS spielt, stützen auch Studien, die eine deutlich frühere AKS-Entstehung infolge einer Calcium-Stoffwechselstörung wie Morbus Paget oder einer Störung des Vitamin-D3-Haushalts demonstrierten [51, 52].

Bisher ist die Bedeutung der Neovaskularisation für die AKS nur unzureichend verstanden, jedoch wird angenommen, dass hämatogen Entzündungs- und Osteoprogenitor-Zellen angeschwemmt werden, die die Degenerationsprozesse aufrechterhalten [7]. Es handelt sich hierbei um einen pathologischen Vorgang, da die Aortenklappe physiologisch gefäßfrei ist. Kommt es im Rahmen der AKS zu einer Klappentaschen-Verdickung, reicht die Diffusion vermutlich nicht mehr zur Versorgung des Klappengewebes. In der Folge kommt es zu lokaler Hypoxie mit Stabilisierung des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), die wiederum die Genexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) steigert [53, 54]. Immunhistochemische Untersuchungen an explantierten stenosierten Aortenklappen zeigten, dass HIF-1 $\alpha$  und VEGF hauptsächlich dort exprimiert werden, wo vermehrt Kalzifikation stattfindet [53, 55]. Diese Befunde decken sich mit Studien, die eine erhöhte VEGF-Expression bei explantierten stenosierten Aortenklappen vorfanden [54].

Alpha1-Typ1-Kollagen, ein wichtiges Strukturprotein und Teil der EZM, ist ebenfalls in explantierten Aortenklappen untersucht worden. Es zeigte sich histologisch ein *Remodelling* der EZM-Zusammensetzung mit deutlichen Unterschieden zwischen stenosierten und gesunden Aortenklappen. So weist die Lamina fibrosa von erkrankten Klappen deutlich kürzere Kollagenfasern in der Movat-Pentachrom-Färbung auf, dafür kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Kollagenfaserdichte und -anzahl in der Spongiosa. Es kam nicht zu einer signifikanten Änderung des Gesamtgehalts an Kollagen in den untersuchten Aortenklappen [56].

*$\alpha$ -smooth-muscle-actin* ( $\alpha$ -SMA) ist ein wichtiger Biomarker für Differenzierung der VEC zu mesenchymalen Zellen.  $\alpha$ -SMA ist an der embryologischen Reifung der Aortenklappe beteiligt, es konnte jedoch auch eine Aktivität in adulten humanen Aortenklappen gezeigt werden [57].

Wird die Aortenklappe, etwa im Rahmen der AKS, pathologischen Strömungsbedingungen oder Dehnungsstress ausgesetzt, zeigt sich zudem eine tendenziell verstärkte  $\alpha$ -SMA-Expression infolge einer VIC-Aktivierung [58].

Die Entstehung der AKS ist bisher nur unvollständig verstanden, die hier vorgestellten Biomarker stellen jedoch potenzielle Angriffspunkte für medikamentöse Therapiestrategien dar. Insbesondere der Einfluss von pathologischen Strömungsbedingungen, zyklischen Druckveränderungen sowie von Dehnungs-, Biegungs- und Scherstress auf die Pathogenese bleibt angesichts weniger geeigneter Modelle weitgehend unerforscht [8].

## 1.3 Das Bioreaktor-Modell

Die AKS wurde in zahlreichen Studien *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* untersucht.

Versuche *in vitro* sind meist vergleichsweise kostengünstig und zügig durchführbar, da keine aufwändige Aufzucht der Versuchstiere erfolgen muss. Darüber hinaus erlauben sie gezielte Eingriffe in mehrere Variablen des Versuchs. Aus diesem Grund ermöglichen sie eine höhere Probenanzahl und stellen eine gute Grundlage für weitere Studien dar.

Jedoch sind sie mit dem Risiko behaftet, wichtige Aspekte der untersuchten Krankheit nicht oder nur unzureichend abzubilden, sodass die Erkenntnisse nicht unmittelbar auf den menschlichen Organismus angewandt werden können [59].

Für *in-vivo*-Versuche müssen zunächst geeignete Versuchstiere identifiziert werden. Schweineherzen kommen dem menschlichen Herzen sowohl anatomisch als auch physiologisch sehr nahe, Schafe stellen ebenfalls geeignete und beliebte Modelltiere für die AKS dar [60]. *In-vivo*-Studien bieten den entscheidenden Vorteil, dass die AKS in ihrer ganzen Komplexität inklusive wichtiger Komorbiditäten abgebildet werden kann. Insbesondere Großtiermodelle sind jedoch sehr kostenintensiv und zeitaufwändig, sodass häufig nur geringe Probenzahlen generiert werden können.

Darüber hinaus werden Mäuse häufig als Versuchstiere genutzt, da sie relativ kostengünstig und schnell aufgezogen werden können und deutlich weniger Platz benötigen. Sie entwickeln von sich aus aber keine AKS, sodass diese bspw. durch genetische Modifikationen oder spezielle Ernährung induziert werden muss. Außerdem weisen Mäuse-Aortenklappen im Gegensatz zu humanen Aortenklappen histologisch keine Dreischichtung auf, sodass es zu irreführenden Ergebnissen kommen kann [61]. Für *in-vivo*-Versuche werden besondere Qualifikationen der Untersucher und angemessene Einrichtungen zur Tierhaltung benötigt. Zudem ist in der Regel die Zustimmung einer Ethikkommission notwendig. Auch die Anwendbarkeit der in Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen ist angesichts anatomischer und physiologischer Unterschiede der untersuchten Spezies eingeschränkt [59].

*Ex-vivo*-Studien stellen einen Mittelweg dar, der Vorteile von Versuchen *in vitro* und *in vivo* vereint. Die dazu benötigten Proben sind besser verfügbar, da eine langjährige Aufzucht und Haltung entfallen. Darüber hinaus ermöglichen *ex-vivo*-Studien eine leichtere Kontrolle mehrerer Versuchsparameter, da bspw. keine Anästhesie der Tiere notwendig ist. So kann etwa durch das in dieser Arbeit verwendete Bioreaktor-Modell

der Einfluss dynamischer Druckveränderungen auf die Krankheitsentstehung erforscht werden.

In bisherigen Studien wurden Bioreaktor-Modelle hauptsächlich im Bereich des *Tissue Engineering* zur Untersuchung von biologischen Klappenprothesen genutzt, sodass die meiste Literatur die Klappenprothesen-Entwicklung bzw. Testung behandelt [8].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *ex-vivo*-Versuche zahlreiche Vorteile gegenüber Versuchen *in vitro* und *in vivo* aufweisen, sie bisher jedoch eher selten Verwendung in der AKS-Forschung gefunden haben.

Das in dieser Arbeit verwendete Bioreaktor-Modell wurde zunächst durch Dr. Stefanie Aubin (geb. Hoffmann) für die Dezellularisierung und Re-Endothelialisierung oviner Pulmonalklappen etabliert [62]. Anschließend wurde es durch Dr. Sabine Feichtner modifiziert und zur Untersuchung der Kalzifizierung oviner Aortenklappen etabliert [63]. Dabei wurden die Kulturbedingungen so gewählt, dass sie die *in-vivo*-Flussbedingungen bestmöglich nachbilden und es konnte durch prokalzifizierende Medien eine Kalzifizierung induziert werden.

## 1.4 Fragestellung der Arbeit

Nach der Etablierung dieses Bioreaktor-Modells zur Untersuchung der Kalzifizierung oviner Aortenklappen durch Dr. Sabine Feichtner [63] soll es in dieser Dissertationsarbeit um die Charakterisierung der Degenerations- bzw. Kalzifizierungsprozesse an ovinen Aortenklappen gehen. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf Veränderungen der Gen- und Proteinexpression etablierter Biomarker der AKS sowie der feingeweblichen Untersuchung der im Bioreaktor kultivierten Aortenklappentaschen. Insbesondere der Einfluss dynamischer Druckveränderungen durch pulsatilen Fluss soll untersucht werden. Dazu werden die über sieben Tage im Bioreaktor kultivierten Proben mit ebenfalls über sieben Tage statisch kultivierten und nativen, unmittelbar nach der Präparation tiefgefrorenen Aortenklappentaschen verglichen.

Die Untersuchung dieser Vorgänge ist von besonderem Interesse, da entsprechende Erkenntnisse zur Identifikation potenzieller Zielstrukturen für neue Therapieansätze dienen könnten. Darüber hinaus könnte der Bioreaktor als Modell zur Testung von Medikamenten, aber auch zur Erforschung der Rolle bekannter Risikofaktoren wie etwa dem arteriellen Hypertonus genutzt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Präparation und Kultivierung

**Tab. 2: Geräte und Utensilien für die Präparation, Kultivierung und Ernte**

Geräte, Utensilien	Bezugsquelle
Autoklav	Systec GmbH, Linden (DE)
Deckel GL45 mit Dichtring	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main (DE)
Digitalkamera Power Shot SX20IS	Canon Inc., Tokyo (JP)
Durchlichtunterlage Slimlite LED	Kaiser Fototechnik GmbH & Co. KG, Buchen (DE)
Glas-Bioreaktorkammer	freundliche Leihgabe von Prof. Dr. A. Lichtenberg
Glas-Oxygenierungskammer	freundliche Leihgabe von Prof. Dr. A. Lichtenberg
Inkubator HERAcCell 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Konnektor 1/2 x 3/8	CORMED Medizintechnik GmbH & Co. KG, Rülten (DE)
Konnektor 1/2 x 3/8 mit Öffnung	CORMED Medizintechnik GmbH & Co. KG, Rülten (DE)
MPX 320-39 (Stecksystem)	Applied Critical Fluids GmbH, Mannheim (DE)
O <sub>2</sub> -Sonde Visiform DO 120	Hamilton, Nevada, (USA)
O-Ring 15,5 x 3mm	Arcus GmbH, Seevetal (DE)
pH-Sonde Easyform Plus VP 120	Hamilton, Nevada, (USA)
Rollerpumpe	Stöckert Instrumente GmbH, München (DE)
Schlauch 0,5 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Schlauch 12 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Schlauch 12,7 mm (1/2 Zoll)	Reichert Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg (DE)
Schlauch 4 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Schlauch 9,5 mm (3/8 Zoll)	Reichert Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg (DE)
Schlauchschnellen Größe 9-14, 12-17, 17-22	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Sterilbank Herasafe	Thermo Electron Corporation, Karlsruhe (DE)
Steuerungs-PC inklusive Software	Engineo GmbH, Kelkheim (DE)
Temperatursonde	Engineo GmbH, Kelkheim (DE)

Verschlussdeckel mit Fräsung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Wasserbad GFL 1092	Gesellschaft Für Labortechnik MbH, Burgwedel (DE)
Y-Konnektor 3/8 x 3/8 x 1/2 Zoll	CORMED Medizintechnik GmbH & Co. KG, Rüthen (DE)

**Tab. 3: Chemikalien, Medien und Zusätze für die Präparation und Kultivierung**

Chemikalien, Medien, Zusätze	Bezugsquelle
Amphotericin B	Gilead Sciences, Inc., Foster City (USA)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 4,5g Glucose/L 500ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Incidin Liquid	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein (DE)
Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	BioFroxx GmbH, Einhausen (DE)
β-Glycerinphosphat Dinatriumsalz Pentahydrat (β-GP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)

**Tab. 4: Verbrauchsmaterialien für Präparation und statische und Bioreaktor-Kultivierung**

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Cellstar Tubes 50ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (AU)
Druckluft	Air liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf (DE)
Filter Midisart 2000	Sartorius AG, Göttingen (DE)
Flüssiger Stickstoff	Air liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf (DE)
Kohlenstoffdioxid	Air liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf (DE)
Nahtmaterial Prolene 4-0, monofil	Ethicon Inc., Bridgewater (USA)
Petrischalen 92x16mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (DE)
Pumpenschlauch 12,7 mm (1/2 Zoll)	Raumedic AG, Helmbrechts (DE)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Schafsherzen	Schlachthof Laame GmbH, Wuppertal (DE)
Skalpell	Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka (JPN)
Spannband groß 4,8 x 361mm	Thomas & Betts Corporation, Memphis (USA)
Spannband klein 2,5 x 100mm	J.W. Zander GmbH & Co. KG, Freiburg (DE)
Steriles Tuch Raucodrape	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied (DE)
Verschlusskonus Combi-Stopper	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (DE)

## 2.1.2 Histologische Färbungen

**Tab. 5: Laborgeräte für die Färbungen**

Laborgerät	Bezugsquelle
Kryostat Leica CM 1950	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar (DE)
Systemmikroskop Leica DM 2000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar (DE)

**Tab. 6: Chemikalien und Zusätze für die Färbungen**

Chemikalien, Zusätze	Bezugsquelle
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Alcianblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Alizarin Rot S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ammoniumhydroxid 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Brilliant Crocein R	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster (DE)
Cryocompound	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Eindeckmedium Roti Histokitt II	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Eosin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethanol 50, 70%, 96%, 100%	Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf (DE)
Formaldehydlösung 37%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Formaldehydlösung 4% ROTI Histofix	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Isopentan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Jod	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Kaliumjodid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Phosphorwolframsäure-Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Pikrinsäure	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Safran du Gâtinais	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster (DE)

Salzsäure (HCl) 32-37%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Säurefuchsin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)

**Tab. 7: Verbrauchsmaterialien für die Färbungen**

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Cryomold	Weckert Labortechnik, Kitzingen (DE)
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Eder-münde (DE)
Faltenfilter	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren (DE)
Objektträger 76x26x1mm	Paul Marienfeld & Co KG, Lauda Königshofen (DE)

## 2.1.3 Gel-Elektrophorese und Western-Blot

**Tab. 8: Materialien für Gel-Elektrophorese und Western-Blot**

Materialien	Bezugsquelle
Amersham Imager 600	General Electric Holding GmbH, Frankfurt am Main (DE)
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum	Advansta Inc., San Jose (USA)
Filterpapier	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Gelkassetten inkl. Kämmen	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Nitrozellulose-Transfer-Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (DE)

**Tab. 9: Primär-Antikörper**

Bezeichnung	Produktnummer, Hersteller/Vertrieb
Alpha-Tubulin (Ladekontrolle)	T6199, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Monoclonal Anti-Actin, a Smooth Muscle	A 5228, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Osteopontin	GTX37582, Biozol, Eching (DE)

**Tab. 10: Sekundär-Antikörper**

Bezeichnung	Produktnummer, Hersteller
AffiniPure Goat anti-mouse IgG + IgM (H+L)	AB_2338451, Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire (UK)
Goat IgG anti-Rabbit IgG (H+L)-HRPO, MinX none	111-035-003, Dianova, Hamburg (DE)

## 2.1.4 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR

**Tab. 11: Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Zusätze für RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR**

Material	Bezugsquelle
Carboxy-X-Rhodamin Referenzfarbstoff	Promega Corporation, Madison (USA)

GoTaq qPCR Master Mix	Promega Corporation, Madison (USA)
HPLC-grade Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Nuklease-freies Wasser	Promega Corporation, Madison (USA)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden (DE)
RNAse Away	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden (DE)
RNAse-freie Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf (DE)
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden (DE)
Trizol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)

**Tab. 12: Geräte für RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR**

Laborgerät	Bezugsquelle
StepOnePlus Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tecan Infinite M1000 Pro	Tecan Group AG, Männedorf (CH)
Thermocycler T3000	Biometra GmbH, Göttingen (DE)
Waage	Sartorius AG, Göttingen (DE)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg (DE)

**Tab. 13: Primersequenzen**

Zielgen	Primersequenz
Ribosomales Protein L29 (RPL29)	VS: CCAAGTCCAAGAACCACACC RS: TATCGTTGTGATCGGGGTTT
Osteopontin (OPN)	VS: GATGGCCGAGGTGATAGTGT RS: TCGTCTTCTTAGGTGCGTCA
Alpha1-Typ1-Kollagen (KOLL1A1)	VS: AAGACATCCCACCAGTCACC RS: TAAGTTCGTCGCAGATCACG
Hypoxie-induzierter Faktor 1- $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )	VS: GAAGCAAAGAATCCATTTTCCA RS: TGGTGACAACACTGATCGAAGG
Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF $\beta$ )	VS: GAGCCAGAGGCGGACTACTA RS: TCGGACGTGTTGAAGAACAT
Alkalische Phosphatase (ALP)	VS: GACATCGCCTACCAGCTCAT RS: CACATCGGTTCTGTTCTTGG
Vascular Endothelial Growth factor (VEGF)	VS: CGGATCAAACCTCACCAAAG RS: AAATGCTTTCTCCGCTCTGA

## 2.1.5 Statistische Auswertung und Darstellung

**Tab. 14: Software**

Programm	Entwickler
ImageJ Version 1.51	Wayne Rasband
ImageQuant Version 6	GE Healthcare GmbH, München (DE)
Microsoft Office 2016	Microsoft Deutschland GmbH, Köln (DE)
Prism Version 9	GraphPad Software, San Diego (USA)
StepOne Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

## 2.1.6 Lösungen

**Tab. 15: Lösungen**

Lösung	Zusammensetzung
10x SDS-Running-Buffer 1L	30,285g TrizmaBase werden mit 142,633g Glycin in destilliertem Wasser gelöst, bis ein Volumen von 1L erreicht ist. Zur Verwendung wird die Lösung im Verhältnis 1:10 verdünnt und es werden 10ml 10%-ige SDS-Lösung zugegeben.
10x TBS	Es werden ca. 24,228g TrizmaBase mit 87,66g Natriumchlorid vermischt und anschließend bis zu einem pH von 7,6 mit Salzsäure aufgefüllt.
10x TBST	Es werden ca. 24,228g TrizmaBase mit 87,66g Natriumchlorid und 10ml 1% Tween20 vermischt und anschließend bis zu einem pH von 7,6 mit Salzsäure aufgefüllt.
Alcianblau-Lösung 1%, 200ml	2g Alcianblau werden in 200ml destilliertem Wasser gelöst.
Alkalischer Alkohol, 400ml	360ml Ethanol (96%) werden mit 40ml Ammoniumhydroxid (30%) vermischt
Alkoholischer Safran, 200ml	12g Safran du Gâtinais werden mit 200ml Ethanol (100%) vermischt
Alkoholisches Hämatoxylin (2%), 500ml	10g Hämatoxylin werden in 500ml 96%-iger Ethanol gelöst
APS 10%	1g Ammonium Persulfat (APS) werden in 10ml destilliertem Wasser verdünnt
Bouin-Lösung, 420ml	300ml Pikrinsäure werden mit 100ml Formaldehyd (37-40%) und 20ml Essigsäure (100%) versetzt
Brilliant Crocein R Stock, 400ml	4g Brilliant Crocein R werden in 398ml destilliertem Wasser gelöst
Crocein-Säurefuchsin, 100ml	80ml Brilliant Crocein R Stock werden mit 20ml Säurefuchsin Stock vermischt
Eisenchlorid-Lösung, 500ml	12,4g Eisen-Chlorid-Hexahydrat und 5ml Salzsäure (32-37%) werden in 500ml destilliertem Wasser gelöst
Eosin-Lösung, 200ml	1g Eosin wird mit 200µl Eisessig, 100ml destilliertem Wasser und 100ml Ethanol (100%) vermischt und über einen Faltenfilter filtriert

Essigsäure-Lösung 5%	10g Eisessig werden mit 190ml destilliertem Wasser verdünnt
Jodlösung, 500ml	10g Jod und 20g Kaliumjodid werden in 500ml destilliertem Wasser gelöst
Laemmli-Puffer, 10ml	Zu 3,75ml Tris/HCl 1M pH 6,8 werden 6ml Glycerin, 1,26g SDS-Pellets, ca. 0,93g DTT und ca. 0,009g Bromphenolblau gegeben und das Gemisch mit destilliertem Wasser auf 10ml aufgefüllt.
Natriumkarbonat-Formaldehydlösung, 200ml	50ml Formaldehyd (32-37%) und 10g Natriumcarbonat werden in 150ml destilliertem Wasser gelöst
Natriumthiosulfat 5%	10g Natriumthiosulfat werden in 200ml destilliertem Wasser gelöst
Phosphorwolframsäure, 5 %	25 g Phosphorwolframsäure werden mit 500ml destilliertem Wasser versetzt
Säurefuchsin Stock, 500ml	0,5g Säurefuchsin werden mit 497,5ml destilliertem Wasser und 2,5ml Essigsäure (100%) vermischt und anschließend gefiltert.
SDS 10%	10g SDS-Pellets werden bis zu einem Endvolumen von ca. 100ml in destilliertem Wasser aufgelöst
Transfer-Buffer 1L	200ml Methanol und 100ml 10x Running Buffer ohne SDS werden in 700ml destilliertem Wasser gelöst.
Tris/HCl 0,5M pH 6,8	Es werden 9,0855g TrizmaBase in ca. 100ml destilliertem Wasser aufgelöst und mit 37%-iger Salzsäure auf pH 6,8 eingestellt
Tris/HCl 1,5M pH 8,8	Es werden ca. 45,4275g TrizmaBase in ca. 200ml destilliertem Wasser aufgelöst und mit 37%-iger Salzsäure auf pH 8,8 eingestellt.
Weigert's Eisenhämatoxylin, 120ml	60ml Alkoholisches Hämatoxylin (2%) werden in 40ml Eisenchlorid-Lösung und 20ml Jodlösung gelöst

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Präparation der Aortenkonduits

Als Forschungsobjekt dieser Dissertation dienen unmittelbar nach der Schlachtung präparierte ovine Aortenwurzeln, im folgenden Aortenkonduits genannt, die von der Schlachthof Laame GmbH in Wuppertal erworben werden. Ganze Schafsherzen werden dazu tiefgekühlt in das Institut transportiert und dort unmittelbar unter sterilen Bedingungen präpariert. Dabei wird das Myokard bis auf einen schmalen Ring zum

Einnähen entfernt. Der tubuläre Anteil der Aorta ascendens wird auf wenige Zentimeter gekürzt. Die Abgänge der Koronararterien werden hierbei für möglichst physiologische Flussbedingungen erhalten.

Das so gewonnene Aortenkonduit wird vor dem Einnähen in einem gefüllten 50ml-Falcon gewaschen und gekühlt. Das Lagerungsmedium besteht hierbei aus PBS, dem Penicillin und Streptomycin (Endkonzentration Penicillin 200 U/ml; Streptomycin 200 µg/ml) sowie Amphotericin B (Endkonzentration 5 µg/ml) zugesetzt werden.

## 2.2.2 Kultivierung im Bioreaktor unter physiologischen Bedingungen

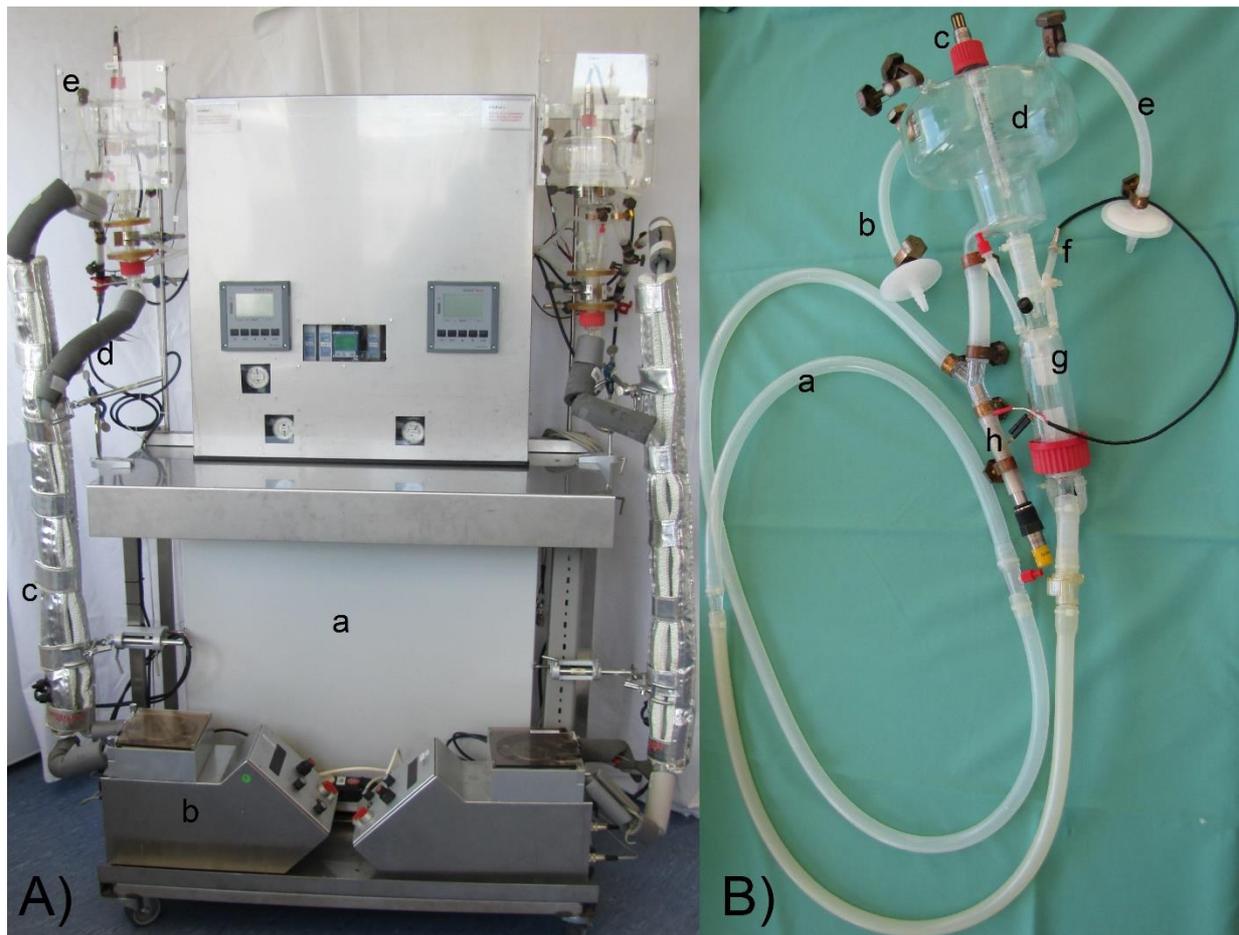
Das in dieser Arbeit verwendete Bioreaktor-Modell besteht einerseits aus einem Computer mit spezialisierter Steuerungssoftware und andererseits aus der eigentlichen Bioreaktoreinheit.

Die Bioreaktoreinheit verfügt über zwei Kammern, die sich jeweils links und rechts am Bioreaktor befinden (s. Abb. 2A). Hierdurch ist eine gleichzeitige Kultivierung zweier Aortenklappenkonduits möglich.

In der sogenannten Oxygenierungskammer, einer gläsernen Komponente des Bioreaktorsystems, dienen die zwei seitlich angebrachten Schläuche als Zu- und Abluftwege. Hierdurch wird ein ausreichender Druck im Kammersystem aufrechterhalten. Über eine oben gelegene Öffnung wird die pH-Sonde eingebracht.

Eine weitere gläserne Komponente stellt die Kultivierungskammer dar. Diese ist über ein Schlauchstück mit der Oxygenierungskammer verbunden und besteht aus einem oberen und einem unteren Teil. Hier wird das Aortenkonduit eingenäht und über sieben Tage kultiviert. Darüber hinaus wird die Temperatursonde über eine seitliche Olive der Kultivierungskammer eingebracht.

Die Lokalisation der weiteren Sonden im Bioreaktorsystem ist Abb. 2B zu entnehmen.



**Abb. 2: A) Gesamte Bioreaktoreinheit mit zwei Kammern;** a: Schaltkasten, b: Rollerpumpe, c: Heizmanschette, d: Isolierung, e: Schutzhaube

**B) Aufbau des Kammersystems;** a: Schlauchabschnitt zum Einsatz in die Rollerpumpe, b: Zuluftschlauch, c: pH-Sonde, d: Oxygenierungskammer, e: Abluftschlauch, f: Temperatursonde, g: Kultivierungskammer, h: O<sub>2</sub>-Sonde

Sämtliche Verbindungsstücke werden über Schlauchschellen und Spannbänder gesichert. Eine Rollerpumpe erzeugt einen pulsatilen Fluss des Kulturmediums im Bioreaktorsystem. Über eine das Schlauchsystem umhüllende Heizmanschette wird das Kulturmedium erwärmt, während Isolierungen einem Wärmeverlust entgegenwirken.

Mittels der Steuerungssoftware lassen sich die Sollwerte für die Versuchsbedingungen adjustieren. So können die Pumpendrehzahl, der Druck in der Oxygenierungskammer, der pH-Wert im System sowie die Temperatur im System eingestellt werden. Die tatsächlichen Werte werden über mehrere Sonden kontinuierlich aufgezeichnet und automatisch angepasst. Darüber hinaus wird der pO<sub>2</sub>-Wert im Medium erfasst. Die einzelnen Sollwerte sind in Tab. 16 aufgeführt. Vor jedem Versuchslauf wird das Kammersystem autoklaviert, um einer Kontamination vorzubeugen.

Eine detaillierte Beschreibung des Bioreaktor-Modells ist der Dissertationsarbeit von Dr. Sabine Feichtner zu entnehmen [63].

Die Präparation des Aortenkonduits erfolgt unter der Sterilbank. Das Aortenkonduit wird gegebenenfalls gekürzt, bis es gut zwischen die beiden Schlauchstücke der Kultivierungskammer passt. Das Konduit wird zuerst an der Basis (am Myokard) mit drei Kardinalnähten im Bereich der Kommissuren zwischen zwei Klappentaschen am unteren Schlauchstück festgenäht.

Die Konduitspitze wird analog zu den Nähten an den Kommissuren am oberen Schlauchstück fixiert. Hierbei wird jedoch zuerst durch das Konduit und dann durch das Schlauchstück und zurück gestochen, sodass der Aortenstumpf dem Schlauchstück von außen anliegt und sich nicht unter dem Flussdruck in das Lumen des Schlauchstücks wölbt.

Das Standard-Kulturmedium besteht hierbei aus DMEM mit 4,5mg/ml Glucose und GlutaMAX™, dem 10% fetales Kälberserum sowie 5ml nicht-essenzielle Aminosäuren (1%), 200 U/ml Penicillin, 200 µg/ml Streptomycin und 5 µg/ml Amphotericin B zugesetzt werden.

Für die prokalzifizierende Bedingung werden dem Kulturmedium außerdem 10 mM β-Glycerolphosphat und 1,5 mM Calciumchlorid zugegeben. Vor der Verwendung wird das Kulturmedium auf 37°C erwärmt.

Das Bioreaktor-System wird nun mit einem der beiden oben beschriebenen Kulturmedien gefüllt, luftdicht abgeschlossen und der Versuchslauf wird über die Steuerungssoftware gestartet.

Parameter	Sollwert
Druck	107mBar
Pumpendrehzahl	50 Umdrehungen/Minute
pH-Wert	7,35
Temperatur	37°C

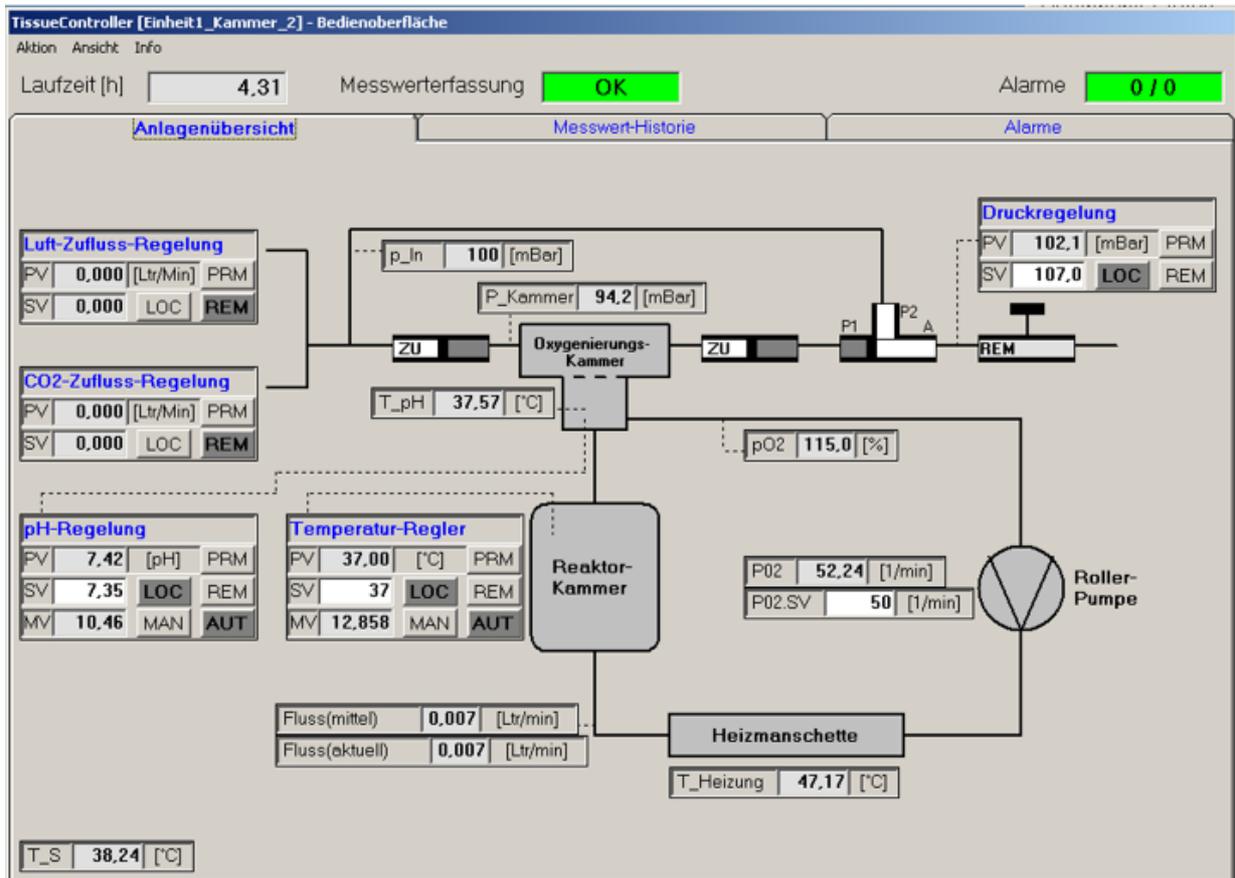
**Tab. 16: Kulturbedingungen im Bioreaktor.** Die Sollwerte werden vor jedem Lauf in der Steuerungssoftware eingestellt.

### 2.2.3 Laufdatenanalyse

Sämtliche in der Software gemessenen Parameter werden fortlaufend durch den Steuerungscomputer aufgezeichnet sowie unter den Registerkarten „Anlagenübersicht“ (Abb. 3) und „Messwerthistorie“ angezeigt. Die aufgezeichneten Messwerte können anschließend mithilfe einer Template-Datei in eine Excel-Tabelle umgewandelt werden.

Zur graphischen Darstellung der Bioreaktor-Messwerte werden Diagramme in der Software Microsoft Excel 2016 erstellt.

Unter der Registerkarte „Alarmer“ finden sich zudem aktuelle und behobene Fehlermeldungen, die auch als Microsoft-Textdokument ausgegeben werden. So wird ein störungsfreier Versuchsablauf sichergestellt.



**Abb. 3: Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware.** Es ist die Registerkarte „Anlagenübersicht“ ausgewählt, in der die Messwerte in Echtzeit abgelesen werden können.

## 2.2.4 Ernte und Dokumentation

Nach siebentägiger Kultur im Bioreaktor wird dieser heruntergefahren und die Artenkonduits werden nach Entfernen der Nähte aus der Kammer entnommen.

Die Konduits werden nun entlang der Kommissur zwischen den Abgängen der Koronararterien eingeschnitten. Anschließend werden sie in PBS-Medium gewaschen, die einzelnen Klappentaschen vollständig abgesetzt und in einer Petrischale auf einer Durchlichtunterlage mit einem geeichten Maßstab und einer Digitalkamera dokumentiert.

Unmittelbar danach werden die Klappentaschen halbiert. Zwei der drei Klappentaschen werden in Microtubes mithilfe flüssigen Stickstoffs tiefgefroren, die dritte für histologische Färbungen eingebettet (siehe Abschnitt 2.2.8.1).

Die Proben werden bis zur Weiterverwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.2.5 Statische Kultivierung

Zur Untersuchung des Einflusses der dynamischen Kultivierung im BR werden analog dazu Aortenkonduits gemäß Abschnitt 2.2.1 präpariert und einer statischen Kultur über sieben Tage unterzogen. Dabei werden die Aortenkonduits in 50ml-Tubes mit angedrehtem Deckel und mit den beiden in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Kulturmedien in einem Zellkultur-Inkubator (bei  $37^{\circ}\text{C}$  und  $5\% \text{ pCO}_2$ ) kultiviert (Abb. 4). Das Medium wird täglich gewechselt. Anschließend werden die Klappentaschen analog zur Bioreaktor-Kultur entnommen und fotodokumentiert (siehe Abschnitt 2.2.4).



**Abb. 4: Statische Kultivierung eines Aortenkonduits im 50ml Tube.** Das Gefäß wird über sieben Tage im Zellkultur-Inkubator unter täglichem Mediumwechsel kultiviert.

## 2.2.6 Gel-Elektrophorese und Western-Blot

Die tiefgekühlten Klappentaschen werden zur Proteinisolation zerkleinert und für 10 Minuten in RIPA-Puffer mit cOmplete™ Proteasen-Inhibitor Cocktail im Thermomixer bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Anschließend werden die Proben auf zehnpromzentigen SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt und per Western-Blot auf Nitrozellulose-Membranen übertragen.

Nach einstündigem Blockieren mittels fünfprozentigem BSA in TBST werden die Membranen mit primär spezifischen Antikörpern gegen *alpha smooth muscle actin* und Osteopontin versetzt. Die genauen Bezeichnungen der Antikörper sind dem Materialteil (Tab. 9 und 10) zu entnehmen.

Die Membranen werden mit TBST gewaschen und danach mittels Meerrettichperoxidase angefärbt. Die Banden werden daraufhin mit WesternBright-Chemilumineszenz-Substrat am Imager dargestellt und schließlich mittels ImageQuant für Windows ausgewertet (s. Abschnitt 2.2.9).

### 2.2.7 qPCR

Zur RNA-Isolation werden die ovinen Klappentaschen zunächst mithilfe eines Mörsers zerkleinert und anschließend mit dem Homogenisator bearbeitet. Anschließend werden Chloroform und Trizol zur Probe gegeben und eine Zentrifugation bei 4°C und 11.000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten durchgeführt. Die wässrige Phase wird nun mit Isopropanol versetzt und für 10 Minuten bei 11.000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Das hierdurch entstandene Pellet wird mit 75%-iger Ethanollösung versetzt und erneut zentrifugiert. Die isolierte RNA wird mithilfe des Tecan-Readers quantifiziert.

Zur weiteren Aufreinigung der RNA und Reversen Transkription in cDNA werden das Qiagen RNeasy Mini Kit sowie QuantiTect Reverse Transcription Kit nach den Herstellervorgaben verwendet.

Zur Beurteilung der RNA-Qualität wird die RNA Integrity Number (RIN) mithilfe des Eukaryote Total RNA Nano Chip von Agilent Technologies bestimmt. Dabei werden die Proben auf dem Nano Chip gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ein RIN-Wert von 10 zeigt eine vollständig intakte RNA-Probe an, während ein RIN-Wert von 1 eine vollständig degradierte RNA-Probe beschreibt. Die RIN-Werte aller in dieser Arbeit genutzten RNA-Proben liegen über 8,4.

Die qPCR wird mithilfe des GoTaq qPCR Master Mix im StepOnePlus Real Time PCR System durchgeführt. Dabei wird dem Master Mix der Referenzfarbstoff Carboxy-X-Rhodamin zugesetzt. Die relativen Genexpressions-Level werden mithilfe der StepOne Software v2.3 und der delta-delta-CT-Methode berechnet.

Es werden die Genexpressions-Level von Osteopontin (OPN), Alpha1-Typ1-Kollagen (KOLL1A1), Hypoxie-induziertem Faktor 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Alkalische Phosphatase (ALP) sowie Vascular Endothelial Growth Factor

(VEGF) per qPCR bestimmt. Die Sequenz der Primer findet sich im Materialteil in Tab. 13.

## 2.2.8 Histologische Färbungen

### 2.2.8.1 Einbettung der Präparate und Kryoschnitte

Zur späteren histologischen Untersuchung müssen die gewonnen Klappentaschen zunächst in kleinen Blöcken, sogenannten Cryomolds, fixiert werden, aus denen anschließend feine Kryoschnitte angefertigt werden können. Dazu werden die gewonnenen Klappentaschen unmittelbar nach der Fotodokumentation in der Mittellinie entlang der kurzen Seite halbiert. Das Cryomold wird zur Hälfte mit Cryocompound gefüllt, die Klappentasche wird möglichst gerade darauf platziert und die Ausrichtung der Klappentasche auf dem Cryomold notiert. Daraufhin wird das Cryomold weiter mit Cryocompound befüllt und zur Fixierung in mit flüssigem Stickstoff vorgekühltem Isopentan tiefgefroren.

Die Blöcke werden nun bis zur Anfertigung der Kryoschnitte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

Im nächsten Schritt werden die Cryomolds auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gebracht, um am Kryostaten Gewebsschnitte von  $5\mu\text{m}$  Dicke anzufertigen. Dazu wird das Cryomold zunächst auf den Schneidblock des Kryostaten aufgebracht und überstehendes Cryocompound abgetragen, um die Schnitte anschließend auf sauberen Objektträgern zu fixieren.

Die Objektträger werden danach bis zur Weiterverwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.8.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als „Übersichtsfärbung“ zur Beurteilung der feingeweblichen Präparatmorphologie werden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) der Gewebsschnitte durchgeführt. Bei dieser histologischen Standardmethode färbt das Hämatoxylin saure Strukturen wie bspw. Zellkerne und die darin enthaltene DNA blau, während das Eosin basische Strukturen wie Zellplasmaproteine, Kollagen und Mitochondrien rot färbt.

Die Kryoschnitte werden hierbei mit der Hämatoxylin-Lösung angefärbt, mit destilliertem Wasser behandelt und fünfprozentiger Essiglösung differenziert, um überschüssiges Hämatoxylin zu entfernen. Anschließend werden die Schnitte in 70% Ethanol

gewaschen und mit Eosin B gegengefärbt. Danach werden die Objektträger mithilfe der aufsteigenden Alkoholreihe (70-96-100%) mit zwei Xylolstufen entwässert.

Sobald die Objektträger getrocknet sind, werden sie mit Roti Histokitt II eingedeckt und mit einem Deckglas versiegelt. Schließlich werden die Schnitte unter einem Lichtmikroskop fotodokumentiert.

### 2.2.8.3 Movat-Pentachrom-Färbung

Zur Darstellung der Verteilung von Kollagen, Glykosaminoglykanen und elastischen Fasern innerhalb des Klappengewebes werden Movat-Pentachrom-Färbungen durchgeführt, die sich insbesondere zur Darstellung von kardiovaskulärem Gewebe eignen.

Dabei werden fünf verschiedene Färbungen kombiniert: Eisenhämatoxylin färbt Zellkerne und elastische Fasern blauschwarz, *Safran du Gâtinais* lässt kollagenes Bindegewebe gelb erscheinen. Muskelgewebe erscheint durch die Anfärbung mit Brillant-Crocein-Säurefuchsin rot und die Grundsubstanz des Gewebes durch das Alcianblau blaugrün.

Die Kryoschnitte werden dazu in vierprozentiger Formalinlösung fixiert und danach für zehn Minuten in auf 50°C erhitzte Bouin-Lösung getaucht. Im Anschluss werden sie unter fließendem kaltem Leitungswasser gespült und für fünf Minuten in 5%-Natriumthiosulfat-Lösung fixiert. Nach drei Waschschritten mit destilliertem Wasser werden die Schnitte mit Alcianblau angefärbt, mit fließendem Leitungswasser gespült und schließlich in 60°C warmem alkalischen Alkohol stabilisiert.

Danach werden die Schnitte in Weigert's Working Solution und Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Lösung angefärbt und schließlich in 5%-Phosphorwolframsäure differenziert. Dazwischen erfolgen drei Waschschrritte mit destilliertem Wasser. Die Kryoschnitte werden nun in einprozentiger Essigsäure gespült und durchlaufen erneut drei Waschschrritte mit destilliertem Wasser, bevor sie in Ethanol dehydriert und mit in alkoholischem Safran gefärbt werden.

Schließlich werden die Schnitte erneut in Ethanol dehydriert und mittels Xylols entfettet. Nach dem Trocknen werden die Objektträger mit Roti Histo Kitt II eingedeckt und mit einem Deckglas versiegelt.

### 2.2.8.4 Alizarin-Färbung

Bei der Alizarin-Färbung lagert sich der Farbstoff Alizarinrot S als Chelat an Calciumablagerungen in Geweben an und bildet mit diesen Alizarinrot-S-Calcium, das unter dem Lichtmikroskop rot erscheint. Diese Reaktion wird hier genutzt, um das Ausmaß und die Verteilung der Biomineralisation in den verschiedenen Kulturbedingungen zu veranschaulichen. Der Hintergrund sowie Zellkerne erscheinen währenddessen rötlich bis orange.

Die Objektträger werden im ersten Schritt auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend werden die Kryoschnitte in 4% Formaldehyd fixiert, bevor sie in 2% Alizarin-Lösung gefärbt werden.

Es folgen die Dehydrierung und mehrere Waschschrte in Aceton und Xylol. Nach dem Trocknen werden die Färbungen mit Roti Histokitt II und einem Deckglas konserviert.

### 2.2.8.5 Deskriptive Auswertung

Die HE-, Movat-Pentachrom- und Alizarin-Färbungen werden deskriptiv ausgewertet. Die Schnitte werden dazu unter einem Durchlichtmikroskop der Firma Leica auf morphologische Auffälligkeiten untersucht und anschließend in 5- und 20-facher Vergrößerung fotodokumentiert.

### 2.2.9 Statistische Auswertung

Die prokalzifizierende sowie die Standard-Bedingung in der Bioreaktor- und statischen Kultivierung werden paarweise mittels Mann-Whitney-Test verglichen.

Darüber hinaus werden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns-Posttest die nativen Kontrollen, die Bioreaktor- und die statische Kultur miteinander verglichen.

Hierbei liegt der maximale  $\alpha$ -Fehler bei 5 %, dementsprechend sind die Ergebnisse ab einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  signifikant. Sterne markieren hierbei die Signifikanzniveaus im Dunn's-Post-Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zur makroskopischen Auswertung werden die auf einer Durchlichtunterlage mit einem geeichten Maßstab fotodokumentierten Klappentaschen in der Software ImageJ analysiert. Dazu wird das gesamte Foto zunächst invertiert. Anschließend werden die Präparate mit dem Werkzeug „*freehand selection*“ ausgewählt und somit ihre Fläche ausgemessen. Danach wird die optische Dichte der Präparate mit der optischen Dichte des Hintergrunds verglichen.

Für die Auswertung der Bandenintensität im Western-Blot kommt die Software ImageQuant zum Einsatz.

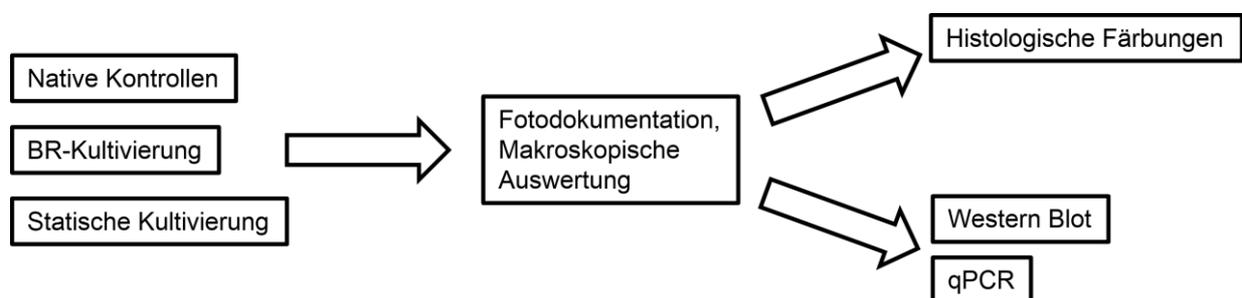
Zur Darstellung der gemessenen Einzelwerte, der statistischen Mittelwerte und Standardabweichungen sowie für die Anfertigung der Übersichtsdigramme wird die Software GraphPad Prism 9 für Windows genutzt.

### 3. Ergebnisse

Zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Versuchsbedingungen auf ovine Aortenklappentaschen wurden Aortenkonduits präpariert und anschließend im Bioreaktor (BR) bzw. statisch im Zellkultur-Inkubator über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. Dabei wurden die Messwerte des BR fortlaufend erfasst und automatisch reguliert, um eine Vergleichbarkeit der Versuchsläufe zu gewährleisten. Eine detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus findet sich im Abschnitt 2.2.2. Darüber hinaus wurden native Klappentaschen gewonnen.

Nach der Entnahme wurden die Proben auf makroskopischer Ebene begutachtet und auf histologischer Ebene mittels Hämatoxylin-Eosin-, Movat-Pentachrom- und Alizarin-Färbungen untersucht. Darüber hinaus wurden Western-Blot und qPCR zur Analyse der Veränderungen auf Gen- und Proteinebene durchgeführt.

Die im Ergebnisteil gezeigten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse dar und stehen exemplarisch für die durchgeführten Versuche und deren Ergebnisse.

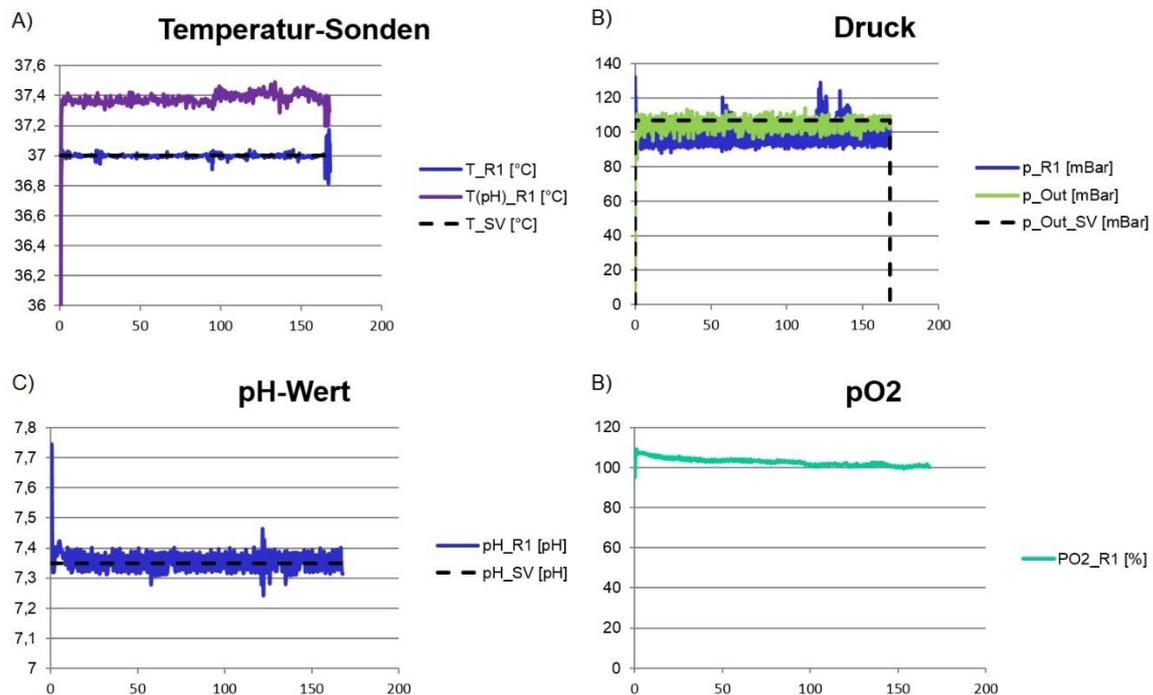


**Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus**

#### 3.1 Analyse der BR-Läufe

Um einen störungsfreien Versuchsablauf sicherzustellen, wurden sämtliche in der Steuerungssoftware gemessenen Parameter fortlaufend aufgezeichnet. Die aufgezeichneten Laufdaten zeigten vergleichbare, störungsfreie Läufe unter kontinuierlichem Erhalt der physiologischen Kulturbedingungen über sieben Tage für jeden Versuchsdurchlauf (Abb. 6). So blieb der Druck im Kammer-System weitgehend stabil bei ca. 107mBar. Die Temperatur sowie der pH-Wert zeigten aufgrund der automatischen Gegenregulation einen um die Sollwerte undulierenden Verlauf. Der Sauerstoffpartialdruck pO<sub>2</sub> konnte während des gesamten Versuches weitgehend

aufrechterhalten werden. Insgesamt wurden je n=5 störungsfreie Versuchsläufe pro BR-Kulturbedingung erreicht.



**Abb. 6: Graphische Darstellung der Laufdaten eines repräsentativen BR-Versuchslaufs.** Auf der x-Achse ist die Laufzeit in Stunden aufgetragen. A) Messwerte der Temperatursonde ( $T_{R1}$ ), deren Messung für die Temperaturregulation herangezogen wird, und der Temperatursonde innerhalb der pH-Sonde ( $T(pH)_{R1}$ ). Die unterschiedlichen Messwerte sind auf ihre Entfernung von der Heizmanschette zurückzuführen.  $T_{SV}$  beschreibt den Sollwert. B) Messwerte des Oxygenierungskammerdruckes ( $p_{R1}$ ) und des Systemdruckes ( $p_{Out}$ ).  $p_{Out\_SV}$  beschreibt den Sollwert. C) pH-Messwerte.  $pH_{SV}$  beschreibt hierbei den Sollwert. D) Messwerte für den Sauerstoffpartialdruck. Exemplarische Darstellung für beide Kultivierungsbedingungen mit jew. n=5 Bioreaktorläufen.

### 3.2 Makroskopie

Zum Zeitpunkt der Explantation aus der BR-Kammer war bereits makroskopisch eine Schrumpfung mit Dickenzunahme der Aortenklappentaschen nach Kultivierung im BR gegenüber nativen sowie statischen kultivierten Klappentaschen zu beobachten (Abb. 7A). Die Taschen erschienen im Vergleich zu nativen Klappentaschen weniger transparent, wiesen ansonsten aber keine morphologischen Auffälligkeiten im Sinne einer Aortenklappensklerose oder -verkalkung auf. Es konnte keine makroskopische Fenestrierung der Klappentaschen nach der Kultivierung festgestellt werden, jedoch fiel eine leicht rötliche Verfärbung der Proben durch das Kulturmedium auf [64].

Auch in der statistischen Auswertung bestätigte sich, dass die Klappentaschen nach BR-Kultur eine signifikant kleinere Fläche aufwiesen (Abb. 7B). Dabei war die

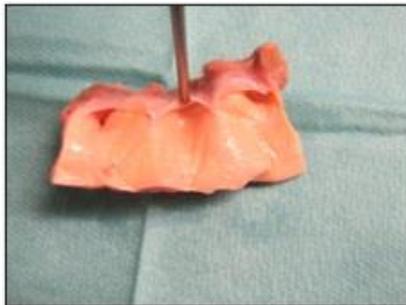
Größendifferenz zwischen BR-deg und CC-deg signifikant ( $p = 0,0453$ ), während der Größenunterschied zwischen BR-std und CC-std ( $p = 0,0005$ ), bzw. nativ und Bioreaktorproben sogar hochsignifikant war (native vs. BR std:  $p < 0,0001$ ; native vs. BR deg:  $p = 0,0008$ ) [64].

Sowohl die im BR als auch die statisch kultivierten Proben zeigten in der ImageJ-Auswertung eine signifikant höhere optische Dichte verglichen mit den nativen Klappentaschen (native vs. BR std:  $p = 0,0001$ ; native vs. BR deg:  $p = 0,0289$ ; native vs. CC std:  $p = 0,0101$ ; native vs. CC deg:  $p < 0,0001$ ; siehe auch Abb. 7C), jedoch keine signifikanten Unterschiede untereinander [64]. Insgesamt zeigt sich, dass die Veränderung der optischen Dichte bei allen Kulturbedingungen auftritt, während die Verkleinerung der Taschenfläche durch die dynamische Kultivierung im Bioreaktormodell verstärkt induziert wird.

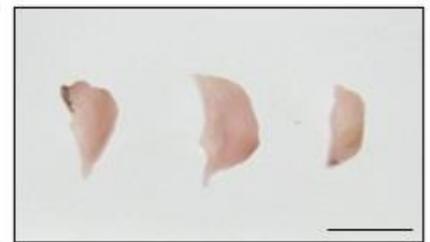
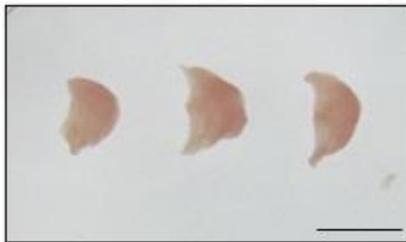
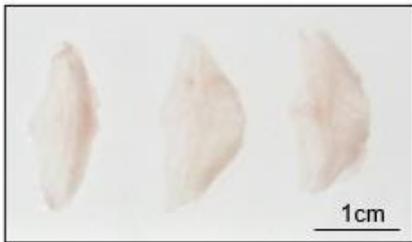
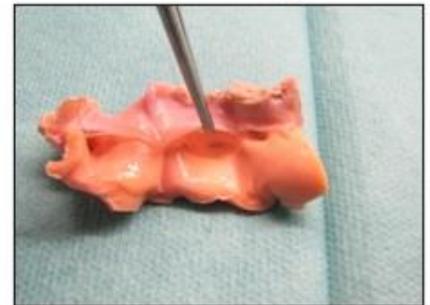
A) Nativ



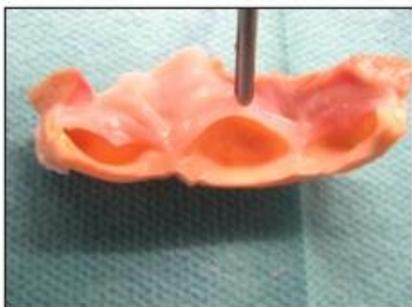
BR std



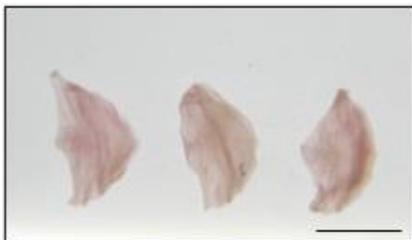
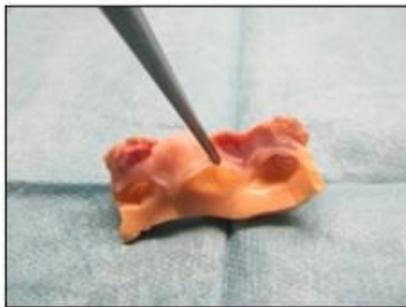
BR deg

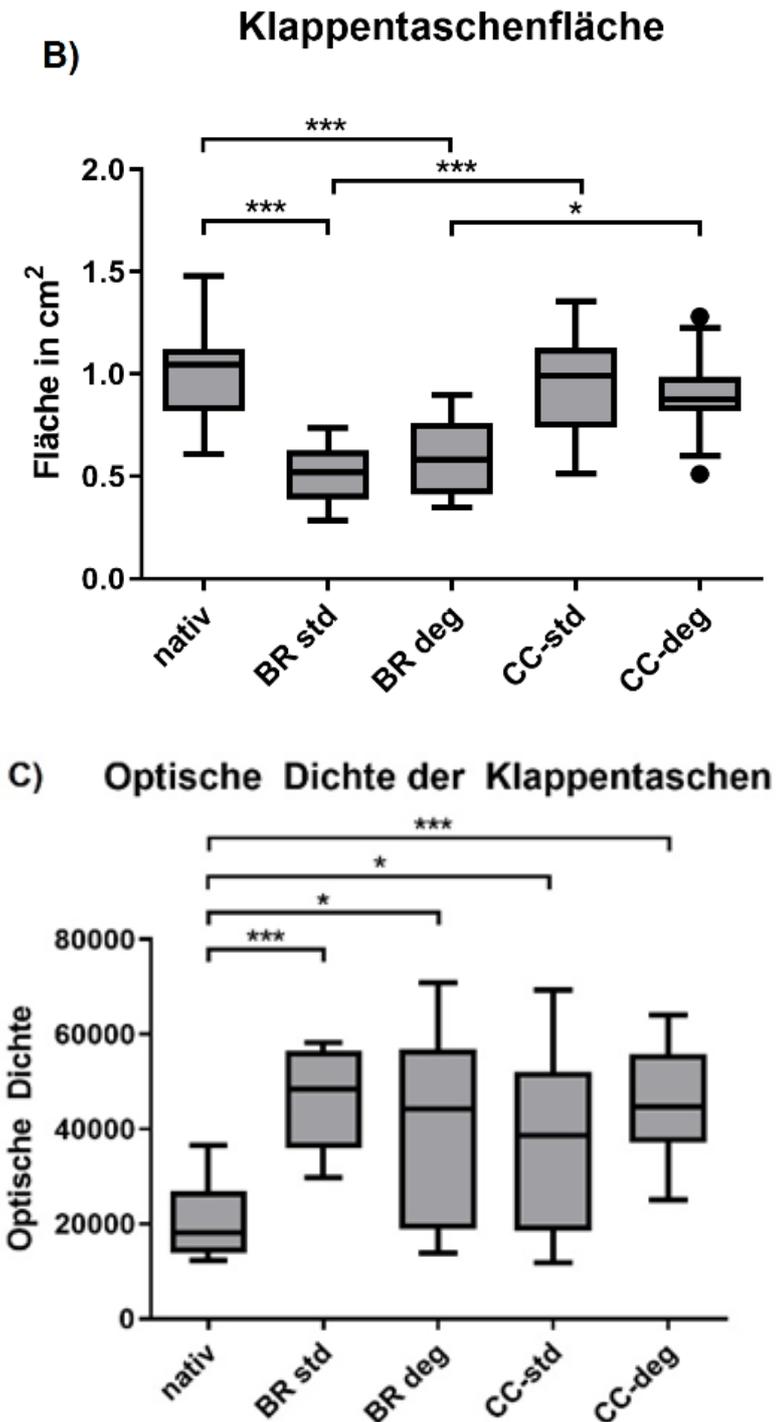


CC std



CC deg





**Abb. 7: Makroskopie der Aortenkonduits und Klappentaschen [64].**

A) Exemplarisch ist die Makroskopie der Aortenkonduits (oben) und der geernteten Klappentaschen dargestellt. (Maßstab=1cm). B) Auswertung der Klappentaschengröße: Es zeigte sich eine signifikante Schrumpfung der im BR kultivierten Klappentaschen verglichen mit statisch kultivierten und nativen Klappentaschen. C) Auswertung der optischen Dichte: Gegenüber nativen Kontrollen zeigte sich eine signifikante Zunahme der optischen Dichte in allen Kulturbedingungen. Auswertung von 7 (nativ), 3 (Bioreaktor std und deg) bzw. 8 (statisch std und deg) Konduits mit jeweils 3 Taschen. Dargestellt sind Median und Quartile als Box-Plot, wobei Ausreißer nach Tukey als Punkte dargestellt sind. Statistische Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-Test (keine Signifikanzen) bzw. Kruskal-Wallis-Test und Dunns-Post-Test ermittelt (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## 3.3 Histologie

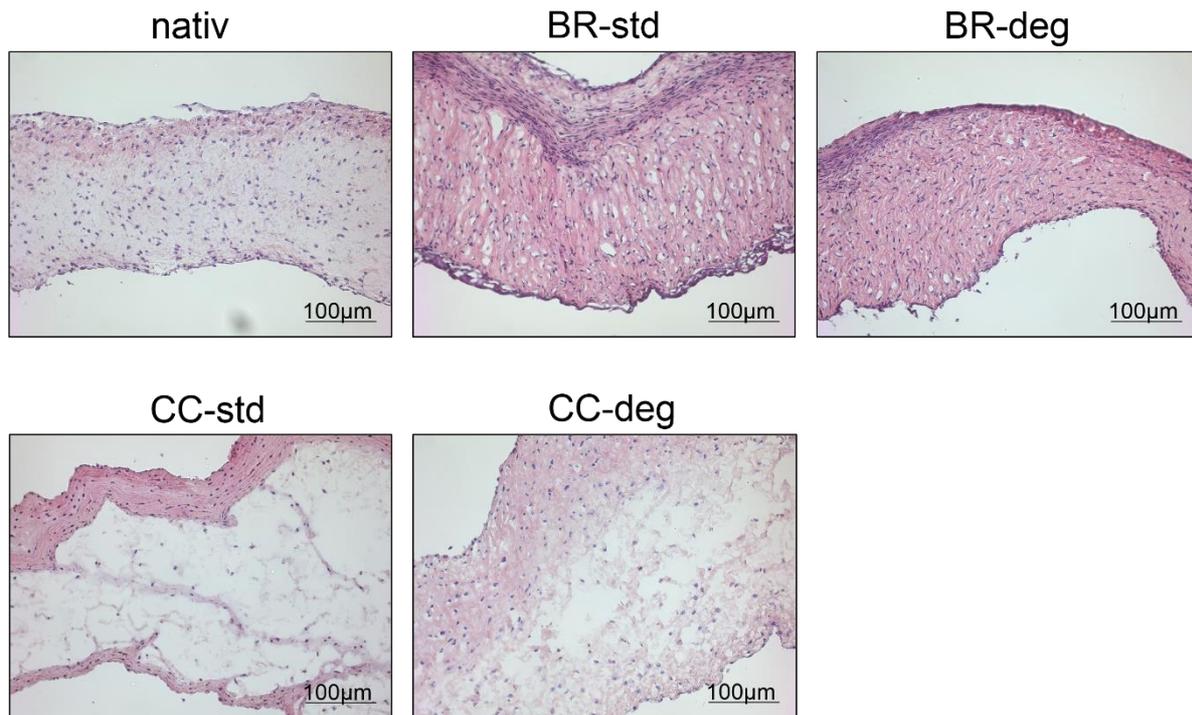
### 3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Überprüfung der Biokompatibilität der Kulturbedingungen wurden HE-Färbungen der Proben angefertigt (siehe Abschnitt 2.2.8.2). Dabei werden saure Strukturen wie bspw. Zellkerne und die darin enthaltene DNA vom Hämatoxylin blau angefärbt, während das Eosin basische Strukturen wie Zellplasmaproteine, Kollagen und Mitochondrien rot färbt.

Physiologischerweise weisen Aortenklappentaschen hierbei eine Dreischichtung aus den Laminae fibrosa, spongiosa und ventricularis auf. Die Farbintensität variiert dabei je nach Gehalt an den angefärbten Strukturen. In der Regel zeigt sich eine höhere Zelldichte in den Laminae fibrosa und ventricularis. In Abb. 8 sind repräsentative Färbungen dargestellt.

Es fielen deutliche Unterschiede in der Zelldichte der Lamina spongiosa zwischen den einzelnen Präparaten auf, die von dichtbesiedelten bis zu zellarmen Phänotypen reichten. Da sich diese Unterschiede auch innerhalb der einzelnen Kulturbedingungen sowie unter verschiedenen nativen Präparaten zeigten, ist diese Beobachtung am ehesten auf die interindividuelle morphologische Variabilität zurückzuführen [64].

Es wurde kein Unterschied in der Zusammensetzung der Lamina spongiosa zwischen nativen und im BR bzw. statisch kultivierten Proben festgestellt. Abgesehen davon weisen die verschiedenen Versuchsbedingungen sowie den nativen Kontrollen keine augenscheinlichen Unterschiede zueinander auf. Dies weist auf den Erhalt der Dreischichtung des Klappentaschengewebes in allen Kulturbedingungen hin und belegt somit die Biokompatibilität der gewählten Kulturbedingungen [64].

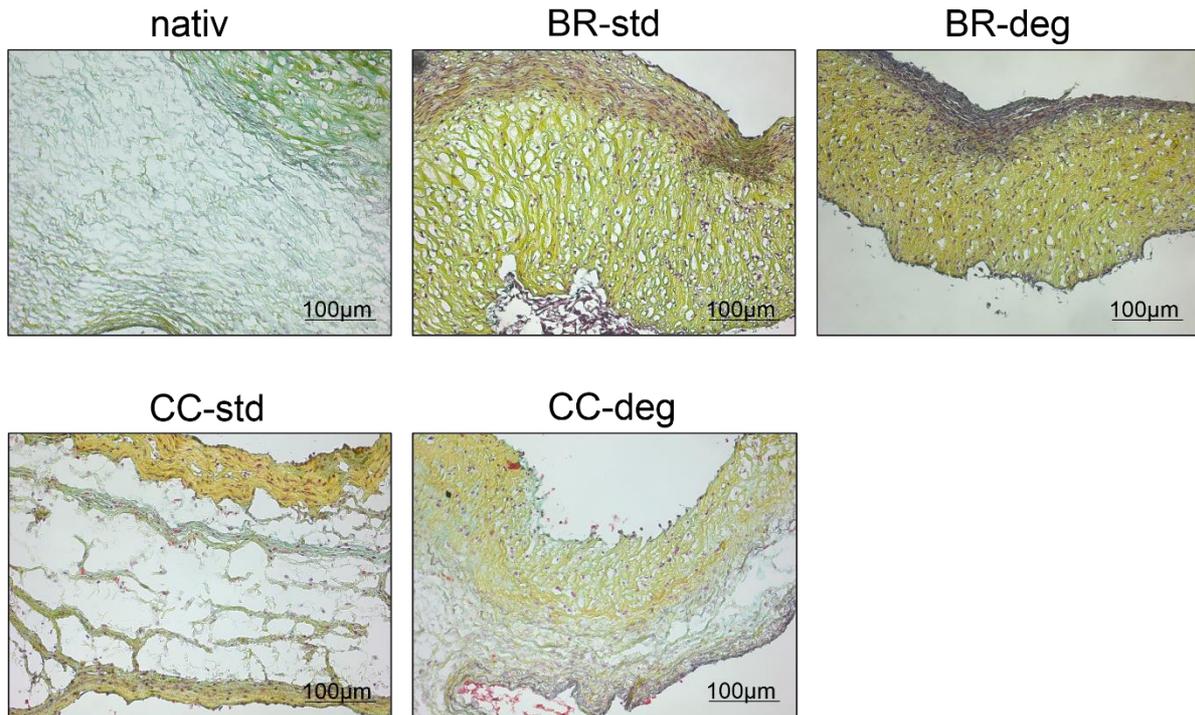


**Abb. 8: Die HE-Färbungen zeigen einen Erhalt der physiologischen Gewebsmorphologie.** Es wurden im BR (je n=3 mit prokalfizierendem und Standard-Medium) sowie statisch kultivierte Aortenklappentaschen (je n=5 pro Kulturmedium) mit nativen Kontrollen (n=5) verglichen. Bilder in 20-facher Vergrößerung, Maßstab im Bild =100µm

### 3.3.2 Movat-Pentachrom-Färbung

Zur genaueren Charakterisierung der einzelnen Gewebsschichten wurde eine Movat-Pentachrom-Färbung der Proben nach dem im Abschnitt 2.2.8.3 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Dabei färbt Eisenhämatoxylin Zellkerne und elastische Fasern blauschwarz an und *Safran du Gâtinais* lässt kollagenes Bindegewebe gelb erscheinen. Muskelgewebe wird durch Brillant-Crocein-Säurefuchsin rot dargestellt und die Grundsubstanz des Gewebes erscheint durch das Alcianblau blaugrün.

Hierbei stellt sich die Dreischichtung im Vergleich zur HE-Färbung deutlicher dar. Die Lamina fibrosa erscheint aufgrund ihrer dichten Kollagenfasern gelb, die Lamina spongiosa ist reich an Glykosaminoglykanen und färbt sich daher blaugrün und die Lamina ventricularis stellt sich durch ihre zahlreichen elastischen Fasern blauschwarz und gelb dar. Es zeigte sich eine hohe interindividuelle morphologische Variabilität der Segel, jedoch konnte kein morphologischer Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen ausgemacht werden. Darüber hinaus bestätigte sich die bereits makroskopisch erkennbare Dickenzunahme nach siebentägiger Kultivierung unter Erhalt der physiologischen dreischichtigen Gewebsstruktur (Abb. 9) [64].



**Abb. 9: Movat-Pentachrom-Färbung der Aortenklappentaschen in 20-facher Vergrößerung.**

Es wurden im BR (je n=3 mit prokalzifizierendem und Standard-Medium) sowie statisch kultivierte Aortenklappentaschen (je n=5 pro Kulturmedium) mit nativen Kontrollen (n=5) verglichen.

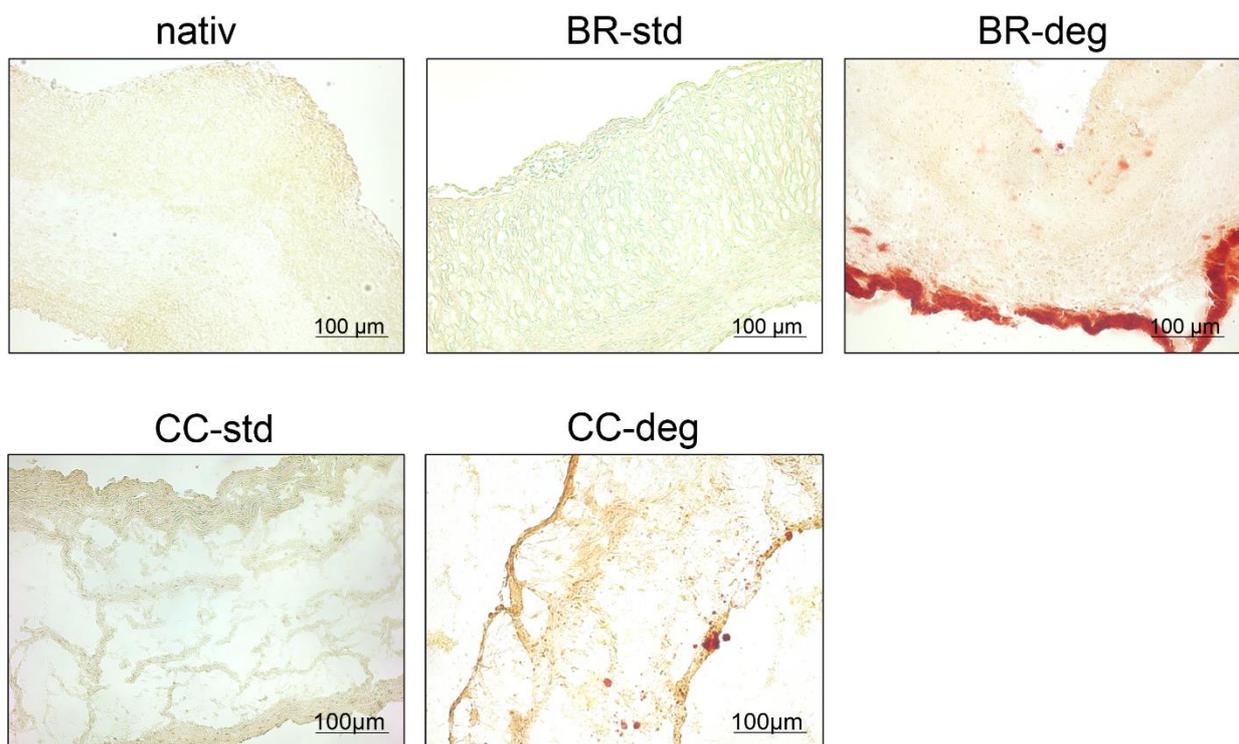
Innerhalb der Versuchsgruppen zeigte sich eine sehr variable Morphologie der Taschen. Es konnte kein morphologischer Unterschied zwischen den unterschiedlichen Kulturbedingungen gefunden werden, die physiologische Dreischichtung blieb sowohl nach statischer als auch nach BR-Kultur erhalten. Zudem fiel eine Verdickung der kultivierten Klappentaschen im Vergleich zu nativen Kontrollen auf.

Bilder in 20-facher Vergrößerung, Maßstab im Bild = 100µm

### 3.3.3 Alizarin-Färbung

Um die Verteilung und das Ausmaß der Kalzifizierung im Gewebe zu charakterisieren, wurden Alizarin-Färbungen der Schnitte gemäß Abschnitt 2.2.8.4 angefertigt (Abb. 10). Hierbei färben sich Calciumablagerungen unter dem Lichtmikroskop stark rot, während der Hintergrund sowie Zellkerne orange bis hellrot erscheinen.

Dabei zeigten die nativen sowie die mit Standardmedium kultivierten Aortenklappentaschen keine Biominalisation. Im Gegensatz dazu kam es unter BR-Kultur mit prokalzifizierendem Medium zu deutlichen Kalziumablagerungen in der Lamina ventricularis. Darüber hinaus war auch in der Lamina fibrosa eine leichte Kalzifizierung erkennbar [64]. Nach statischer Kultivierung mit prokalzifizierendem Medium zeigte sich ein ähnliches Kalzifikationsmuster, jedoch fiel eine deutlich geringere Kalzifikation auf.



**Abb. 10:** In der Alizarin-Färbung zeigt sich eine Kalzifizierung durch prokalzifizierende Versuchsbedingungen [64]. Hierzu wurden im BR (je n=3 mit prokalzifizierendem und Standard-Medium) sowie statisch kultivierte Aortenklappentaschen (je n=5 pro Kulturmedium) mit nativen Kontrollen (n=5) verglichen. Die Kalziumablagerungen zeigen sich insbesondere in der Lamina ventricularis.

Bilder in 20-facher Vergrößerung, Maßstab im Bild = 100µm

### 3.4 Veränderungen der Genexpression

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Versuchsbedingungen auf die Genexpression zu charakterisieren, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

Dabei wurde u.a. die Expression von OPN, einem wichtigen prodegenerativen Faktor, untersucht. In der qPCR zeigte sich ein signifikanter Anstieg der OPN-Expression nach BR-Kultivierung gegenüber nativen sowie statisch kultivierten Klappentaschen (native vs. BR-std vs. CC-std:  $p_{std} = 0,0014$ ; native vs. BR-deg vs. CC-deg:  $p_{deg} = 0,0006$ ). Währenddessen zeigten die statisch kultivierten Klappentaschen keine signifikante Veränderung der OPN-Expression gegenüber nativen Klappentaschen [64].

Im Gegensatz dazu kam es bei den im BR kultivierten Klappentaschen verglichen mit nativen Aortenklappentaschen zu keiner signifikanten Veränderung der Kollagen-Typ-I-Expression in der qPCR. Zudem kam es bei den statisch kultivierten Klappentaschen zu einer signifikant niedrigeren Kollagen-Typ-I-Expression gegenüber BR-Kultur und nativen Aortenklappen-taschen (native vs. BR vs. CC:  $p_{std} = 0,0005$ ;  $p_{deg} = 0,0052$ ) [64]. Kollagen-Typ-I ist ein wichtiges Strukturprotein und integraler Teil der EZM. Die unveränderte Expression nach BR-Kultur ist somit als Hinweis auf die Biokompatibilität der BR-Kultivierung zu werten.

Als weiterer prodegenerativer Faktor wurde ALPL untersucht. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von ALPL zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen festgestellt ( $p_{std} = 0,1032$ ,  $p_{deg} = 0,0835$ ), jedoch zeigte sich eine tendenzielle Abnahme in der BR-deg-Bedingung gegenüber nativen Proben ( $p = 0,0779$ ) [64].

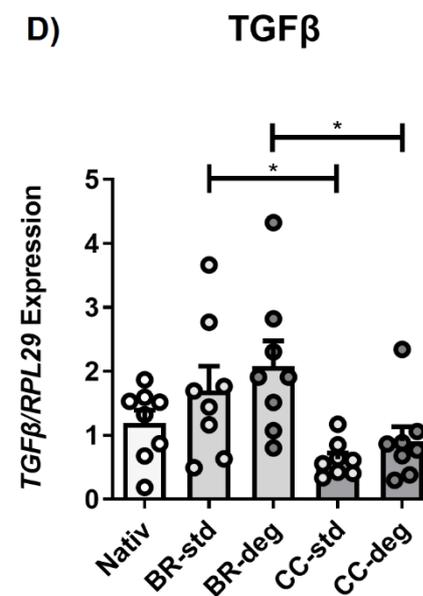
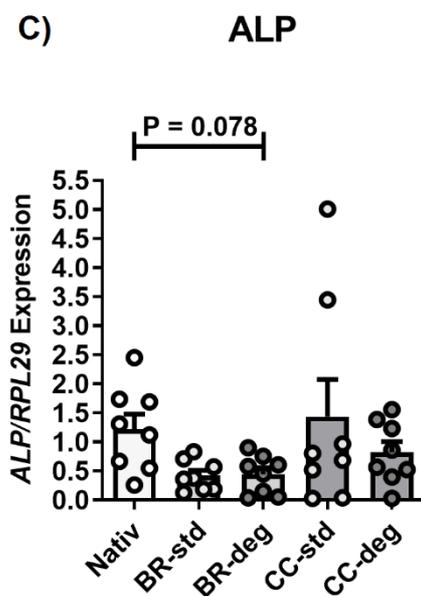
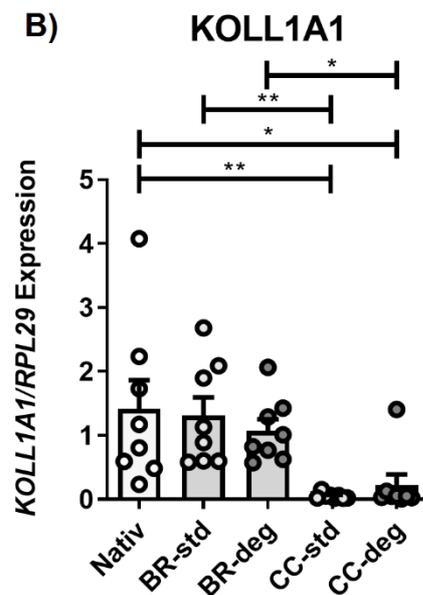
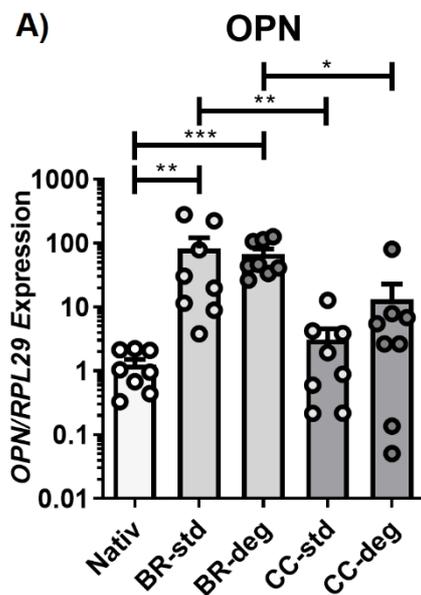
TGF $\beta$  wirkt entscheidend an Degenerationsprozessen und der Neoangiogenese mit. Die im BR kultivierten Aortenklappentaschen zeigten eine signifikant höhere TGF $\beta$ -Expression gegenüber statischen kultivierten Proben, jedoch fanden sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zu nativen Klappentaschen ( $p_{std} = 0,0226$ ;  $p_{deg} = 0,0326$ ) [64].

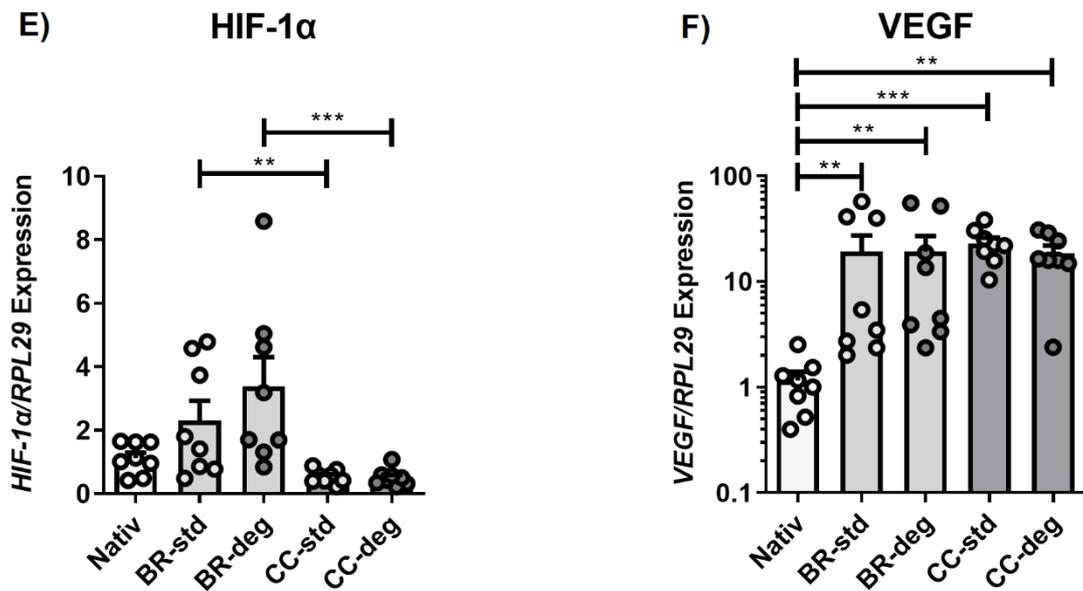
Da eine Schrumpfung und Verdickung der Klappentaschen beobachtet werden konnte, untersuchten wir darüber hinaus die Expression des Hypoxiemarkers HIF-1 $\alpha$  sowie des HIF-1 $\alpha$ -Zielgens VEGF. So wurde eine signifikant höhere HIF-1 $\alpha$ -Expression nach BR-Kultivierung gegenüber statisch kultivierten Klappentaschen gemessen ( $p_{std} = 0,0064$ ;  $p_{deg} = 0,009$ ) [64]. Diese Beobachtung deckt sich mit der ebenfalls signifikanten

Größenabnahme der im BR kultivierten Klappentaschen verglichen mit statisch kultivierten Klappentaschen.

In der CC-std-Bedingung zeigte sich eine leichte Abnahme der HIF-1 $\alpha$ -Expression gegenüber nativen Proben ( $p = 0,0779$ ) [64].

Die Expression von VEGF war sowohl nach Kultur im BR als auch nach statischer Kultur gegenüber nativen Proben signifikant erhöht ( $p_{std} = 0,0006$ ;  $p_{deg} = 0,007$ ) [64]. Die erhöhte VEGF-Expression passt somit zur im Abschnitt 3.2 beschriebenen Dickenzunahme nach statischer und BR Kultivierung.





**Abb. 11: Charakterisierung der Genexpressions-Unterschiede nach BR- und statischer Kultur [64].**

Ganze Aortenkonduits wurden sieben Tage lang entweder im Bioreaktor (BR) oder im Zellkultur-Inkubator (CC) kultiviert und mit nativen ovinen Aortenklappentaschen mittels qPCR verglichen. Dabei wurden die Standard- (std) und die prokalfizierende (deg) per Mann-Whitney-Test verglichen. Zwischen BR, CC und nativen Proben kam ein Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz.

A) Die OPN-Expression lag nach BR-Kultur signifikant höher als nach statischer Kultur und in nativen Proben (native vs. BR-std vs. CC-std:  $p_{std} = 0,0014$ ; native vs. BR-deg vs. CC-deg:  $p_{deg} = 0,0006$ ).

B) Es wurde ein signifikanter Abfall der Koll1A1-Expression nach statischer Kultur gegenüber der BR-Kultur und nativen Aortenklappentaschen gemessen ( $p_{std} = 0,0014$ ;  $p_{deg} = 0,0006$ ).

C) Es zeigte sich keine signifikant veränderte ALP-Expression, jedoch nahm die ALP-Expression nach prokalfizierender BR-Kultur gegenüber nativen Proben ab ( $p = 0,0779$ ).

D) Nach BR-Kultur wurde eine signifikant höhere TGFβ-Expression verglichen mit statisch kultivierten Klappentaschen gemessen ( $p_{std} = 0,0226$ ;  $p_{deg} = 0,0326$ ).

E) Die HIF-1α-Genexpression lag nach BR-Kultur signifikant höher als nach statischer Kultur ( $p_{std} = 0,0064$ ;  $p_{deg} = 0,009$ ).

F) Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der VEGF-Expression nach siebentägiger Kultur verglichen mit nativen Proben ( $p_{std} = 0,0006$ ;  $p_{deg} = 0,007$ ).

### 3.5 Veränderungen auf Proteinebene

Zur Charakterisierung der Veränderungen auf Ebene der Proteinexpression wurden Western-Blots mit  $\alpha$ -Tubulin als Referenzgen durchgeführt. Es wurden die prodegenerativen Marker  $\alpha$ -SMA und OPN untersucht. Die Ergebnisse der Auswertungen sind Abb. 12 und Abb. 13 zu entnehmen.

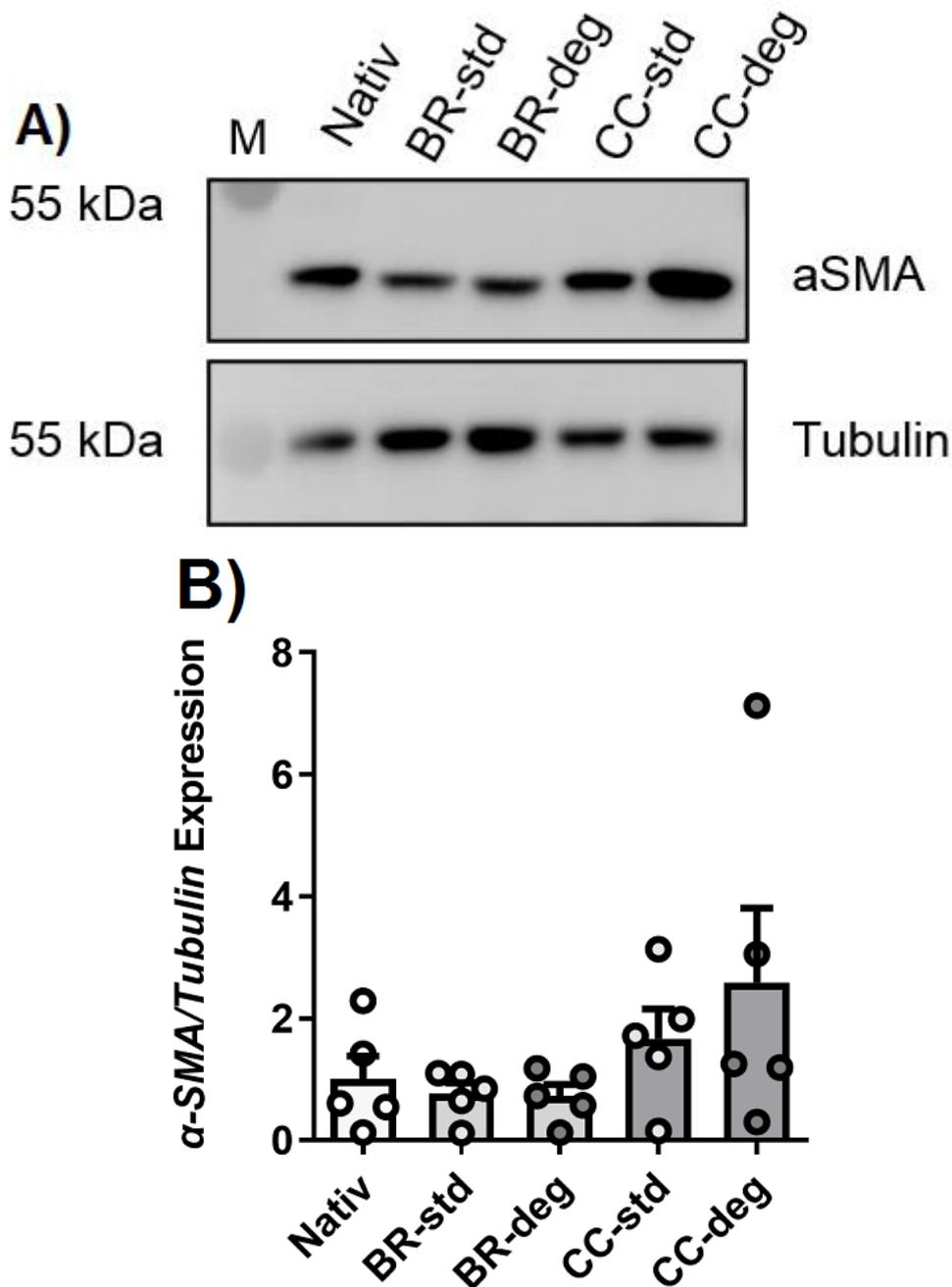
Hierbei zeigte sich keine signifikante Änderung der  $\alpha$ -SMA-Expression durch die Kultivierung, jedoch zeigte sich bei statisch kultivierten Aortenklappentaschen eine deutlich höhere Streuung der  $\alpha$ -SMA-Expression gegenüber nativen und im BR kultivierten Proben (s. Abb. 12).

Der Einfluss des OPN auf die Kalzifizierung hängt maßgeblich von posttranslationalen Modifikationen ab. So bewirkt eine Dephosphorylierung von OPN eine stärkere Biomineralisation und umgekehrt. Demnach ist nach der statischen bzw. BR Kultivierung tendenziell mit einer stärkeren Expression weiter aufgespaltener OPN-Fragmente zu rechnen, in nativen Klappentaschen wird mehr „full-length“-OPN erwartet. Letzteres wird stark phosphoryliert und glykosyliert, sodass es zu einem veränderten Molekulargewicht von ca. 55-70kDa kommt. Daneben kommt es durch die Transglutaminase 2 zur Bildung von OPN-Polymeren [65].

OPN wird von mehreren Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Thrombin in ein N-terminales (ca. 40kDa) und ein Integrin-bindendes C-terminales Fragment gespalten [66]. In vorangegangenen Studien konnte ein prokalzifizierender Effekt des N-terminalen OPN-Fragments nachgewiesen werden, während das C-terminale Fragment wahrscheinlich antiinflammatorisch wirksam ist [67, 68].

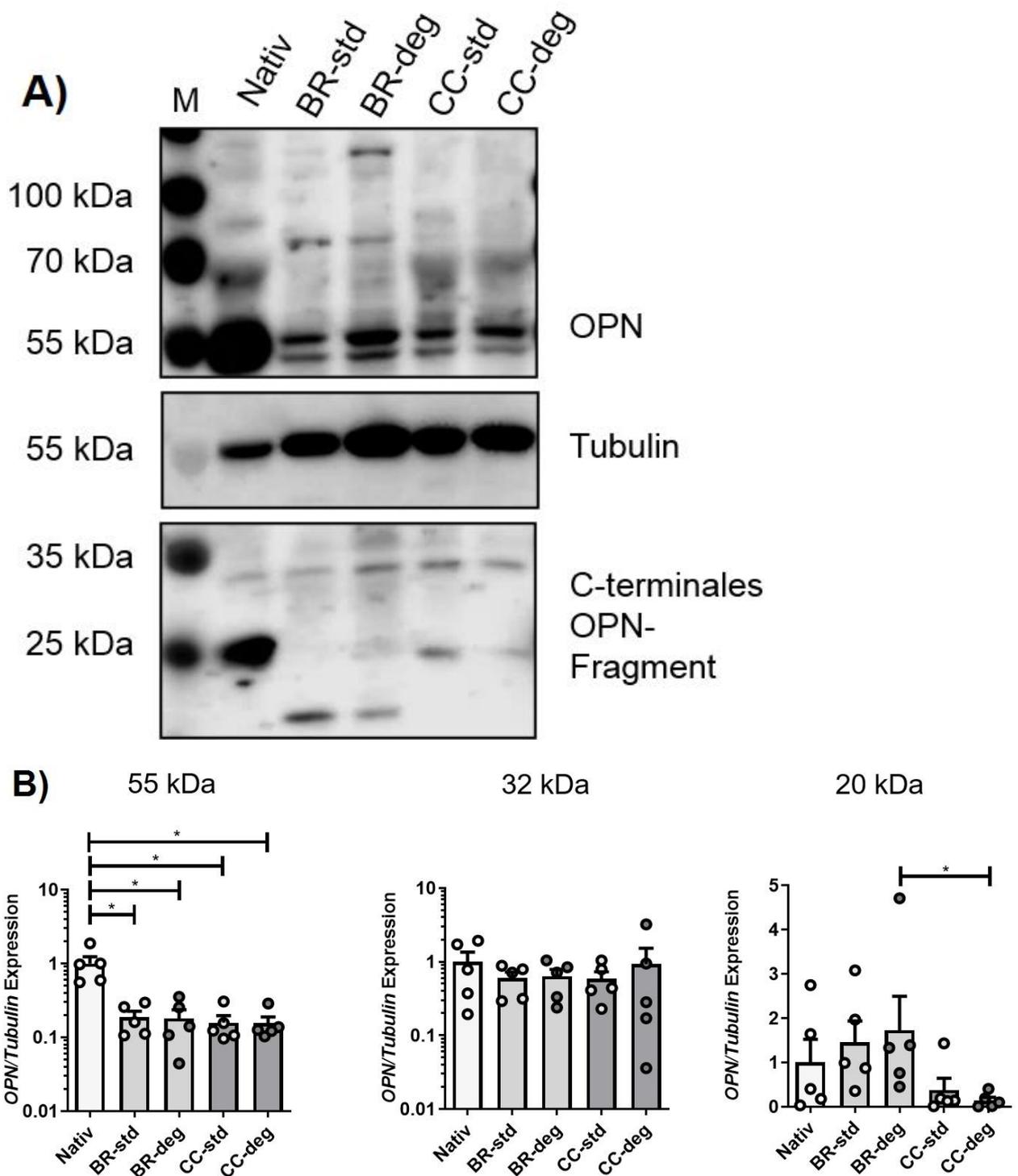
Bei der Untersuchung der OPN-Expression im Western-Blot zeigten sich mehrere Banden (Abb. 13). Es fanden sich intensive Banden bei 55kDa sowie schwächere Banden bei 70kDa und darüber. Hierbei fiel eine signifikant höhere Expression der 55kDa-Bande in nativen Proben gegenüber statisch und im BR kultivierten Proben sowohl in den Standard- als auch in den prodegenerativen Bedingungen auf (pstd = 0,0018; pdeg = 0,0024). Gleichzeitig zeigten sich bei der 32kDa-Bande des C-terminalen OPN-Fragments keine signifikante Veränderung zwischen nativen sowie im BR oder statisch kultivierten Klappentaschen (pstd = 0,8980; pdeg = 0,7359). Die Intensität der 15kDa-Bande des C-terminalen OPN-Fragments war in der BR-deg-Bedingung gegenüber der CC-deg-Bedingung signifikant erhöht (pdeg = 0,0214), es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zur nativen Kontrolle gemessen. Darüber hinaus zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Bedingungen mit

Standardmedium (pstd = 0,1226). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied aufgrund der verschiedenen Kulturmedien [64].



**Abb. 12: BR-Kultivierung führt zu verringerter  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression [64].** Es wurden Western-Blots mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -SMA und Tubulin als Ladungskontrolle durchgeführt.

In A) sind repräsentativ für  $n=5$  die Molekulargewichtsmarker (M) und Banden dargestellt. B) zeigt die Ergebnisse der Bandenintensitäts-Auswertung. Es kam der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Sterne markieren hierbei die Signifikanzniveaus im Dunns-Post-Test (\*  $p=0,05$ ). Es zeigte sich eine tendenzielle, insignifikante Abnahme der  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression nach BR-Kultur sowie eine geringere Streuung der Expression gegenüber statischer Kultur.



**Abb. 13: Einfluss der Kultivierung auf die OPN-Proteinexpression [64].** Es wurden Western-Blots mit Antikörpern gegen OPN und Tubulin als Ladungskontrolle durchgeführt.

In A) sind repräsentativ für  $n=5$  die Molekulargewichtsmarker (M) und Banden dargestellt. B) zeigt die Ergebnisse der Bandenintensitäts-Auswertung. Es kam der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Sterne markieren hierbei die Signifikanzniveaus im Dunns-Post-Test (\*  $p=0,05$ ). Es kam zu einer signifikant reduzierten Expression des 55kDa-OPN-Fragments nach statischer und BR-Kultur (pstd = 0,0018; pdeg = 0,0024). Bei der 32kDa-Bande fanden sich keine signifikanten Expressionsunterschiede (pstd = 0,8980; pdeg = 0,7359). Beim 15kDa-OPN-Fragment zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression in der BR-deg-Bedingung gegenüber der CC-deg-Bedingung (pdeg = 0,0214).

## 4. Diskussion

### 4.1 Fragestellung und Erweiterung der Methodik

Aufgrund mangelnder geeigneter Modelle ist der Einfluss dynamischer Druckveränderungen sowie Dehnungs-, Scher- und Biegestress auf die AKS bisher weitgehend unklar.

Das in dieser Arbeit verwendete BR-Modell wurde bereits durch Dr. Sabine Feichtner etabliert. So konnte durch histologische und immunhistologische Methoden die Biokompatibilität des Modells und eine erfolgreiche Biomineralisation nach siebentägiger Kultur demonstriert werden [63]

Auch die Vor- und Nachteile des in dieser Arbeit verwendeten BR-Modells sind im Wesentlichen bereits im Rahmen der Etablierung durch Dr. Sabine Feichtner dargestellt worden, sodass an dieser Stelle auf eine ausführliche Diskussion des BR-Modells an sich verzichtet werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte neben einer rein qualitativen Auswertung der Klappentaschen auch eine quantitative Auswertung der Taschendicke nach den verschiedenen Kulturbedingungen vorgenommen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten HE-Färbungen belegten die erhaltene strukturelle Integrität nach der Kultivierung, in den Movat-Färbungen ließ sich der Erhalt der Extrazellulärmembran sowie der Dreischichtigkeit der Präparate nachweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Dr. Feichtners Arbeit.

Durch die Von-Kossa-Färbung werden Kalziumablagerungen im Gewebe über einen Austausch von Kalziumionen gegen Silberionen angefärbt. So konnten nach BR-Kultur mit prodegenerativem Medium hauptsächlich in der Lamina ventricularis Kalziumablagerungen nachgewiesen werden [63].

Bei der Alizarin-Färbung dagegen lagert sich der Farbstoff Alizarinrot S als Chelat an Calciumablagerungen in Geweben an und bildet mit diesen Alizarinrot-S-Calcium. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Alizarin-Färbungen der Klappentaschen angefertigt. Hierbei fiel ebenfalls eine vornehmliche Ablagerung in der Lamina ventricularis auf, sodass hiermit die Ergebnisse meiner Vorgängerin verifiziert werden konnten.

Um den Einfluss der dynamischen Kultivierung im BR zu ermitteln, war zudem ein statisches Versuchsmodell nötig, das dem Versuchsaufbau im BR möglichst nahekommt.

Da Vorversuche mit isolierten Klappentaschen in der Alizarin-Färbung ein verzerrtes Biomineralisations-Muster entlang der Absetzungsränder zeigten, entschieden wir uns für eine statische Kultivierung ganzer Aortenklappen. Dazu wurden identisch zu den BR-Versuchen präparierte Aortenkonduits über sieben Tage in einem Zellkultur-Inkubator kultiviert (siehe Abschnitt 2.2.5). Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit das Aortenkonduit unter Erhalt der Aortenwurzel und der Koronararterien-Abgänge eingenäht. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da eine bestmögliche Nachbildung der Flussbedingungen *in vivo* angestrebt wurde. Im Gegensatz dazu wurde die Aortenwurzel durch Dr. Feichtner oberhalb der Klappenebene abgesetzt. Die Ergebnisse von Frau Dr. Feichtner ließen sich somit im Rahmen dieser Arbeit reproduzieren. Gleichzeitig konnte eine statische Kultivierung als Vergleichsmodell etabliert werden.

Weiterhin unklar bleibt der Einfluss der Kultivierung in dem hier genutzten BR-Modell auf die Gen- und Proteinexpression etablierter Biomarker der AKS. In dieser Arbeit wurde dieser Aspekt erstmalig untersucht. Die Ergebnisse weisen auf eine deutliche Veränderung der Gen- und Proteinexpression aufgrund der dynamischen Kultivierung im BR hin.

Abschließend lässt sich daher sagen, dass das gewählte System reproduzierbar ist, und dass sich die statische Kulturbedingung ebenfalls als stabile Kontrollbedingung erwiesen hat.

Obwohl sich nicht ausschließen lässt, dass es für andere Bereiche Effekte hat, zeigen diese Ergebnisse, dass unterschiedliche Experimentatoren und die modifizierte Handhabung keine gravierenden Effekte auf die Ergebnisse haben.

## 4.2 Beurteilung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Aortenklappenkalzifizierung in einem *ex-vivo*-Bioreaktor-Modell untersucht und anschließend mit statisch kultivierten und nativen Klappentaschen verglichen.

Die hierbei gewonnen Hauptkenntnisse sind folgende:

1. Die *ex-vivo*-Kultivierung im Bioreaktor erhält durch pulsatilem Fluss teilweise die physiologische Genexpression in den Aortenklappentaschen
2. Pulsatiler Fluss beeinflusst die Expression und post-translationelle Modifikation von Osteopontin

## 4.2.1 Makroskopie, Mikroskopie und Genexpression

Sowohl die statische als auch die BR-Kultivierung führen zu einer deutlichen Schrumpfung mit Dickenzunahme der Aortenklappentaschen verglichen mit nativen Taschen.

Darüber hinaus kommt es insbesondere durch die BR-Kultivierung zu signifikanten Veränderungen in der Genexpression wichtiger Biomarker der AKS. In dem hier verwendeten Modell verbleiben die Klappentaschen während der gesamten Kultivierung im Aortenkonduit, sodass möglichst physiologische Flussbedingungen sichergestellt werden.

In den histologischen Färbungen wurde ein Erhalt der physiologischen Dreischichtung nach siebentägiger Kultur gezeigt. Ansonsten blieben Veränderungen der feingeweblichen Struktur weitgehend aus. Insbesondere eine Veränderung der relativen Schichtdicken durch die Kultivierung konnte nicht beobachtet werden. Dies ist am ehesten auf die lediglich siebentägige Kultivierungsdauer zurückzuführen, da sich die AKS *in vivo* i.d.R. über Jahre entwickelt.

Neben der Verdickung der Klappentaschen kommt es nach statischer und BR-Kultur auch zu einer signifikant erhöhten Expression des Wachstumsfaktors VEGF, der eine wichtige Rolle in der Neovaskularisation einnimmt. Gesunde Aortenklappentaschen werden über Diffusion mit Sauerstoff versorgt, während es bei degenerativ veränderten Klappentaschen im Rahmen der AKS zu einer Neovaskularisation kommt. Es wird angenommen, dass dies auf lokale Hypoxie zurückzuführen ist [54, 64].

Studien zeigten, dass VEGF und HIF-1 $\alpha$  in erkrankten menschlichen Aortenklappen signifikant stärker exprimiert werden und die Expression hauptsächlich an Orten der Kalzifizierung stattfindet [53, 64]. Die verstärkte Expression von HIF-1 $\alpha$  findet jedoch in erster Linie auf Proteinebene statt, wo HIF-1 $\alpha$  unter Normoxie schnell abgebaut wird [64, 69].

Nach BR-Kultivierung zeigte sich im Vergleich mit statisch kultivierten Aortenklappentaschen eine signifikant höhere Genexpression von HIF-1 $\alpha$ , was auf einen Einfluss des pulsatilen Flusses hindeuten könnte. Jedoch zeigte sich in beiden Kulturbedingungen kein signifikanter Unterschied in der HIF-1 $\alpha$ -Genexpression gegenüber nativen Kontrollen, sodass allenfalls ein relativ kleiner Effekt zu erwarten ist. Ein ähnlicher Effekt konnte für die TGF $\beta$ -Genexpression beobachtet werden: Es kam zu einer signifikant höheren Expression nach BR-Kultur gegenüber statischer Kultur. Jedoch zeigte sich in keiner der beiden Bedingungen eine signifikante Veränderung gegenüber nativen Kontrollen. In vorangegangenen Studien wurde die Bedeutung von

TGF $\beta$  für die Neoangiogenese belegt, darüber hinaus beeinflusst TGF $\beta$  die VIC-Differenzierung und Umbauprozesse der EZM [64,70]. So bewirkt eine hohe TGF $\beta$ -Expression eine vermehrte Myofibroblasten-ähnliche Differenzierung von VICs *in vitro* [64,71]. Aktivierte Myofibroblasten wiederum verstärken die VEGF-Expression in humanen Aortenklappen [55]. Im Mausmodell konnte ein Zusammenhang zwischen pathologischem Scherstress und der TGF $\beta$ -Expression demonstriert werden [72]. Des Weiteren wurde auch in stenosierten humanen Aortenklappen eine erhöhte TGF $\beta$ -Expression gemessen [44, 73].

Das in dieser Arbeit verwendete BR-Modell konnte im Gegensatz zu vielen vorangehenden Modellen eine effektive Biomineralisation ohne die gezielte Zugabe von TGF $\beta$  erzielen. Es ist anzunehmen, dass dies mit einem Untergang von Endothelzellen durch die BR-Kultur zusammenhängen könnte, da hierdurch die der AKS zugrundeliegende Endothelläsion imitiert wird [63].

In den untersuchten Proben ließ sich insbesondere in der Lamina ventricularis eine Kalzifikation nachweisen, während in erkrankten humanen Aortenklappen gezeigt wurde, dass sich die Kalzifikation hauptsächlich auf die kollagenreiche Lamina fibrosa konzentriert und dort ihren Anfang nimmt [7, 74]. Diese Unterschiede könnten durch eine abweichende Scherstressbelastung im Bioreaktor hervorgerufen werden. Darüber hinaus zeigte sich eine tendenziell geringere Kalzifikation der statisch kultivierten Klappentaschen gegenüber den im BR kultivierten Proben. Dies ist womöglich auf die fehlende mechanische Belastung der Klappentaschen zurückzuführen.

Auch mechanische Stimuli allein könnten zur VIC-Aktivierung zu einem myofibroblastischen Phänotyp beitragen [6, 72]. In diesem Zustand weisen die VIC eine erhöhte  $\alpha$ -SMA-Expression auf. Isolierter Dehnungsstress verstärkt die  $\alpha$ -SMA-Expression, während Druckbelastung die  $\alpha$ -SMA-Expression reduziert [58, 64, 75, 76]. In einer vorangehenden Publikation zu einem Bioreaktor-Modell, das eine kombinierte Dehnungs- und Druckbelastung simuliert, wurde eine erniedrigte  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression festgestellt [58, 64].

In dem hier verwendeten Modell zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der  $\alpha$ -SMA-Expression nach BR- oder statischer Kultivierung. Jedoch zeigte sich eine breitere Streuung der  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression zwischen den Proben nach statischer Kultivierung. Daher könnte womöglich eine mechanosensible Regulation der  $\alpha$ -SMA-Expression vorliegen, wodurch es zu einer homogeneren Expression nach BR-Kultur ohne Beeinflussung der Gesamt-Expression kommt. Zur Prüfung dieser Hypothese sind jedoch weitere Studien nötig. Dass die Expression des Myofibroblasten-Biomarkers  $\alpha$ -SMA nach BR-Kultur gegenüber nativen Kontrollen unverändert bleibt, deckt sich also

mit den Ergebnissen für die TGF $\beta$ -Expression, wo ebenfalls keine signifikante Veränderung nach BR-Kultur gezeigt werden konnte.

Sowohl nach BR- als auch nach statischer Kultivierung kam es zu keiner Veränderung der ALP-Genexpression. ALP regt die Hydrolyse von anorganischem Pyrophosphat und  $\beta$ -GP an und stellt somit Phosphat für die Kalzifizierung bereit [64, 77]. In bisherigen 2D- und 3D-VIC-Kulturen zeigte sich eine Abnahme der ALP-Expression durch die Kultivierung [64, 78].

Im Gegensatz dazu zeigte sich im Rahmen des hier vorgestellten Modells keine signifikante Abnahme der ALP-Expression. Dieser Befund deckt sich im Wesentlichen mit einer vorangehenden Studie, die keine signifikante Veränderung der ALP-Genexpression in humanen erkrankten Aortenklappen zeigte [39]. Dies könnte auf einen weitgehenden Erhalt der ALP-Expression durch die dynamische BR-Kultivierung hindeuten.

Die Alpha1-Typ1-Kollagen-Expression blieb nach BR-Kultur weitgehend unverändert im Vergleich zu nativen Kontrollen, nahm jedoch nach statischer Kultivierung signifikant ab. Kollagen ist ein integraler Bestandteil der EZM, der dem Klappengewebe wichtige strukturelle und funktionelle Eigenschaften verleiht. Dazu zählen unter anderem die mechanische Stabilität und die Signaltransduktion. Dehnungsstress sowie zirkuläre und biaxiale Belastung regen die Kollagen-Expression an und verstärken die Ausrichtung der Kollagenfasern entlang der Belastungsrichtung [64, 75, 79, 80].

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass erkrankte humane Aortenklappen eine deutliche Zunahme der Kollagenfaserdichte und -anzahl in der Spongiosa aufweisen. Die Gesamtexpression an Kollagen änderte sich jedoch nicht signifikant im Vergleich mit gesunden Aortenklappen [56]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der ebenfalls keine signifikante Veränderung der Gesamtexpression nach BR-Kultur gemessen wurde. Daher stellt die mechanische Stimulation durch den pulsatilem Fluss wahrscheinlich die Ursache für den weitgehenden Erhalt der Kollagen-Expression nach BR-Kultur dar.

Der beobachtete Abfall der Kollagen-Expression nach statischer Kultur deckt sich mit den Ergebnissen ähnlicher statischer Modelle nach siebentägiger Kultur und ist am ehesten auf die fehlende mechanische Stimulation zurückzuführen [81].

In der Summe lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die dynamische *ex-vivo*-Kultivierung an sich für signifikante Genexpressions-Unterschiede zwischen statischer und BR-Kultur verantwortlich ist.

## 4.2.2 Pulsatiler Fluss und die Rolle von Osteopontin

In dieser Arbeit wurde die Expression von Osteopontin auf Genexpressionsebene gemessen und die Proteinexpression, sowohl des ganzen Proteins als auch der C-terminalen OPN-Fragmente, bestimmt. Das *full-length*-OPN wird stark phosphoryliert und glykosyliert, sodass es zu einem veränderten Molekulargewicht von ca. 55-70kDa kommt [64, 65]. Der Einfluss des OPN auf die Kalzifikation von Gefäßen variiert je nach Phosphorylierungsgrad [82]. Darüber hinaus verändert sich die Funktionsweise von OPN-Polymeren nach *Crosslinking* durch die Transglutaminase 2 [64, 82, 83].

In nativen Aortenklappentaschen zeigte sich eine deutlich stärkere Bandenintensität bei 55kDa als nach BR- und statischer Kultur, sodass von einer höheren Expression von *full-length*-OPN in nativen Taschen auszugehen ist.

Jedoch wird OPN von mehreren Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Thrombin in ein N-terminales und ein Integrin-bindendes C-terminales Fragment gespalten [64, 66]. Für das N-terminale OPN-Fragment wird eine prokalzifizierende Wirkung angenommen, während das C-terminale Fragment wahrscheinlich antiinflammatorisch wirkt [64, 67, 69].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das C-terminale OPN-Fragment (ca. 32kDa) keine signifikanten Unterschiede zwischen nativen, im BR und statisch kultivierten Proben gemessen.

Beim 15kDa-Fragment, einem weiter aufgespaltenen Fragment des C-terminalen OPN, kam es zu einer deutlich höheren Expression nach BR-Kultur. Es fiel eine signifikant höhere Bandenintensität für die prokalzifizierende BR-Bedingung gegenüber der prokalzifizierenden statischen Kultur auf. Aufgrund einer hohen Standardabweichung in den Vergleichsgruppen kam es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den entsprechenden Bedingungen mit Standardmedium, es fiel jedoch eine tendenziell niedrigere Expression nach statischer Kultur auf. In der Summe könnten diese Ergebnisse auf einen vermehrten OPN-Umsatz aufgrund der Kultivierung im BR hindeuten.

Während es nur zu einer leicht veränderten OPN-Proteinexpression kam, wurde die Genexpression stärker beeinflusst. Es zeigte sich eine signifikant höhere OPN-Expression nach BR-Kultur gegenüber nativen und statisch kultivierten Klappentaschen. Dies könnte ebenfalls auf einen vermehrten Umsatz durch die mechanische Belastung im BR zurückzuführen sein.

So zeigte eine Studie, die nicht-kalzifizierte mit kalzifizierten humanen Aortenklappen verglich, erhöhte OPN-RNA- und -Plasma-Level in den erkrankten Klappen, während

die OPN-Proteinexpression in den Proben signifikant erniedrigt war [64, 85]. Weitere Studien zeigten bereits eine verstärkte Expression von OPN und anderer Osteogenese-Marker nach mechanischer Belastung [86, 87], wodurch die ausbleibende Veränderung der OPN-Expression nach statischer Kultivierung erklärt werden könnte.

Es ist bekannt, dass sich OPN vermehrt an kalzifizierte Regionen der sklerosierten Aortenklappe anlagert, jedoch ist der Einfluss von OPN auf die AKS weiterhin unzureichend erforscht [88]. OPN bindet womöglich Apatitkristalle und wird als potenzieller Mineralisationsinhibitor betrachtet [64, 89]. So konnte in einer Studie *in vivo* gezeigt werden, dass es bei OPN-defizienten Mäusen zu einer deutlich stärkeren Aortenklappenkalzifizierung verglichen mit dem Wildtyp kommt [90]. Untersuchungen *in vitro* belegen ebenfalls eine protektive Rolle von OPN an Mäuseaorten [91]. Jedoch nimmt die OPN-Expression bei menschlichen Aortenklappen mit fortschreitender Kalzifizierung zu, was auf eine prodegenerative Wirkung hindeutet [92]. Es wird angenommen, dass Spleißvarianten und posttranslationale Modifikationen die Rolle von OPN für die Krankheitsprogression beeinflussen [64, 82, 88].

Aus diesem Grund sollte in weiteren Studien die Art und Weise der posttranslationalen OPN-Modifikation charakterisiert und der Einfluss der Kultivierung unter pulsatilem Fluss auf die Verdaumuster untersucht werden.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass prokalzifizierende Medien oder mechanische Belastung allein nicht ausreichend für die Kalzifikation von Aortenklappentaschen sind. Für eine signifikante Aortenklappenkalzifizierung müssen demnach beide Faktoren vorliegen [64, 87].

Eine weitere Studie liefert Hinweise darauf, dass auch die Interaktion zwischen mechanischer Belastung und Entzündungsprozessen von zentraler Bedeutung für die osteogene VIC-Differenzierung ist [64, 93].

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Rolle von OPN in der AKS noch nicht ausreichend erforscht ist, das hier verwendete Bioreaktor-Modell jedoch aufgrund der dynamischen Kultivierung einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Pathophysiologie leisten könnte. Hierzu sind weitere Studien nötig.

### 4.3 Eignung und Limitationen der angewandten Methoden

Im gewählten Versuchsaufbau konnten einige potenzielle Störvariablen nicht eliminiert werden. So stellen ovine Aortenklappen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu menschlichen Aortenklappen ein beliebtes Modell für Versuche *in vivo* und *ex vivo* dar. Die Anwendbarkeit der in diesen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen

ist jedoch nur eingeschränkt möglich, sodass zur abschließenden Klärung weitere Studien an humanem Gewebe vonnöten sind [59].

Zudem wurden die Schafsherzen zwar unmittelbar nach der Schlachtung tiefgekühlt in das Labor transportiert und schnellstmöglich präpariert, jedoch verstrichen im Durchschnitt ca. anderthalb bis zwei Stunden zwischen Schlachtung und BR- bzw. statischer Kultur.

Darüber hinaus ist aufgrund der Bezugsquelle der Herzen nicht sicher auszuschließen, dass die Spendertiere Altersunterschiede aufweisen oder verschiedenen Schafsrassen angehören. Es kann auch keine Aussage zu Fütterung, Gewicht und Gesundheitszustand der Schafe zum Zeitpunkt der Schlachtung getroffen werden.

Um die Aussagekraft der qPCR- und Western-Blot-Versuche zu erhöhen, flossen auch von Dr. Sabine Feichtner generierte BR-Proben in die Wertung mit ein. Diese wurden jedoch, wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, leicht abweichend kultiviert, sodass es auch hierdurch zu Verzerrungen kommen kann.

## 4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Effekt der BR-Kultivierung auf die Genexpression des Hypoxiemarkers HIF-1 $\alpha$  sowie seines Zielgens VEGF beobachtet. Da auch hypoxische Kulturbedingungen im hier verwendeten Modell darstellbar sind, könnte dieser Aspekt der Aortenklappendegeneration in weiteren Studien untersucht werden. Hierzu sind weitere Studien in unserer Forschungsgruppe geplant.

Diabetes Mellitus ist seit vielen Jahren als wichtiger Risikofaktor der AKS belegt [14]. In einer weiteren Arbeit aus unserer Forschungsgruppe, die auf den hier dargestellten Ergebnissen aufbaut, wurden der Einfluss von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie auf die Aortenklappendegeneration im BR-Modell sowie nach statischer Kultivierung untersucht [94].

In vorangehenden Studien konnte gezeigt werden, dass für eine signifikante Aortenklappenkalzifizierung neben prokalzifizierenden Medien auch mechanische Belastung und Entzündungsprozesse entscheidend sind [87, 93]. Das in dieser Arbeit vorgestellte BR-Modell könnte in zukünftigen Studien zur Untersuchung dieser Zusammenhänge genutzt werden, indem bspw. pro-inflammatorische Substanzen wie Lipopolysaccharide dem Kulturmedium zugegeben werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das in dieser Arbeit verwendete BR-Modell AKS-typische Veränderungen auf Gen- und Proteinebene hervorruft und sich durch einen Erhalt der physiologischen Gewebemorphologie sowie des Kollagengehalts

auszeichnet. In weiteren Studien kann somit ein Beitrag zur AKS-Ursachenforschung geleistet werden.

## 5. Literatur

1. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J (2020) Duale Reihe Anatomie, 5. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
2. Sacks MS, David Merryman W, Schmidt DE (2009) On the biomechanics of heart valve function. *J Biomech* 42(12):1804–1824. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.05.015
3. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie, 6. Aufl. Thieme, Stuttgart
4. Rozeik M, Wheatley D, Gourlay T (2014) The aortic valve: structure, complications and implications for transcatheter aortic valve replacement. *Perfusion* 29(4):285–300. doi:10.1177/0267659114521650
5. Arjunon S, Rathan S, Jo H, Yoganathan AP (2013) Aortic valve: mechanical environment and mechanobiology. *Ann Biomed Eng* 41(7):1331–1346. doi:10.1007/s10439-013-0785-7
6. Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, Bogdanova M, Kostareva A, Stensløkken K-O, Fiane A, Vaage J (2017) Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc* 6(9). doi:10.1161/JAHA.117.006339
7. Lindman BR, Clavel M-A, Mathieu P, Lung B, Lancellotti P, Otto CM, Pibarot P (2016) Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* 2:16006. doi:10.1038/nrdp.2016.6
8. Hasan A, Ragaert K, Swieszkowski W, Selimović S, Paul A, Camci-Unal G, Mofrad MRK, Khademhosseini A (2014) Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs. *J Biomech* 47(9):1949–1963. doi:10.1016/j.jbiomech.2013.09.023
9. Statistisches Bundesamt (2020) Todesursachen in Deutschland 2019. [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html). Zugegriffen: 27. August 2021
10. Statistisches Bundesamt (2020) Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>. Zugegriffen: 27. August 2021
11. Statistisches Bundesamt (2019) Bevölkerung im Wandel. Annahmen und Ergebnisse der 14. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung. <https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressekonferenzen/2019/Bevoelkerung/presse>

broschuere-bevoelkerung.pdf?\_\_blob=publicationFile. Zugegriffen: 04. November 2020

12. Lindroos M, Kupari M, Heikkilä J, Tilvis R (1993) Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol* 21(5):1220–1225. doi:10.1016/0735-1097(93)90249-z
13. Herold G (2019) *Innere Medizin 2019*. De Gruyter
14. Lindroos M, Kupari M, Valvanne J, Strandberg T, Heikkilä J, Tilvis R (1994) Factors associated with calcific aortic valve degeneration in the elderly. *Eur Heart J* 15(7):865–870. doi:10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a060602
15. Freeman RV, Otto CM (2005) Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 111(24):3316–3326. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.486738
16. Czarny MJ, Resar JR (2014) Diagnosis and Management of Valvular Aortic Stenosis. *Clin Med Insights Cardiol* 8(Suppl 1):15–24. doi:10.4137/CMC.S15716
17. Brown J, Morgan-Hughes NJ (2005) Aortic stenosis and non-cardiac surgery. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 5(1):1–4. doi:10.1093/bjaceaccp/mki001
18. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, Bonis M de, Hamm C, Holm PJ, Jung B, Lancellotti P, Lansac E, Rodriguez Muñoz D, Rosenhek R, Sjögren J, Tornos Mas P, Vahanian A, Walther T, Wendler O, Windecker S, Zamorano JL (2017) 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J* 38(36):2739–2791. doi:10.1093/eurheartj/ehx391
19. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 18(8):891–975. doi:10.1002/ejhf.592
20. Synetos A, Toutouzas K, Drakopoulou M, Koutagiar I, Benetos G, Kotronias R, Anousakis-Vlachochristou N, Latsios G, Karanasos A, Agrogiannis G, Metaxas M, Stathogiannis K, Papanikolaou A, Georgakopoulos A, Pianou N, Tsiamis E, Patsouris E, Papalois A, Cokkinos D, Anagnostopoulos C, Tousoulis D (2018) Inhibition of Aortic Valve Calcification by Local Delivery of Zoledronic Acid-an

Experimental Study. *J Cardiovasc Transl Res* 11(3):192–200. doi:10.1007/s12265-018-9802-4

21. Price PA, Faus SA, Williamson MK (2001) Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(5):817–824. doi:10.1161/01.ATV.21.5.817
22. Lindman BR, Zajarias A, Madrazo JA, Shah J, Gage BF, Novak E, Johnson SN, Chakinala MM, Hohn TA, Saghir M, Mann DL (2012) Effects of Phosphodiesterase Type 5 Inhibition on Systemic and Pulmonary Hemodynamics and Ventricular Function in Patients with Severe Symptomatic Aortic Stenosis. *Circulation* 125(19):2353–2362. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.081125
23. Thanassoulis G (2016) Lipoprotein (a) in calcific aortic valve disease: from genomics to novel drug target for aortic stenosis. *J Lipid Res* 57(6):917–924. doi:10.1194/jlr.R051870
24. Tsimikas S, Viney NJ, Hughes SG, Singleton W, Graham MJ, Baker BF, Burkey JL, Yang Q, Marcovina SM, Geary RS, Crooke RM, Witztum JL (2015) Antisense therapy targeting apolipoprotein(a): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 study. *Lancet* 386(10002):1472–1483. doi:10.1016/S0140-6736(15)61252-1
25. Delesalle G, Bohbot Y, Rusinaru D, Delpierre Q, Maréchaux S, Tribouilloy C (2019) Characteristics and Prognosis of Patients With Moderate Aortic Stenosis and Preserved Left Ventricular Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc* 8(6):e011036. doi:10.1161/JAHA.118.011036
26. Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, Maurer G, Baumgartner H (2000) Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med* 343(9):611–617. doi:10.1056/NEJM200008313430903
27. Ross J, Braunwald E (1968) Aortic stenosis. *Circulation* 38(1 Suppl):61–67. doi:10.1161/01.cir.38.1s5.v-61
28. Eugène M, Urena M, Abtan J, Carrasco J-L, Ghodbane W, Nataf P, Vahanian A, Himbert D (2018) Effectiveness of Rescue Percutaneous Balloon Aortic Valvuloplasty in Patients With Severe Aortic Stenosis and Acute Heart Failure. *Am J Cardiol* 121(6):746–750. doi:10.1016/j.amjcard.2017.11.048
29. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Guyton RA, O'Gara PT, Ruiz CE, Skubas NJ, Sorajja P, Sundt TM, Thomas JD (2014) 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart

- Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 129(23):2440–2492. doi:10.1161/CIR.0000000000000029
30. Rodriguez-Gabella T, Voisine P, Puri R, Pibarot P, Rodés-Cabau J (2017) Aortic Bioprosthetic Valve Durability: Incidence, Mechanisms, Predictors, and Management of Surgical and Transcatheter Valve Degeneration. *J Am Coll Cardiol* 70(8):1013–1028. doi:10.1016/j.jacc.2017.07.715
  31. Tuzcu EM, Kapadia SR, Vemulapalli S, Carroll JD, Holmes DR, Mack MJ, Thourani VH, Grover FL, Brennan JM, Suri RM, Dai D, Svensson LG (2018) Transcatheter Aortic Valve Replacement of Failed Surgically Implanted Bioprostheses: The STS/ACC Registry. *J Am Coll Cardiol* 72(4):370–382. doi:10.1016/j.jacc.2018.04.074
  32. Dvir D, Webb JG, Bleiziffer S et al (2014) Transcatheter aortic valve implantation in failed bioprosthetic surgical valves. *JAMA* 312(2):162–170. doi:10.1001/jama.2014.7246
  33. Haverich A (Hrsg) (2017) *Cardiac surgery - operations on the heart and great vessels in adults and c.* Springer-verlag Berlin And Hei
  34. Beckmann A, Meyer R, Lewandowski J, Markewitz A, Gummert J (2020) German Heart Surgery Report 2019: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 68(4):263–276. doi:10.1055/s-0040-1710569
  35. Sathananthan J, Lauck S, Polderman J, Yu M, Stephenson A, Sathananthan G, Moss R, Cheung A, Ye J, Blanke P, Leipsic J, Wood DA, Webb JG (2020) Ten year follow-up of high-risk patients treated during the early experience with transcatheter aortic valve replacement. *Catheter Cardiovasc Interv.* doi:10.1002/ccd.29124
  36. Blackman DJ, Saraf S, MacCarthy PA et al (2019) Long-Term Durability of Transcatheter Aortic Valve Prostheses. *J Am Coll Cardiol* 73(5):537–545. doi:10.1016/j.jacc.2018.10.078
  37. Ross DN (1962) Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 2(7254):487. doi:10.1016/s0140-6736(62)90345-8
  38. Laudito A, Brook MM, Suleman S, Bleiweis MS, Thompson LD, Hanley FL, Reddy VM (2001) The Ross procedure in children and young adults: a word of caution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122(1):147–153. doi:10.1067/mtc.2001.113752
  39. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T (2003) Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 107(17):2181–2184. doi:10.1161/01.CIR.0000070591.21548.69

40. Beppu S, Suzuki S, Matsuda H, Ohmori F, Nagata S, Miyatake K (1993) Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves. *Am J Cardiol* 71(4):322–327. doi:10.1016/0002-9149(93)90799-i
41. Little PJ, Ballinger ML, Burch ML, Osman N (2008) Biosynthesis of Natural and Hyperelongated Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans: New Insights into an Elusive Process. *Open Biochem J* 2:135–142. doi:10.2174/1874091X00802010135
42. Marquis-Gravel G, Redfors B, Leon MB, Généreux P (2016) Medical Treatment of Aortic Stenosis. *Circulation* 134(22):1766–1784. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023997
43. Mahmut A, Boulanger M-C, El Hussein D, Fournier D, Bouchareb R, Després J-P, Pibarot P, Bossé Y, Mathieu P (2014) Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization. *J Am Coll Cardiol* 63(5):460–469. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.105
44. Osman N, Grande-Allen KJ, Ballinger ML, Getachew R, Marasco S, O'Brien KD, Little PJ (2013) Smad2-dependent glycosaminoglycan elongation in aortic valve interstitial cells enhances binding of LDL to proteoglycans. *Cardiovasc Pathol* 22(2):146–155. doi:10.1016/j.carpath.2012.07.002
45. Stewart B, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM (1997) 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. *J Am Coll Cardiol* 29(3):630–634. doi:10.1016/s0735-1097(96)00563-3
46. Glader C (2003) Lipoprotein(a), Chlamydia pneumoniae, leptin and tissue plasminogen activator as risk markers for valvular aortic stenosis. *Eur Heart J* 24(2):198–208. doi:10.1016/S0195-668X(02)00385-8
47. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG (2014) Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *J Am Coll Cardiol* 63(5):470–477. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.038
48. Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dubé M-P, Rhéaume E, Wareham NJ, Khaw K-T, Sandhu MS, Tardif J-C (2014) Lipoprotein(a) levels, genotype, and incident aortic valve stenosis: a prospective Mendelian randomization study and replication in a case-control cohort. *Circ Cardiovasc Genet* 7(3):304–310. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000400

49. Mathieu P, Voisine P, Pépin A, Shetty R, Savard N, Dagenais F (2005) Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis* 14(3):353–357
50. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF (2005) Spatial Heterogeneity of Endothelial Phenotypes Correlates With Side-Specific Vulnerability to Calcification in Normal Porcine Aortic Valves. *Circ Res* 96(7):792–799. doi:10.1161/01.RES.0000161998.92009.64
51. Strickberger SA, Schulman SP, Hutchins GM (1987) Association of Paget's disease of bone with calcific aortic valve disease. *The American Journal of Medicine* 82(5):953–956. doi:10.1016/0002-9343(87)90157-4
52. Ureña P, Malergue MC, Goldfarb B, Prieur P, Guédon-Rapoud C, Pétrover M (1999) Evolutive aortic stenosis in hemodialysis patients: analysis of risk factors. *Nephrologie* 20(4):217–225
53. Perrotta I, Moraca FM, Sciangula A, Aquila S, Mazzulla S (2015) HIF-1 $\alpha$  and VEGF: Immunohistochemical Profile and Possible Function in Human Aortic Valve Stenosis. *Ultrastruct Pathol* 39(3):198–206. doi:10.3109/01913123.2014.991884
54. Soini Y, Salo T, Satta J (2003) Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol* 34(8):756–763. doi:10.1016/s0046-8177(03)00245-4
55. Syväranta S, Helske S, Laine M, Lappalainen J, Kupari M, Mäyränpää MI, Lindstedt KA, Kovanen PT (2010) Vascular endothelial growth factor-secreting mast cells and myofibroblasts: a novel self-perpetuating angiogenic pathway in aortic valve stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(6):1220–1227. doi:10.1161/ATVBAHA.109.198267
56. Hutson HN, Marohl T, Anderson M, Eliceiri K, Campagnola P, Masters KS (2016) Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture. *PLoS One* 11(9):e0163858. doi:10.1371/journal.pone.0163858
57. Paranya G, Vineberg S, Dvorin E, Kaushal S, Roth SJ, Rabkin E, Schoen FJ, Bischoff J (2001) Aortic Valve Endothelial Cells Undergo Transforming Growth Factor- $\beta$ -Mediated and Non-Transforming Growth Factor- $\beta$ -Mediated Transdifferentiation in Vitro. *The American Journal of Pathology* 159(4):1335–1343. doi:10.1016/s0002-9440(10)62520-5
58. Thayer P, Balachandran K, Rathan S, Yap CH, Arjunon S, Jo H, Yoganathan AP (2011) The effects of combined cyclic stretch and pressure on the aortic valve

- interstitial cell phenotype. *Ann Biomed Eng* 39(6):1654–1667. doi:10.1007/s10439-011-0273-x
59. Bowler MA, Merryman WD (2015) In vitro models of aortic valve calcification: solidifying a system. *Cardiovasc Pathol* 24(1):1–10. doi:10.1016/j.carpath.2014.08.003
60. Kheradvar A, Zareian R, Kawauchi S, Goodwin RL, Rugonyi S (2017) Animal Models for Heart Valve Research and Development. *Drug Discov Today Dis Models* 24:55–62. doi:10.1016/j.ddmod.2018.04.001.
61. Sider KL, Blaser MC, Simmons CA (2011) Animal models of calcific aortic valve disease. *Int J Inflam* 2011:364310. doi:10.4061/2011/364310
62. Aubin S (2014) Etablierung und Charakterisierung eines voll automatisierten computergesteuerten Bioreaktors zur Rebesiedelung von dezellularisierten Herzklappen mit Endothelzellen unter physiologischen Parametern und Flussbedingungen. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität
63. Feichtner S (2019) Etablierung und Charakterisierung eines voll automatisierten computergesteuerten Bioreaktors zur artifiziellen Kalzifizierung von ovinen Aortenklappen unter physiologischen Parametern und Flussbedingungen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität
64. Niazy N, Barth M, Selig JI, Feichtner S, Shakiba B, Candan A, Albert A, Preuß K, Lichtenberg A, Akhyari P (2021) Degeneration of Aortic Valves in a Bioreactor System with Pulsatile Flow. *Biomedicines* 9(5):462. doi:10.3390/biomedicines9050462
65. Christensen B, Nielsen MS, Haselmann KF, Petersen TE, Sørensen ES (2005) Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem J* 390(Pt 1):285–292. doi:10.1042/BJ20050341
66. Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L (2001) Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem* 276(30):28261–28267. doi:10.1074/jbc.M103608200
67. Wolak T, Sion-Vardi N, Novack V, Greenberg G, Szendro G, Tarnovscki T, Nov O, Shelef I, Paran E, Rudich A (2013) N-terminal rather than full-length osteopontin or its C-terminal fragment is associated with carotid-plaque inflammation in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 26(3):326–333. doi:10.1093/ajh/hps043
68. Maeda K, Takahashi K, Takahashi F, Tamura N, Maeda M, Kon S, Uede T, Fukuchi Y (2001) Distinct roles of osteopontin fragments in the development of the

- pulmonary involvement in sarcoidosis. *Lung* 179(5):279–291.  
doi:10.1007/s004080000068
69. Lim CS, Kiriakidis S, Sandison A, Paleolog EM, Davies AH (2013) Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. *J Vasc Surg* 58(1):219–230.  
doi:10.1016/j.jvs.2013.02.240
70. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA (2004) Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res* 95(3):253–260. doi:10.1161/01.RES.0000136520.07995.aa
71. Liu AC, Gotlieb AI (2008) Transforming growth factor-beta regulates in vitro heart valve repair by activated valve interstitial cells. *The American Journal of Pathology* 173(5):1275–1285. doi:10.2353/ajpath.2008.080365
72. Wang W, Vootukuri S, Meyer A, Ahamed J, Collier BS (2014) Association between shear stress and platelet-derived transforming growth factor- $\beta$ 1 release and activation in animal models of aortic valve stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(9):1924–1932. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303852
73. Jian B, Narula N, Li Q, Mohler ER, Levy RJ (2003) Progression of aortic valve stenosis: TGF- $\beta$ 1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *The Annals of Thoracic Surgery* 75(2):457–465. doi:10.1016/S0003-4975(02)04312-6
74. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS (2001) Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103(11):1522–1528. doi:10.1161/01.CIR.103.11.1522
75. Balachandran K, Konduri S, Sucosky P, Jo H, Yoganathan AP (2006) An ex vivo study of the biological properties of porcine aortic valves in response to circumferential cyclic stretch. *Ann Biomed Eng* 34(11):1655–1665. doi:10.1007/s10439-006-9167-8
76. Xing Y, Warnock JN, He Z, Hilbert SL, Yoganathan AP (2004) Cyclic pressure affects the biological properties of porcine aortic valve leaflets in a magnitude and frequency dependent manner. *Ann Biomed Eng* 32(11):1461–1470. doi:10.1114/b:abme.0000049031.07512.11
77. Schoppet M, Shanahan CM (2008) Role for alkaline phosphatase as an inducer of vascular calcification in renal failure? *Kidney Int* 73(9):989–991. doi:10.1038/ki.2008.104
78. Weber A, Barth M, Selig JI, Raschke S, Dakaras K, Hof A, Hesse J, Schrader J, Lichtenberg A, Akhyari P (2018) Enzymes of the purinergic signaling system exhibit

- diverse effects on the degeneration of valvular interstitial cells in a 3-D microenvironment. *FASEB J* 32(8):4356–4369. doi:10.1096/fj.201701326R
79. Farrar EJ, Pramil V, Richards JM, Mosher CZ, Butcher JT (2016) Valve interstitial cell tensional homeostasis directs calcification and extracellular matrix remodeling processes via RhoA signaling. *Biomaterials* 105:25–37. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.07.034
80. Gould RA, Chin K, Santisakultarm TP, Dropkin A, Richards JM, Schaffer CB, Butcher JT (2012) Cyclic strain anisotropy regulates valvular interstitial cell phenotype and tissue remodeling in three-dimensional culture. *Acta Biomater* 8(5):1710–1719. doi:10.1016/j.actbio.2012.01.006
81. Weber A, Pfaff M, Barth M, Lichtenberg A, Akhyari P (2018) Role of VEGF Receptors in the Degeneration Process of Aortic Valves. *Thorac Cardiovasc Surg* 66(S 01):S1-S110. doi:10.1055/s-0038-1627846
82. Jono S, Peinado C, Giachelli CM (2000) Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 275(26):20197–20203. doi:10.1074/jbc.M909174199
83. Nishimichi N, Hayashita-Kinoh H, Chen C, Matsuda H, Sheppard D, Yokosaki Y (2011) Osteopontin undergoes polymerization in vivo and gains chemotactic activity for neutrophils mediated by integrin alpha9beta1. *J Biol Chem* 286(13):11170–11178. doi:10.1074/jbc.M110.189258
84. Higashikawa F, Eboshida A, Yokosaki Y (2007) Enhanced biological activity of polymeric osteopontin. *FEBS Lett* 581(14):2697–2701. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.018
85. Passmore M, Nataatmadja M, Fung YL, Pearse B, Gabriel S, Tesar P, Fraser JF (2015) Osteopontin alters endothelial and valvular interstitial cell behaviour in calcific aortic valve stenosis through HMGB1 regulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 48(3):e20-9. doi:10.1093/ejcts/ezv244
86. Lehmann S, Walther T, Kempfert J, Rastan A, Garbade J, Dhein S, Mohr FW (2009) Mechanical strain and the aortic valve: influence on fibroblasts, extracellular matrix, and potential stenosis. *The Annals of Thoracic Surgery* 88(5):1476–1483. doi:10.1016/j.athoracsur.2009.07.025
87. Balachandran K, Sucusky P, Jo H, Yoganathan AP (2010) Elevated cyclic stretch induces aortic valve calcification in a bone morphogenetic protein-dependent manner. *The American Journal of Pathology* 177(1):49–57. doi:10.2353/ajpath.2010.090631
88. Grau JB, Poggio P, Sainger R, Vernick WJ, Seefried WF, Branchetti E, Field BC, Bavaria JE, Acker MA, Ferrari G (2012) Analysis of osteopontin levels for the

- identification of asymptomatic patients with calcific aortic valve disease. *The Annals of Thoracic Surgery* 93(1):79–86. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.08.036
89. Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D (2014) Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab* 3(4):384–393. doi:10.1016/j.molmet.2014.03.004
90. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM (2002) Osteopontin Inhibits Mineral Deposition and Promotes Regression of Ectopic Calcification. *The American Journal of Pathology* 161(6):2035–2046. doi:10.1016/S0002-9440(10)64482-3
91. Speer MY, Chien Y-C, Quan M, Yang H-Y, Vali H, McKee MD, Giachelli CM (2005) Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification in vitro. *Cardiovasc Res* 66(2):324–333. doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.023
92. Pohjolainen V, Taskinen P, Soini Y, Rysä J, Ilves M, Juvonen T, Ruskoaho H, Leskinen H, Satta J (2008) Noncollagenous bone matrix proteins as a part of calcific aortic valve disease regulation. *Hum Pathol* 39(11):1695–1701. doi:10.1016/j.humpath.2008.04.015
93. Bogdanova M, Kostina A, Zihlavnikova Enayati K, Zabirnyk A, Malashicheva A, Stensløkken K-O, Sullivan GJ, Kaljusto M-L, Kvitting J-P, Kostareva A, Vaage J, Rutkovskiy A (2018) Inflammation and Mechanical Stress Stimulate Osteogenic Differentiation of Human Aortic Valve Interstitial Cells. *Front Physiol* 9:1635. doi:10.3389/fphys.2018.01635
94. Selig JI, Boulgaropoulos J, Niazy N, Ouwens DM, Preuß K, Horn P, Westenfeld R, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M (2021) Crosstalk of Diabetic Conditions with Static Versus Dynamic Flow Environment-Impact on Aortic Valve Remodeling. *Int J Mol Sci* 22(13):6976. doi:10.3390/ijms22136976

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Payam Akhyari für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie anzufertigen und die ausgezeichnete Betreuung über die gesamte Dauer meines Forschungsprojekts.

Besonders danken möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Naima Niazy, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie stand mir bei Fragen stets zur Seite und hat diese Arbeit maßgeblich geprägt.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie für die Einarbeitung und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Forschungslabor bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich auf meinem gesamten Lebensweg unterstützt haben. Sie haben mir das Medizinstudium und den Abschluss meiner Dissertation erst ermöglicht.