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

Einfluss von PPARy auf die Degeneration kardiovaskulärer Implantate

**Dissertation** 

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

vorgelegt von

Daniel Goschmer

2023

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

gez.: Daniel Goschmer Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Payam Akhyari Zweitgutacher/in: Prof. Dr. Dr. med. Christian Jung

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Anna Kathrin Assmann, Daniel Goschmer, Yukiharu Sugimura, Agunda Chekhoeva, Mareike Barth, Alexander Assmann, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, (2021), A Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists in Counteracting the Degeneration of Cardiovascular Grafts. Journal of Cardiovascular Pharmacology 79 (01): e103-e115.

#### Zusammenfassung

Der Aortenklappenersatz ist bei hochgradigen Aortenklappenstenosen ein Standardverfahren der modernen Herzchirurgie und Kardiologie. Jedoch haben die klinisch verfügbaren biologischen Aortenklappenprothesen zahlreiche Limitationen. Insbesondere bei jüngeren Patienten kommt es nach Implantation einer biologischen Prothese vermehrt zu einer fortschreitenden Kalzifizierung und damit einhergehender Degeneration des Implantats mit Funktionsverlust. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon, ein Agonist von Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPARy), die Degeneration nativer Aortenklappen reduzieren konnte. Die Beeinflussung der inflammatorischen und degenerativen Veränderungen an kardiovaskulären Implantaten ist jedoch im Zusammenhang mit Pioglitazon noch ungeklärt. Ziel dieser Studie ist es, den Effekt von PPARy auf die *in vivo* Degeneration von einem bereits etablierten Rattenmodell der heterotopen Bioprothesen in Aortenklappenimplantation unter normal diätetischen Bedingungen zu untersuchen.

Aus Sprague-Dawley-Ratten wurden aortenklappentragende Konduits entnommen und kryokonserviert. Die allogenen Konduits (n=40) wurden dann in Wistar-Ratten in die *infrarenale Aorta abdominalis* implantiert. Einem Teil der Wistar-Ratten wurde Futter mit Pioglitazon verabreicht (75mg/kg Futter; n=20, PIO-Gruppe), dem anderen Teil Standardfutter ohne weitere Zusätze (n=20, Kontrollgruppe). Die Konduits wurden nach 4 (Kurzzeitversuch) bzw. 12 Wochen (Langzeitversuch) explantiert und mittels histologischer, immunhistologischer Methoden und qPCR ausgewertet.

Unter Pioglitazon zeigte sich eine signifikante Reduktion von inflammatorischen Markern: Die Makrophagen-vermittelte Inflammation, gemessen an CD68-positiven Zellen, war in der PIO-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert sowohl nach 4 Wochen (p=0,0303) als auch nach 12 Wochen (p=0,0122). Der osteochondrogene Umbau, der mit einer Syndecan-3 Färbung nachgewiesen wurde, war in der PIO-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle nach 12 Wochen signifikant reduziert (p=0,001). Die Kalzifizierung wurde mittels eines *von-Kossa-Scores* erfasst. Sowohl die Kalzifizierung der Intima wie auch der Media konnte nach 12 Wochen in der PIO-Gruppe signifikant gesenkt werden (Intima: p=0,075; Media: p=0,0245). Echokardiographisch konnte nach 12 Wochen eine signifikant bessere Funktionalität der implantierten Klappe in der PIO-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (p=0,0012). Entgegen den Erwartungen zeigte sich in der PIO-Gruppe nach 12 Wochen eine signifikant höhere Intimahyperplasie im Vergleich zur Kontrolle (p=0,0165).

Die systemische PPAR<sub>Y</sub>-Aktivierung beugt inflammatorischen Prozesen vor und reduziert die Kalzifizierung der aortenklappentragenden Konduits. Auch die Dopplersonografie konnte zeigen, dass der Funktionsverlust durch Degeneration der Implantate unter der Pioglitazon Therapie deutlich reduziert werden konnte. Um weitere Informationen über die therapeutische Wirksamkeit auf biologische Klappenprothesen durch die Regulierung des PPAR<sub>Y</sub> in Hinblick auf die Haltbarkeit, Intimahyperplasie und degenerative Prozesse zu erhalten, bedarf es sicherlich weiterer translationaler Studien.

#### Abstract

Aortic valve replacement is a standard procedure in modern cardiac surgery and cardiology for high-grade aortic valve stenosis. However, the clinically available biological aortic valve prostheses have numerous limitations. After the implantation of a biological prosthesis, especially in younger patients, progressive calcification and the associated degeneration of the implant with a loss of function occur. In previous studies, pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR<sub>Y</sub>) agonist, was shown to reduce native aortic valve degeneration. However, the influence of pioglitazone on the inflammatory and degenerative changes in cardiovascular implants is still unclear. The aim of this study is to investigate the effect of PPAR<sub>Y</sub> on the in vivo degeneration of biological prostheses in an already established rat model of heterotopic aortic valve implantation under normal dietary conditions.

Aortic valve-carrying conduits were harvested from Sprague-Dawley rats and cryopreserved. The allogeneic conduits (n=40) were then implanted in Wistar rats in the infrarenal abdominal aorta. Some of the Wistar rats were given diet containing pioglitazone (75mg/kg food; n=20, PIO-group), the other part received standard diet without any other additives (n=20, control-group). The conduits were explanted after 4 (short-term trial) or 12 weeks (long-term trial) and evaluated using histological, immunohistological methods and qPCR.

The therapy with Pioglitazone showed a significant reduction in inflammatory markers: Macrophage-mediated inflammation, as measured by CD68-positive cells, was significantly reduced in the PIO-group compared to the control group both after 4 weeks (p=0,0303) and after 12 weeks (p=0,0122). Osteochondrogenic remodeling, detected by Syndecan-3 staining, was significantly reduced in the PIO-group compared to controls at 12 weeks (p=0,001). Calcification was recorded using a *von-Kossa*-score. Both the calcification of the intima and the media could be reduced significantly after 12 weeks in the PIO-group (intima: p=0,075; media: p=0,0245). After 12 weeks, echocardiography showed a significantly better functionality of the implanted valve in the PIO-group compared to the control group (p=0,0012). Contrary to expectations, the PIO-group showed significantly higher intimal hyperplasia after 12 weeks compared to the control group (p=0,0165). Systemic PPARy activation prevents inflammatory processes and reduces calcification of the aortic valve-bearing conduits. Doppler sonography was also able to show that the loss of function due to degeneration of the implants could be significantly reduced under pioglitazone therapy. Further translational studies are certainly needed to obtain more information about the therapeutic effectiveness on biological valve prostheses through the regulation of PPARy regarding durability, intimal hyperplasia and degenerative processes.

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
*	p < 0,05
**	p < 0,01
***	p < 0,001
****	p < 0,0001
aSMA	alpha-smooth muscle actin
Δ	Delta
μ	Mikro
bit	binary digit
AGE	Advanced glycation end product
AI	Aortenklappeninsuffizienz
Аро	Apoliprotein
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
Ct	Cycle of threshold
DAPI	4′,6-Diamidin-2-Phenylindol
dl	Deziliter
DM2	Diabetes Mellitus 2
EtOH	Ethanol
Expl.	Explantation
g	Gramm
GAG	Glykosaminglykan
gDNA	Genomic deoxyribonucleic acid
HDL	High density lipoprotein
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IE	Internationale Einheit

lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
Impl.	Implantation
kg	Kilogramm
LDL	Low density lipoprotein
	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
ND-4	Normaldiät-Futtergruppe, ohne Futterzusatz, Explantation nach 4 Wochen
ND-P-4	Normaldiät-Futtergruppe, mit Pioglitazon-Futterzusatz, Explantation nach 4 Wochen
ND-12	Normaldiät-Futtergruppe, ohne Futterzusatz, Explantation nach 12 Wochen
ND-P-12	Normaldiät-Futtergruppe, mit Pioglitazon-Futterzusatz, Explantation nach 12 Wochen
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OCL	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
р	Propability value
PIO	Pioglitazon
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonucleic acid
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
PPARy	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
pmol	Pikomol

ROI	Region of interest
rpm	Rounds per minute
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
S.C.	Subcutan
SEM	Standard error of the mean
TNFa	Tumor necrosis factor alpha
VS.	versus
VSMC	Vascular smooth muscle cell
vWF	Von Willebrandfaktor
ZVK	Zentralvenöser Katheter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleit	ung		11
	1.1	Herzklappe	enerkrankungen in der Bevölkerung	11
	1.2	Aortenklap	ppenerkrankungen und Therapie	12
		1.2.1	Aortenklappenstenose	12
		1.2.2	Aortenklappeninsuffizienz	13
		1.2.3	Aortenklappenersatz	14
	1.3	Limitatione	en von Aortenklappenprothesen	16
		1.3.1	Degeneration von Aortenklappenprothesen	16
		1.3.2	Degenerative Prozesse am biologischen Klappenersatz	17
	1.4	Pioglitazor	۱	21
		1.4.1	Indikation und Wirkungsweise	21
		1.4.2	Studienlage zur kardiovaskulären Prävention	22
	1.5	Ziele der A	rbeit	26
2	Materi	Material und Methoden		
	2.1	Versuchstie	ere	27
	2.2	Aufbau de	r Studie	27
	2.3	Operative	Methoden	
		2.3.1	Allgemeines	29
		2.3.2	Explantation aus Spendertieren	29
		2.3.3	Induktion einer Aortenklappeninsuffizienz	
		2.3.4	Konduit-Implantation	30
		2.3.5	Konduit-Explantation	31
	2.4	Dopplerso	nografische Untersuchung	33
	2.5	Kryokonse	rvierung	34
	2.6	Kryotomie		
	2.7	Histologie		35
		2.7.1	Allgemeines	35
		2.7.2	Hämatoxylin Eosin	35
		2.7.3	Intima-Media-Ratio	36
		2.7.4	Von Kossa Versilberung	37
		2.7.5	Von-Kossa-Score	37
		2.7.6		
		2.7.7	Alizarin Flachenberechnung	
		2.7.8	Wovat Pentachrom	40 VIII

2.8 Immunfluoreszenz	
2.8.1 vWF & <i>aSMA</i>	
2.8.2 CD3 / CD68	
2.8.3 CD3 / CD68 Zellzählung	
2.8.4 Syndecan-3	
2.8.5 Syndecan-3-Score	
2.9 PCR	
2.9.1 RNA-Isolation	
2.9.2 RNA-Quantifizierung	
2.9.3 Reverse Transkription	
2.9.4 qPCR	
2.9.5 ΔΔCt-Methode	
2.10 Statistik	
2.11 Materialliste	50
2.12 Antikörper	
2.13 Software	53
2.14 Geräteliste	53
2.15 Nachweise	54
2.15.1 Aktenzeichen für die Tierversuchsgenehmigu	ng 54
2.15.2 Teilnahme an der Felasa-Tierversuchsfachkur	ıde 55
3 Ergebnisse	56
3.1 In vivo Daten	56
3.1.1 Gewicht und aufgenommene Futtermenge	56
3.1.2 Dopplersonografie	57
3.1.3 Serumwerte zum Zeitpunkt der Explantation	59
3.2 Histologie	61
3.2.1 Intima-Media-Ratio	61
3.2.2 Von-Kossa-Score	
3.2.3 Alizarin Flächenberechnung	64
3.2.4 Movat-Pentachrom	65
3.3 Immunfluoreszenz	67
3.3.1 vWF & <i>aSMA</i>	67
3.3.2 CD3 / CD68	
3.3.3 Syndecan-3	
3.4 PCR-Ergebnisse	70

Diskussion			73
4.1	Effekte der	PPARy-Aktivierung	73
	4.1.1	Reduktion der Kalzifizierung durch PPARy-Agonismus	73
	4.1.2	Einfluss von Pioglitazon auf die Inflammation	76
	4.1.3	Weitere Effekte von Pioglitazon	82
4.2	Limitierenc	de Faktoren dieser Arbeit	83
4.3	Fazit: Haltb	parkeit von Herzklappenprothesen und Pioglitazon	84
Literatur- und Quellenverzeichnis		85	
Danks	agungen		95
Eidess	tattliche Ver	sicherung	96
	Diskus 4.1 4.2 4.3 Literatu Danksa Eidess	Diskussion 4.1 Effekte der 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.2 Limitierend 4.3 Fazit: Halt Literatur- und Que Danksagungen Eidesstattliche Ver	<ul> <li>Diskussion</li> <li>4.1 Effekte der PPARγ-Aktivierung</li> <li>4.1.1 Reduktion der Kalzifizierung durch PPARγ-Agonismus</li> <li>4.1.2 Einfluss von Pioglitazon auf die Inflammation</li> <li>4.1.3 Weitere Effekte von Pioglitazon</li> <li>4.2 Limitierende Faktoren dieser Arbeit</li> <li>4.3 Fazit: Haltbarkeit von Herzklappenprothesen und Pioglitazon</li> <li>Literatur- und Quellenverzeichnis</li> <li>Danksagungen</li> <li>Eidesstattliche Versicherung</li> </ul>

# **1** Einleitung

## 1.1 Herzklappenerkrankungen in der Bevölkerung

Herz-Kreislauferkrankungen stellen eine der Haupttodesursachen in entwickelten Ländern dar. Die Zahl der Toten aufgrund von Herz-Kreislauferkrankungen beläuft sich für Deutschland laut aktueller Statistik vom statistischen Bundesamt aus dem Jahr 2017 auf 344.524, das sind 37% aller Todesursachen in Deutschland (DESTATIS, 2017). Laut dem *German Heart Surgery Report* 2018 ist die Gesamtzahl der herzchirurgischen Eingriffe zwar von 179.337 auf 174.902 im Vergleich zum Vorjahr (2017) um 2,5 % zurückgegangen, jedoch gingen die Eingriffe an den Herzklappen um 1,5 % nach oben und stellen dabei nach wie vor eine der häufigsten Operationen in der Kardiochirurgie dar. Von allen Eingriffen an den vier Herzklappen werden Vitien an Aortenklappen am häufigsten operiert (Beckmann et al., 2019).

Die Aortenklappenstenose stellt den größten Teil aller Herzklappenvitien dar (lung und Vahanian, 2014). Mit zunehmendem Alter steigt auch die Zahl der Herz-Kreislauferkrankungen und aufgrund ähnlicher Risikofaktoren mit dem Großteil aller kardiovaskulären Erkrankungen auch die Zahl der Herzklappenerkrankungen (Beckmann et al., 2019) (Goldbarg et al., 2007) (Nkomo et al., 2006). Auch gibt es Hinweise darauf, zwischen dass eine Korrelation einer der häufigsten Erkrankung des Herzkreislaufsystems, der koronaren Herzerkrankung (KHK), mit dem Auftreten von Aortenklappenstenosen besteht (Matta und Moussallem, 2019). Durch die demographische Alterung der Bevölkerung ist mit einer vermehrten Häufung von Aortenklappenstenosen zu rechnen und damit auch mit einer wachsenden Herausforderung in der westlichen Gesundheitsversorgung (Soler-Soler und Galve, 2000). Somit steht die Optimierung der kausalen Therapie degenerativer Aortenklappenerkrankungen im Vordergrund. Im Hinblick auf die steigenden Eingriffszahlen bei Aortenklappenstenosen und der höheren Tendenz zum Einsatz biologischer Aortenklappenprothesen (Beckmann et al., 2019) (Dunning et al., 2011) ist es daher von großem Interesse, die Zahl der Reoperationen zu senken, indem der biologische Aortenklappenersatz haltbarer und für den Patienten einfacher in der Überwachung und bei der medikamentösen Handhabung gemacht wird.

#### 1.2 Aortenklappenerkrankungen und Therapie

#### 1.2.1 Aortenklappenstenose

Aortenklappenerkrankungen lassen sich grob in Stenosen und Insuffizienzen unterteilen. Die am häufigsten operierte und vorkommende Form von Aortenklappenvitien ist die erworbene Aortenklappenstenose (Beckmann et al., 2019) (lung, 2003). Die häufigste Ursache ist die Kalzifizierung der Aortenklappe. Vor dem 65. Lebensjahr tritt diese häufig als Spätfolge einer kongenitalen bikuspiden Aortenklappe auf, die durch das Fehlen des dritten Segels einer höheren mechanischen Belastung ausgesetzt ist, oder auch als Folge einer rheumatischen Erkrankung, die zu inflammatorischen Umbauprozessen in den Segeln führt. Nach dem 65. Lebensjahr ist es oft Folge einer degenerativen Kalzifizierung. Diese Einlagerung von Kalk beginnt an der Basis, erstreckt sich mit der Zeit bis in die Klappenspitzen und führt im fortgeschrittenen Stadium zu einer Verschlechterung der Flexibilität der Aortenklappen und damit zur Minderung der Klappenöffnungsfläche (KÖF). Zu den degenerativen Prozessen zählen Ablagerungen von Lipiden, Verkalkung und der Entzündungsvorgang (Matta und Moussallem, 2019) (Silbernagl und Lang, 2013) (Erdmann, 2011). Diese Vorgänge haben große Ähnlichkeit mit der Atherosklerose, die oft zusammen mit der Aortenklappenstenose beobachtet wird. Neben dem Alter zählen so etwa das männliche Geschlecht, Hypertonie, Rauchgewohnheiten sowie eine hohe Low-density Lipoprotein (LDL)- und Lipoprotein (a)-Konzentration zu den gemeinsamen Risikofaktoren (Coffey et al., 2014) (Stewart et al., 1997) (Mohler et al., 1991).

Die normale KÖF beträgt etwa 2,5 bis 3 cm<sup>2</sup> und lässt damit in der Systole mit 0,2l/min sowohl in Ruhe als auch unter Belastung genügend Blut in die Körperperipherie fließen, ohne dass eine enorme Drucksteigerung stattfinden muss. Die verminderte KÖF bei einer Aortenklappenstenose führt zu einem verminderten Durchfluss des Blutes in die Peripherie des Körperkreislaufs während der Systole. Das Blut staut sich im linken Ventrikel und führt zu einer linksventrikulären Hypertrophie, um das verminderte Herzzeitvolumen zu kompensieren. Zusätzlich kommt es zu einer poststenotischen Hypotonie, die die optimale Durchblutung der Koronargefäße verhindert. Symptomatisch äußert sich eine Aortenklappenstenose bei einer Minderung der KÖF um 60-75% bzw. bei einer Fläche von unter 1 cm<sup>2</sup>. Zu den charakteristischen Symptomen gehört die Angina pectoris aufgrund der Myokardischämie, Synkopen durch eine geminderte cerebrale Perfusion sowie Zeichen einer Linksherzinsuffizienz wie Husten, Belastungsdyspnoe oder Leistungsminderung. Patienten ohne Symptome und einer noch akzeptablen Ejektionsfraktion (EF) von über 50% können mit Diuretika und Vasodilatoren behandelt werden, mit dem Ziel die Vorlast zu senken. Bei asymptomatischen Aortenklappenstenosen ist auch die Prophylaxe der Atherosklerose von Bedeutung, um den Prozess der Stenosierung zu verlangsamen. Beim Auftreten von Beschwerden haben Patienten in der Regel eine schlechtere Prognose. In diesen Fällen ist ein Aortenklappenersatz indiziert. Auch bei asymptomatischen Patienten kann ein Klappenersatz indiziert sein, z.B. bei einer Reduzierung der EF auf unter 50%, bei höhergradigen Aortenklappenverkalkungen oder beim Auftreten von Beschwerden während eines Belastungstests (Herold, 2017) (Silbernagl und Lang, 2013) (Erdmann, 2011).

#### 1.2.2 Aortenklappeninsuffizienz

Nicht so häufig wie die Aortenklappenstenose ist die Aortenklappeninsuffizienz. Bei dieser kommt es zu einer Vergrößerung der Klappenöffnungsfläche durch eine unvollständige Schließung der Aortenklappen. Dies kann durch altersbedingte oder genetische Faktoren, wie Kollagenosen, beeinflusst sein. Insuffizienzen bilden sich aufgrund von primären Aortenklappenerkrankungen, wie bei degenerativen Prozessen oder einer angeborenen bikuspiden Aortenklappe. Eine akute Form der Aorteninsuffizienz wird meist durch eine infektiöse Endokarditis verursacht. Auch Bindegewebserkrankungen wie z.B. das Marfan-Syndrom können ursächlich für eine Insuffizienz sein (Baumgartner et al., 2017) (Jondeau et al., 2012) (lung, 2003). Dabei kommt es langfristig zu einer übermäßigen Volumenbelastung im linken Ventrikel, die zu einer linksbetonten Myokardhypertrophie und zur Ventrikeldilatation führt. Bei höhergradigen Insuffizienzen kann es zu hämodynamischen Effekten kommen, die sich in einer belastungsabhängigen und / oder nächtlichen Dyspnoe, Orthopnoe und in seltenen Fällen auch in einer Angina pectoris äußern können. Akute Fälle stellen dabei eine dringende Indikation zum Klappenersatz dar, während chronische Verläufe zunächst mit Hilfe einer blutdruckregulierenden konservativen Therapie behandelt werden, um die Nachlast zu senken und den linken Ventrikel zu entlasten (Silbernagl und Lang, 2013) (Erdmann, 2011).

#### **1.2.3 Aortenklappenersatz**

Im Fall einer hochgradigen Aortenklappenstenose ist der Aortenklappenersatz ein Standardverfahren der kardiochirurgischen Therapie mit dem Ziel, den Blutfluss während der Systole zu korrigieren. Die Art des Klappenersatzes hängt von mehreren, in der Leitlinie festgelegten, Faktoren ab. Eine mechanische Herzklappe wird dabei bevorzugt bei Patienten eingesetzt, die unter 60 Jahre alt sind und eine Lebenserwartung von über zehn Jahren haben. Auch darf beispielsweise keine Kontraindikation zur lebenslangen Antikoagulation vorliegen (Baumgartner et al., 2017). Diese bietet im Vergleich zu einem biologischen Klappenersatz eine längere Haltbarkeit (Hammermeister et al., 2000) (Stassano et al., 2009) (Chiang et al., 2014), muss aber durch die veränderten Flusseigenschaften (von Knobelsdorff-Brenkenhoff et al., 2014) und durch das Fremdmaterial lebenslang mit Antikoagulation unterstützt werden, um thrombembolische Ereignisse zu minimieren (Baumgartner et al., 2017). Auch die Gefahr von schwereren Blutungen ist aufgrund der Antikoagulation zu beobachten, während Blutungskomplikationen im Vergleich bei biologischen Aortenklappenprothesen geringer ausfallen (Isaacs et al., 2015) (Schnittman et al., 2018) (McClure et al., 2014). Die Eingriffe, die mit Hilfe eines extrakorporalen Kreislaufs durchgeführt werden, finden in den meisten Fällen (87,8 %) mit dem Einsatz eines Xenografts statt (Beckmann et al., 2019). Ein Xenograft ist eine biologische Aortenklappenprothese, die entweder aus Rinder- oder Schweineperikard gefertigt wird. Bei konventionellen Stentprothesen sowie bei Abwandlungen, wie den rapid deployement Prothesen oder TAVI (transcatheter aortic valve implantation), wird das Klappengewebe noch zusätzlich durch ein Gerüst verstärkt. Um den Immunreaktionen des Patienten zu entgehen, wird das in biologischen Klappenprothesen eingesetzte Gewebe in der Regel mit Glutaraldehyd behandelt. Dieses soll die Antigene maskieren und die Prothese damit für die unmittelbare Immunreaktion unzugänglich machen. (Pibarot und Dumesnil, 2009) (Chen et al., 1994). Ein Homograft ist eine humane Herzklappe, die vor dem Einsatz kryokonserviert, dezellularisiert und antibiotisch vorbehandelt wird. Homografts sind bei schweren Verläufen von Endokarditiden, angeborenen Herzfehlern oder bei einer absoluten Kontraindikation zur Antikoagulation indiziert. Diese Form ist leider nur in geringen Mengen verfügbar und wie zuvor erwähnt, bestimmten Indikationen vorbehalten. Jedoch zeigen diverse Tierversuchsstudien gute Ergebnisse im kurz- bis mittelfristigen Verlauf im Hinblick auf Rezellularisierung und immunologische Reaktionen (Assmann et al., 2014) (Akhyari et al., 2010) (Lichtenberg et al., 2006) (Nagele et al., 2000).

Patienten mit einem biologischen Klappenersatz weisen eine in ihrer Altersklasse gute Lebenserwartung sowie weniger Blutungskomplikationen als bei einem mechanischen Klappenersatz auf (Chiang et al., 2014) (Chan et al., 2012). Es zeigt sich auch eine insgesamt bessere Hämodynamik als bei mechanischen Aortenklappenprothesen (Rajput und Zeltser, 2020). Die biologische Aortenklappenprothese wird bevorzugt bei älteren Patienten und einer geringeren Notwendigkeit eines erneuten Austauschs der Prothese eingesetzt (Baumgartner et al., 2017) (Isaacs et al., 2015). Jedoch ist die Haltbarkeit eines solchen Klappenersatzes bei den herkömmlichen Modellen auf etwa zehn bis maximal 15 Jahre beschränkt (Foroutan et al., 2016). So kommt es vergleichsweise früh zu einem Funktionsverlust der Prothese aufgrund von Kalzifizierung und damit zu einer Notwendigkeit zur Reoperation und dem Ersatz der alten Aortenklappenprothese. Vor allem jüngere Patienten erleiden häufiger ein primäres Versagen des biologischen Aortenklappenersatzes als ältere Empfänger (Johnston et al., 2015) (McClure et al., 2014) (Stassano et al., 2009) (Hammermeister et al., 2000).

#### **1.3 Limitationen von Aortenklappenprothesen**

#### **1.3.1 Degeneration von Aortenklappenprothesen**

Nach wie vor ist die Optimierung der Prothesenhaltbarkeit ein wichtiger Forschungsgegenstand. Denn trotz aller bisher unternommenen Maßnahmen zur Reduktion der Antigenität, der Verbesserung der Hämodynamik oder zur Unterstützung des Prothesenmaterials gegen Abnutzung, erfährt gerade die biologische Klappe eine zunehmende Bedeutung in der Therapie von Aortenklappenerkrankungen.

Degenerative Prozesse führen langfristig zu strukturellen Veränderungen im Klappengewebe und zwangsläufig zum Funktionsverlust. Einerseits durch die Verhärtung von Bindegewebe durch Kalzifizierung und damit zu einer Stenosierung durch Reduzierung der KÖF. Andererseits können im verhärteten und unflexiblen Klappengewebe Schäden in Form von kleinen Rissen entstehen, die zu einer Insuffizienz der Prothese führen (Schoen und Levy, 2005).

Wie zuvor genannt, sind vor allem jüngere Patienten besonders stark von der Degeneration der Prothesen betroffen. Gemeinsame Risikofaktoren wie auch die für Atherosklerose spielen nicht nur bei der Entwicklung einer Aortenklappenerkrankung eine Rolle, sondern sind auch für die Degeneration der Aortenklappenprothese ursächlich. Nollert et al. zeigen in ihrer Übersichtsstudie, dass die Degeneration einer Klappenprothese bei jüngeren Menschen deutlich stärker von den Risikofaktoren abhängig ist als bei älteren. Faktoren wie Diabetes Mellitus Typ 2 (DM2), Nikotinkonsum und Hypercholesterinämie sowie hohe Konzentrationen von Triglyceriden sind mit einer verstärkten Kalzifizierung und Degeneration von Prothesen assoziiert. Dies deckt sich auch mit den Aussagen anderer Studien zu Risikofaktoren im Bereich der Klappenprothesendegenration (Rodriguez-Gabella et al., 2017) (Stassano et al., 2009) (Le Tourneau et al., 2007) (Nollert et al., 2003).

Die begrenzte Haltbarkeit ist dabei einerseits auf die fehlende Geweberegeneration durch fehlende Durchblutung des *Anulus aortae* und der valvulären Basis zurückzuführen. Andererseits spielt auch die Antigenität des fremden Gewebes, die Art der Verstärkung einer Prothese, wie etwa der Einsatz eines Gerüsts bei Stent-Prothesen, aber auch die Behandlung der Oberflächen des Prothesengewebes vor Implantation eine Rolle. Die Degeneration biologischer Aortenklappen ist daher hauptsächlich durch fehlende Geweberegeneration, Immunprozesse und durch degenerative Kalzifizierung verursacht (Rodriguez-Gabella et al., 2017). Während die Regeneration von fremdem Prothesengewebe eher schwierig zu korrigieren sein dürfte, ist es vor allem die Forschung an Methoden zur Modulation und Reduktion von immunologischen und kalzifizierenden Prozessen, die die Wissenschaftler und Kliniker beschäftigt, die langfristige Dysfunktion der Prothese hinauszuzögern oder im besten Fall zu verhindern (Pibarot und Dumesnil, 2009).

Genauer ist es die Ablagerungen von Lipiden, die Migration von inflammatorischen Zellen sowie die Immunreaktion gegen das fremde Gewebe, die eine wichtige Rolle im Prozess der strukturellen Degeneration einnehmen. Auch patientenbezogene Faktoren wie das jüngere Alter, hoher *Body Mass Index*, atherosklerotische Risikofaktoren, wie Rauchgewohnheiten, hohe LDL-Konzentrationen oder DM2 sind relevant, wie auch die Variabilität der einzelnen Prothesen. Je nach Vorbehandlung oder je nach Gewebeart der Prothese kann es so zu einem unterschiedlich starken degenerativen Verlauf kommen. Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte Gewebe eine bestimmte Art der Funktionseinschränkung entwickeln. So sollen Prothesen aus Rinderperikard durch Verkalkungen eher zu Stenosen neigen, während das Schweineperikard eher eine Insuffizienz aufgrund von Rissen entwickelt (Rodriguez-Gabella et al., 2017) (Cote et al., 2017) (Le Tourneau et al., 2007) (Nollert et al., 2003). Im Weiteren sollen die wichtigsten degenerativen Prozesse näher erläutert werden.

#### **1.3.2 Degenerative Prozesse am biologischen Klappenersatz**

In den meisten Fällen handelt es sich bei biologischen Klappenprothesen um einen *Xenograft*, also einen Klappenersatz aus menschenfremden Geweben. Am häufigsten kommt *porcines* oder *bovines* Perikard zum Einsatz (Beckmann et al., 2019). Dieses Gewebe hat daher eine potenzielle Antigenität und die Gefahr einer Immun- und Abstoßungsreaktion. Aus diesem Grund wird das Schweine- oder Rinderperikard je nach Prothesenart mit Glutaraldehyd behandelt. Es handelt sich um ein Fixationsmittel, das das fremde Gewebe fixiert und damit die Antigenität für das menschliche Immunsystem reduziert. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass diese Art der Gewebehandlung mit Glutaraldehyd die Antigenität nicht komplett eliminiert und eine Kalzifizierung induzieren kann. Daher wird die Aufbereitungsart der Prothesen als einer der Gründe für

degenerative Kalzifizierung betrachtet (Rodriguez-Gabella et al., 2017) (Schoen und Levy, 2005) (Chen et al., 1994). So zeigte eine Studie am Tiermodell eine humorale und zelluläre Immunantwort, nämlich die Migration von Makrophagen (CD68) und T-Zellen (CD3) und erhöhte IgG-Antikörpertiter. Die erhöhte Kalzifizierung von Xenografts ging somit mit der gesteigerten Immunantwort einher (Biermann et al., 2018) (Manji et al., 2006). Auch in Fällen der allogenen Prothesenimplantation beim Menschen äußert sich dieser Effekt: Es zeigt sich eine Erhöhung von spenderspezifischen IgG-Antikörpern gegen die humanen Leukozyten Antigene (HLA) der Klasse I und II, sowie eine die T-Zellreaktion des Empfängers im Verlauf und die darauf folgenden Kalzifizierungsprozesse (Hogan et al., 1996) (Hoekstra et al., 1996). Eine weitere Tierversuchsstudie an Ratten konnte die humorale und zelluläre Immunantwort bei allogener Aortenklappentransplantation ebenfalls aufzeigen (Zhao et al., 1994). Zusammenfassend sprach Wilhelmi et al. den immunologischen Reaktionen eine zentrale Rolle bei der Degeneration biologischer Herzklappenprothesen zu (Wilhelmi et al., 2003).

Der Kalzifizierungsprozess wird aber auch als Folge von Membranschäden aufgrund der Fixation mit Glutaraldehyd gesehen. Kalzium lagert sich an den freien überbleibenden Phospholipiden der beschädigten Membran an und kumuliert zu Kalziumkristallen, die das Bindegewebe schädigen und die Funktionalität der Klappenprothese einschränkt (Schoen und Levy, 2005). Die Kalzifizierung geht damit über den Inflammationsprozess einher und lässt sich über den Biomarker Osteopontin (OPN) nachweisen (Sainger et al., 2012) (Yu et al., 2009). OPN ist ein Zytokin, das von T-Zellen und Makrophagen innerhalb der Inflammation abgesondert wird und ist während der Inflammation wie auch beim Kalzifizierungsprozess von biologischen Klappenprothesen erhöht. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Inflammation und Kalzifizierung in Herzklappenprothresen (Manji et al., 2006) In der Studie von Shen et al. zeigte sich beim Menschen eine erhöhte Expression von OPN in verkalkten biologischen Aorten- und Mitralklappenprothesen (Shen et al., 1997). Auch bei anderen chronischen Entzündungsprozessen des kardiovaskulären Systems, wie der nativen kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung oder der Atherosklerose, ist OPN ein relevanter Prädiktor. Wie bei besagten Erkrankungen kommt es auch bei einer verstärkten kalzifizierenden

Degeneration von biologischen Klappenprothesen in höheren Konzentrationen vor. OPN agiert dabei als physiologischer Inhibitor von vaskulären Kalzifizierungsprozessen und ist bei Verletzungen der Gefäßwand folglich erhöht, um eine Regeneration des Gefäßes zu induzieren und dabei eine vermehrte Kalziumeinlagerung in die verletzte Gefäßwand zu reduzieren (Lok und Lyle, 2019) (Sainger et al., 2012) (Manji et al., 2006). Ein weiterer Mechanismus betrifft die morphologische Veränderung der glatten Muskelzellen des kardiovaskulären Systems, die vascular smooth muscle cells (VSMCs). Diese Zellart kommt v.a. in Gefäßen vor, während diese in Herzklappen in geringerer Ausprägung vertreten ist. VSMCs sind jedoch sowohl in der Atherosklerose als auch bei der degenerativen Veränderung der Aortenklappe relevant. Während die gesunde Aortenklappe meist kaum VSMCs aufweist, ist diese Zellreihe beim degenerativen Remodeling auch in Herzklappen vermehrt exprimiert (Chen et al., 2009) (Bairati und DeBiasi, 1981). Der inflammatorische Prozess führt über Migration und Proliferation dieser Zellen zu einer strukturellen Degeneration in Gefäßwänden und in Aortenklappen (New und Aikawa, 2011) (Freeman und Otto, 2005) (Schwartz et al., 2000) (Ross, 1999) (Otto et al., 1994) (Olsson et al., 1994).

Nach der Proliferation von VSMCs kommt es im fortgeschrittenen Stadium zum osteochondrogenen Umbau durch Kalzifizierung und Fibrosierung. So stellte die Übersichtsstudie von New und Aikawa einen Zusammenhang zwischen der Immunantwort von Monozyten sowie Makrophagen und der osteochondrogenen Differenzierung fest. Für die fortschreitende kardiovaskuläre Kalzifizierung sind damit diverse Zytokine, die von den Makrophagen ausgeschüttet werden, u.a. IL-1β, IL-6 oder *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNFa), verantwortlich. Diese sind in der Lage den osteochondrogenen Umbau an den VSMCs zu induzieren (New und Aikawa, 2011).

Auch die Hypercholesterinämie sowie erhöhte Triglyceride und das metabolische Syndrom stellen - wie auch für die Atherosklerose - wichtige Risikofaktoren und Prädiktoren für den weiteren Verlauf einer Degeneration von Aortenklappenprothesen dar (Briand et al., 2006) (Farivar und Cohn, 2003) (Nollert et al., 2003). Denn wie auch im Gefäßsystem gibt es hierbei Lipidablagerungen und damit eine Induktion von inflammatorischen Prozessen. Dabei kommt es zur Bildung von Glykosaminglykanen (GAG), die an der Bindung und Retention von Apolipoproteinen beteiligt sind. Des Weiteren oxidieren aggregierte LDLs und die Makrophagen differenzieren zu Schaumzellen, die u.a. zur Verdrängung und Schädigung der Kollagenstruktur führen (Shetty et al., 2009). Darüber hinaus deuteten Aronson und Rayfield in ihrer Übersichtsstudie an, dass glykierte LDLs in einer diabetischen Stoffwechsellage zur vermehrten Aufnahme über unspezifische LDL-Rezeptoren vom *scavenger*-Typ neigen und damit die Bildung von atherosklerotischen Plaques in der Gefäßwand begünstigen (Aronson und Rayfield, 2002) (Klein et al., 1995) (Sobenin et al., 1993). Übereinstimmend mit den meisten bereits genannten Studien zu Risikofaktoren für die Degeneration biologischer Aortenklappenprothesen (Rodriguez-Gabella et al., 2017) (Le Tourneau et al., 2007) (Nollert et al., 2003) deutete Lorusso et al. speziell darauf hin, dass DM2 einen relevanten Anteil an der Mortalitätsrate aber auch an der Einschränkung der langfristigen Haltbarkeit der Prothesen hat (Lorusso et al., 2012).

Wie zuvor erwähnt nehmen inflammatorische Prozesse in der Ätiologie der Degeneration von nativen Aortenklappen und biologischen Aortenklappenprothesen eine wichtige Rolle ein. Unter dieser Annahme zeigten Li et al., dass das Antidiabetikum Pioglitazon ein potenzieller Kandidat zur Reduzierung dieser degenerativen Prozesse ist, indem sie in ihrer Studie an Kaninchen eine Reduktion kalzifizierender Prozesse an nativen Aortenklappen im Zusammenhang mit einer Pioglitazonbehandlung beobachtete (Li et al., 2012).

#### 1.4 Pioglitazon

#### 1.4.1 Indikation und Wirkungsweise

Pioglitazon wird in der Therapie von DM2 eingesetzt. Es gehört der Wirkstoffgruppe der Thiazolidindione, oder kurz Glitazone, an und ist in der Wirkungsweise grob als ein Insulin-Sensitizer zu bezeichnen. Pioglitazon bietet es bei Insulinresistenzen ein verbessertes Ansprechen der Fett- und Muskelzellen auf Insulin und damit auf die Reduktion der Glucose im Blut durch die Aufnahme in die Zellen. So können Glitazone beim DM2 aber auch bei nicht diabetesassoziierten Erkrankungen wie Adipositas indiziert sein (Lüllmann et al., 2016) (Herold, 2017).

Pioglitazon ist, wie andere Glitazone auch, ein Agonist des Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPARy), eines nukläeren Rezeptor, der bei Aktivierung die Genexpression beeinflusst. PPARy trägt beispielsweise zur Reifung der Adipozyten bei und steigert die Expression von GLUT4-Transportproteinen zur Aufnahme von Blutglucose in die Adipozyten. Noch stärker als die Adipozyten werden Skelettmuskelzellen beeinflusst, obwohl die Rezeptordichte bei diesen geringer ist, ist der Einfluss der Muskelzellen auf den gesamten Stoffwechsel des Körpers von großer Bedeutung. (Phua et al., 2018) (Lüllmann et al., 2016). Mit einem Anteil von 30 bis 40% der Körpermasse kann die Skelettmuskulatur bis zu 80% der Blutglucose aufnehmen und hat damit einen großen Effekt auf die Glucosekonzentration im Blut (Phua et al., 2018) (Thiebaud et al., 1982). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass Glitazone eine hemmende Wirkung auf die Resistin-Ausschüttung haben, ein Protein, das bei übermäßiger Nahrungsaufnahme aus dem Fettgewebe freigesetzt wird. Das Resistin führt in erhöhter Konzentration zur Insulinresistenz und trägt zur Entstehung des metabolischen Syndroms bei (Steppan et al., 2001). Darüber hinaus reduziert Pioglitazon die Serumspiegel von Triglyceriden beim Menschen (Lüllmann et al., 2016).

In der DM2-Therapie wird Pioglitazon als Kombinationspräparat mit einem weiteren oralen Antidiabetikum wie Metformin oder Sulfonylharnstoff-Derivat eingesetzt, wenn der gewünschte Effekt allein durch das Metformin bzw. ein Sulfonylharnstoff nicht ausreichend wirksam ist und alle Kontraindikationen ausgeschlossen sind. Auf der Seite der Nebenwirkungen wird eine Zunahme des subkutanen Fettgewebes und des Körpergewichts beobachtet. Pioglitazon steigert die Neubildung von Fettzellen aus Triglyceriden, weshalb zum einen das subcutane Fettgewebe zunimmt und zum anderen die Trigylceridkonzentration im Blut sinkt. Das *high density lipoproteine* (HDL) wird dabei etwas reduziert. Ein Effekt auf das LDL ist kaum vorhanden. Es kann außerdem zu einer Flüssigkeitsretention kommen und damit zu peripheren Ödemen in Kombination mit einem reduzierten Hämatokritwert. Aus diesem Grund ist eine Therapie mit Pioglitazon in allen NYHA-Stadien der Herzinsuffizienz kontraindiziert. Außerdem sollten Patienten in einer Therapie mit Pioglitazon ein regelmäßiges Leberfunktionsscreening erhalten (Lüllmann et al., 2016) (Scholz und Schwabe, 2005).

#### 1.4.2 Studienlage zur kardiovaskulären Prävention

Wie zuvor erwähnt, ist DM2 einer der wichtigen Risikofaktoren für Atherosklerose wie auch Herzklappenerkrankungen aber auch für die Degeneration von biologischen Aortenklappenprothesen. Damit ist die Regulation eines relevanten Risikofaktors von großem Interesse, um dem degenerativen Verfall der Prothesen entgegenzuwirken und mögliche Reoperationen hinauszuzögern oder im besten Fall zu verhindern (Matta und Moussallem, 2019) (Rodriguez-Gabella et al., 2017) (Lorusso et al., 2012) (Goldbarg et al., 2007) (lung, 2003) (Stewart et al., 1997). Es gibt zahlreiche Parallelen zwischen der Degeneration von arteriellen Gefäßen und den Herzklappen. Die grundlegeneden Prozesse ausgehend von Makrophagen, VSMCs und Plaque-Bildung mit osteochondrogenem Umbau sind bei Herzklappen und Arterien mindestens als ähnlich anzusehen (New und Aikawa, 2011) (Otto et al., 1994).

Ein möglicher Ansatz wäre durch orale Therapeutika einen direkten Risikofaktor, die Blutglucose, über eine systemische Ansprache des Therapeutikums auf den Stoffwechsel zu reduzieren und einen limitierenden Einfluss auf die Degeneration biologischer Klappenprothesen zu erreichen. Hohe Konzentrationen von Glucose im Blut haben über eine nicht-enzymatische Bindung an Lipiden und Proteinen und über die Bildung von AGEs (*advanced gylcation endproducts*) einen atherogenen Effekt (Aronson und Rayfield, 2002). Die AGEs interagieren dabei mit einem dafür spezifischen Rezeptor, dem RAGE (*receptor for advanced gylcation endproducts*). Diese Interaktion führt zu inflammatorischen Prozessen und zu oxidativen Stress. Hierbei treten Monozyten und Makrophagen in Kontakt und letztere produzieren inflammatorische Mediatoren, u.a. IL-1 oder TNFa, die einen relevanten Bestandteil der Atherosklerose darstellen und damit zu der diabetischen Angiopathie führen (Aronson und Rayfield, 2002) (Vlassara et al., 1988). Eine weitere Studie von Ricote et al. ging dabei genauer auf die PPARy-Einheit in Makrophagen ein und zeigte in vitro, dass dieser Rezeptor in aktivierten Makrophagen in einer höheren Konzentration vorlag und pro-inflammatorische Transkrpitionsfaktoren inhibierte (Ricote et al., 1998). Des Weiteren konnte *in vitro* eine Reduktion von IL-1 $\beta$  und IL-6 durch PPARy an VSMCs gezeigt werden gezeigt sowie eine verminderte T-Zell-Immunantwort an aus Blutproben isolierten humanen CD4-positiven T-Zellen im Rahmen einer transplantationsassoziierten Atherosklerose festgestellt werden. Diese Erkenntnisse führten Marx et al. sowie Takata et al. zu der Annahme der positiven Beeinflussung durch PPARy als Gegengewicht zu den pro-inflammatorischen Vorgängen im Prozess einer Atherosklerose (Marx et al., 2002) (Marx, 2002) (Takata et al., 2002). Auch die Arbeit von Jiang et al. unterstützt diese Aussagen mit dem Befund an mononukleären Zellen, die aus humanem Blut gewonnen und zur Zytokinsynthese angeregt wurden, dass die Monozyten-vermittelte Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie von TNFa, IL-1 $\beta$ , IL-6 durch PPARy gesenkt werden konnte (Jiang et al., 1998).

Es gibt bereits Hinweise darauf, dass Pioglitazon die Degeneration nativer Aortenklappen mindern kann, indem es über die Regulation des RAGE die Inflammation, Kalzifizierung, aber auch den osteochondrogenen Umbau reduziert. So konnte Pioglitazon in New Zealand Kaninchen u.a. die Konzentration von pro-osteogenen Faktoren, OPN *sowie Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) und die von TNFa gesenkt und eine Minderung der makroskopischen Kalzifizierung innerhalb der Aortenklappe beobachtet werden (Li et al., 2012). In einem weiteren Tierversuch an Ratten zeigte sich ebenfalls der inhibierende Einfluss von Pioglitazon auf RAGE. Dazu wurde der Effekt von Pioglitazon an diabetischen und nicht-diabetischen Ratten überprüft und es wurde festgestellt, dass Pioglitazon in optimierter Dosierung einen protektiven Effekt auf das Ausmaß eines induzierten Myokardinfarkts hat. Unter anderem war dieser Effekt auf die mit Pioglitazon assoziierte Inhibition der AGE-RAGE-Kaskade und der Apoptoserate des Myokardgewebes zurückzuführen (Khodeer et al., 2016). Die Regulierung von RAGE hat Einfluss auf die Entstehung von Sauerstoffradikalen in VSMCs. Dabei kommt es zur Aktivierung von Monozyten sowie Makrophagen und zu

23

Entzündungsprozessen und zum osteochondrogenen Umbau (Towler, 2011). Die Übersichtsstudie von Beltowski et al. zeigte, dass die Aktivierung von PPARy sowohl in Tierversuchsstudien als auch in klinischen Studien inflammatorische Prozesse, die Migration von VSMCs und die Schaumzellbildung innerhalb der Gefäßwand inhibierte (Beltowski et al., 2003). Dass die Migration und Proliferation von VSMCs durch Aktivierung von PPARy in isolierten VSMCs von Menschen und Ratten inhibiert wird, zeigte Law et al. mittels immunhistochemischer Methoden und im *Western blot* (Law et al., 2000). Auch weitere Studien zeigten eine Regulation der Migration und der Proliferation von VSMCs und damit einen wichtigen Einfluss auf inflammatorische Prozesse bei der Atherogenese und dem degenerativen *Remodeling* von Gefäßwänden: Es konnte u.a. an isolierten humanen Endothelzellen aus der Vena saphena gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPARy die Chemotaxis von Lymphozyten und damit die T-Zellantwort inhibierte. Außerdem zeigten Tierversuchsstudien an Ratten, dass PPARy das atherogene Remodeling in Gefäßwänden reduzierte, die Migration und Proliferation von VSMCs hemmte und die Schaumzellbildung aus Makrophagen minderte (Marx et al., 2004) (Hsueh und Law, 2001). Auch Wang et al. fasste zusammen, dass an Tierversuchsstudien in vivo und in vitro ein atheroprotektiver Effekt einer PPARy-Aktivierung nachgewiesen werden konnte, indem die Schaumzellbildung über eine verminderte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie IL-1β, IL-6 oder TNFa in Makrophagen reduziert wurde (Wang et al., 2011). Der antiproliferative Effekt von PPARy an VSMCs und damit eine Hemmung der Intimahyperplasie wurde in einer Studie an Zellkulturen durch die Herunterregulierung der Telomerase (Ogawa et al., 2006), sowie an einer weiteren Studie in vivo an Mäusen durch eine Regulation des Toll-like-receptor-4 nachgewiesen (Zhang et al., 2011). Eine weitere Studie an transgenen Mäusen bestätigte die Reduktion einer Angiotensin-II-induzierten arteriellen Hypertension und der damit einhergehenden Atherosklerose, die unter Pioglitazon\_Therapie unter einem immunhistologischen Nachweis einer Läsionsverkleinerung zurückging (Subramanian et al., 2010). Nicht nur in Makrophagen, VMSCs sowie in Endothelzellen beeinflussen PPARy-Agonisten das vaskuläre *Remodeling* sowie atherosklerotische Prozesse positiv. Auch in die Expression von TNFa und IL-6 in Adipozyten, die ebenfalls eine bedeutende Rolle in vaskulären Entzündungsprozessen einnehmen, wird durch die Aktivierung von PPARy reduziert (Duan et al., 2008).

Teshima et al. konnten anhand einer kleinen Pilot-Studie, die in Form eines Kongressbeitrages vorliegt, zeigen, dass durch die Verabreichung von PPARγ-Agonisten möglicherweise auch bei biologischen Prothesen ein protektiver Effekt gegen degenerative Veränderungen zu erzielen sei (Teshima et al., 2015).

Trotz aller zahlreichen günstigen Einflüsse am kardiovaskulären System und der protektiven Wirkung gegen atherosklerotischen Degenration am Gewebe des Herz-Kreislaufsystems, sind die Mechanismen, über die möglichweise PPARY-Agonisten auf entzündliche und degenerative Prozesse an einem biologischen Klappenersatz protektiv wirken könnten, nicht hinreichend erforscht.

Dafür soll ein in der eigenen Arbeitsgruppe etablierte Tiermodell der heterotopen Aortenklappenimplantation an Ratten verwendet werden (Sugimura et al., 2017) (Munakata et al., 2013) (Assmann et al., 2012). Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Auswirkungen der systemischen Pioglitazon-Behandlung auf die entzündliche und kalzifizierende Degeneration von aortenklappentragenden Konduits mit Hilfe des genannten Rattenmodells zu untersuchen.

#### 1.5 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob eine bereits verfügbare Medikamentenklasse, die Glitazone, die in vergangenen Studien bereits in Tieren atheroprotektive Effekte zeigten (Khodeer et al., 2016) (Li et al., 2012), auch die Haltbarkeit von biologischen Aortenklappenprothesen verlängern können. Genauer soll der Einfluss des PPARy-Agonisten Pioglitazon im Kleintiermodell auf die degenerativen Umbauprozesse von biologischen klappentragenden Konduits und auf den Erhalt der Funktionalität der implantierten Aortenklappe untersucht werden. So soll sich herausstellen, ob Pioglitazon die Haltbarkeit solcher biologischer Aortenklappenprothesen im Tiermodell verlängert. Hierfür wird ein etabliertes Modell der heterotopen Aortenklappenimplantation an Ratten verwendet, mit dem der Funktionsverlust des klappentrageneden Konduits dopplersonografisch erfasst werden kann (Sugimura et al., 2017) (Munakata et al., 2013) (Assmann et al., 2012) . Ein klappentragendes Aortenkonduit einer Sprague-Dawleyexplantiert und in eine Wistar-Ratte mit Ratte wird einer induzierten Aortenklappeninsuffizienz infrarenal an die Aorta abdominalis implantiert. Um den Fokus nur auf die von Komorbiditäten unbeeinflusste Degeneration des Aortenklappenersatzes und den Einfluss von Pioglitazon zu legen, wurde bei der Futterauswahl auf prokalzifizierende oder atherogene Futterzusätze in dieser Studie verzichtet. So war ein reiner Vergleich zwischen einer Kontrollgruppe und einer mit Pioglitazon behandelten Gruppe möglich.

Für die Studie wurden zwei Versuchsansätze mit jeweils zwei verschiedenen Futtergruppen gewählt. Der Kurzzeitversuch sollte 4 Wochen dauern, der Langzeitversuch 12 Wochen. In jedem Versuchsansatz wurden zwei Futtergruppen untersucht. Die eine Futtergruppe hat ein Standardfuttergemisch bekommen und die andere Gruppe zusätzlich einen Futterzusatz mit Pioglitazon. Die Effekte von Pioglitazon auf die Haltbarkeit des Aortenklappenersatzes sollen mit Hilfe histologischer, immunhistologischer und molekularbiologischer Auswertungsmethoden beurteilt werden.

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Pioglitazon auf den osteochondrogenen Umbau, die inflammatorischen Prozesse, die Kalzifizierung des Konduits sowie die Suffizienz der implantierten Aortenklappe.

## 2 Material und Methoden

#### 2.1 Versuchstiere

Alle Tiere entstammen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle Experimente werden gemäß der Tierschutz-Versuchstierverordnung sowie mit der Genehmigung vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen: 84-02.04.2017.A182) durchgeführt.

Alle chirurgischen Eingriffe werden unter Analgesie mit Carprofen (5mg/kg/d) und Anästhesie mit Isofluran (2-3%) durchgeführt.

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (n=40, 200-250g) werden als Spender klappentragender Aortenkonduits verwendet. Die Empfänger dieser Aortenkonduits sind männliche Wistar-Ratten (n=40, 200-250g). Alle Ratten werden mit einem normaldietätischen Futter versorgt. Die PIO-Gruppe (n=20) erhielt zusätzlich einen Pioglitazonzusatz im Futter (75mg/kg Futtermenge). Dieser Zusatz wird bis zum Zeitpunkt der Explantation verabreicht. Tiere ohne Pioglitazongabe (n=20) werden als Kontrollgruppe verwendet.

## 2.2 Aufbau der Studie

Für das Projekt werden insgesamt 40 Wistar- und 40 Sprague-Dawley-Ratten gewählt. Damit eine inflammatorische Reaktion des Empfängertieres gegen das implantierte klappentragende Aortenkonduit erfolgt und es zu einem Degenerationsprozess an diesem kommt, werden bei den Spender- und Empfängertieren unterschiedliche Spezies verwendet. Dabei dienen die Sprague-Dawley-Ratten als Spender der klappentragenden Aortenkonduits. Nach der Explantation werden diese Ratten unter Vollnarkose durch Ausbluten sachgerecht getötet. Die 40 Wistar-Ratten, die das Konduit implantiert bekommen, werden randomisiert und auf zwei Futtergruppen verteilt. Die PIO-Gruppe (n=20) bekommen zusätzlich zum normalen Futter einen Pioglitazonzusatz (75mg/kg Futtermenge), während man der Kontrollgruppe (n=20) nur das Standardfutter verabreicht. Jede dieser Futtergruppen wird zusätzlich in weitere zwei Gruppen unterteilt, die sich nach dem Explantationszeitpunkt und damit der Länge eines Versuchsansatzes richten. Die Unterteilung der Futtergruppen erfolgt jeweils auf einen 4-wöchigen Kurzzeitversuch (n=10) und einen 12-wöchigen Langzeitversuch (n=10). Bevor die Wistar-Ratten ein solches Konduit implantiert bekommen, wird bei diesen eine Aortenklappeninsuffizienz der nativen Aortenklappe induziert, um das spätere Öffnen und Schließen der implantierten Aortenklappen zu ermöglichen. In diesem Zustand werden sie zwei Wochen lang beobachtet, bis ihnen das Konduit implantiert wird. Die Implantation erfolgt dabei heterotop an der *infrarenalen* Aorta.

Für die folgenden histologischen und molekularbiologischen Auswertungen werden die Wistar-Ratten je nach Versuchslänge 4 bzw. nach 12 Wochen nach Implantation des Konduits getötet. Anschließend werden die zuvor implantierten klappentragenden Konduits wieder explantiert. Pro Futtergruppe und Explantationszeitpunkt werden 4 Tiere für die histologische Auswertung und 6 Tiere für die molekularbiologische Auswertung mittels qPCR gewählt.

Die Aufteilung der Versuchstiere in Futtergruppen, auf Explantationszeitpunkte sowie nach den Auswertungsmethoden (PCR oder Histologie) ist in Tabelle 1 zu sehen.

	Histologie		PCR	
Explantations-Zeitpunkt	ND	ND + Pio	ND	ND + Pio
4 Wochen	n=4	n=4	n=6	n=6
12 Wochen	n=4	n=4	n=6	n=6

#### Tabelle 1: Studienaufbau

Unterteilung nach dem Explantationszeitpunkt, der Futtergruppe und nach der Auswertungsmethode. Abkürzungen: ND = Normaldiät ohne Futterzusatz (Kontrollgruppe). ND-P = Normaldiät mit Pioglitazon-Futterzusatz (PIO-Gruppe).

## 2.3 Operative Methoden

#### 2.3.1 Allgemeines

Alle chirurgischen Eingriffe wurden von Frau Dr. med. Anna Kathrin Assmann (geb. Schmidt), der Leiterin dieses Projekts, durchgeführt.

#### 2.3.2 Explantation aus Spendertieren

Als Spendertiere werden Sprague-Dawley Ratten verwendet. Die Ratten werden für die Entnahme durch eine i.p. Injektion mit Xylazin und Ketamin in Vollnarkose versetzt. Die Tiere werden in der Mittellinie sternotomiert und mit einer Heparininjektion 300 IE/kgKG in die *V. Cava inferior* antikoaguliert. Die Tiere lässt man in der Allgemeinnarkose ausbluten und führt somit den Tod herbei. Das Herz mit der Aorta ascendens, dem Aortenbogen und *Aorta descendens* werden entnommen und dann das Aortenkonduit präpariert. Das Aortenkonduit wird dann mit NaCl vom Restblut gereinigt.

#### 2.3.3 Induktion einer Aortenklappeninsuffizienz

Für die Induktion einer Aortenklappeninsuffizienz (AI) erfolgt ein ca. 10-minütiger operativer Eingriff an Wistar-Ratten. Die AI wird dabei durch eine Perforation der Aortenklappe erreicht. Ziel dieses Eingriffs soll es sein, ein Pendelvolumen an der nativen Aortenklappe zu erzeugen und somit die idealen hämodynamischen Bedingungen für das später zu implantierende klappentragende Konduit zu erreichen.

In der Vorbereitung wird den Ratten zunächst eine Allgemeinnarkose mit 2-3% Isofluran-Sauerstoffgemisch in einer Narkosekammer verabreicht. Danach werden die Tiere intubiert und die Narkose mit einem 1-1,5%igen Isofluran-Sauerstoffgemsisch aufrechterhalten. Zur Analgesie erfolgt eine subcutane Verabreichung von Carprofen. Der Eingriff beginnt mit einer 2cm langen, rechtsseitigen, zervikalen Inzision, um die A. Carotis communis darzustellen. Die Arterie wird distal ligiert und vasotomiert. Durch die Öffnung wird eine 22G Venenverweilkanüle eingeführt und bis in die Aortenklappenregion vorgeschoben. Nach Anlage der Venenverweilkanüle wird 1ml Blut entnommen, um laborchemische Basiswerte zu ermitteln, mit denen man später ermittelte Parameter innerhalb potenziellen Kalzifizierungseines und Degenerationsprozesses ins Verhältnis setzt. Mittels eines Drahtes, der über die zuvor eingebrachte Kanüle hindurchgeschoben wird, können die Aortenklappentaschen perforiert und somit die gewollte Aortenklappeninsuffizienz induziert werden. Der Prozess der Perforation sowie die induzierte Aortenklappeninsuffizienz wird mit Hilfe der Dopplersonographie überprüft. Anschließend wird die Venenverweilkanüle entfernt, die Gefäßinzision verschlossen und die Haut genäht. Zur postoperativen Analgesie wird nochmals Carprofen s.c. injiziert und das Versuchstier aus der Narkose ausgeleitet. Die Tiere werden 2 Wochen lang beobachtet. Besonders am ersten postoperativen Tag ist das Risiko für die Ratten durch die akute AI zu versterben am höchsten. Auch in den nächsten 2 Wochen besteht ein erhöhtes Mortalitätsrisiko durch eine Herzinsuffizienz, verursacht durch die induzierte AI und die damit herbeigeführte Volumenbelastung des linken Ventrikels.

#### 2.3.4 Konduit-Implantation

Die Implantation des klappentragenden Konduits erfolgt im Folgenden ca. 45-minütigen operativen Eingriff.

Die Narkose wird wie oben beschrieben (Induktion einer Aortenklappeninsuffizienz) eingeleitet und zur Analgesie Carprofen s.c. verabreicht. Es erfolgt eine Flüssigkeitssubstitution mit physiologischer NaCl-Lösung mit je 1ml/30min über die gesamte OP-Dauer. Für die Anlage eines zentralvenösen Katheters (ZVK) in die V. Jugularis interna wird eine 22G-Venenverweilkanüle verwendet. Hieraus wird während des Eingriffs 1ml Blut für die Ermittlung von Laborparametern zur Bestimmung degenerativer und kalzifizierender Prozesse entnommen. Nun wird eine Laparotomie in der Medianlinie durchgeführt und die infrarenale Aorta abdominalis dargestellt. Es erfolgt die Freilegung aller Abgänge und eine vorübergehende Legierung dieser. Bevor man die Aorta infrarenal abklemmt, erfolgt über den ZVK eine Vollheparinisierung mit 300 IE/kg KG Heparin. Danach wird eine Inzision distal der Klammer durchgeführt und das proximale Ende des Konduits mit fortlaufender 10/0 Prolene-Naht an die Aorta genäht. Die Aortenabgänge am Konduit bleiben weiterhin nur vorübergehend abgeklemmt und können zur Entlüftung des Konduits wieder geöffnet werden. Die proximale Anastomose (Abb. 1a/b, [°]) wird auf Dichtigkeit überprüft, indem man die zuvor angelegte Klammer kurz löst und so einen Blutstrom durch das Konduit erzeugt. Ist die Naht dicht und die Perfusion gewährleistet, wird auf die gleiche Weise auch eine Anastomose zwischen dem distalen Ende des Konduits und einer weiteren distalen Inzision der *Aorta abdominalis* gesetzt. Nun wird das Konduit über die supraaortalen Abgänge entlüftet und die Abgänge endgültig ligiert (Abb. 1a/b, [\*]).



#### Abb. 1: Implantation des Konduit

- (a) Implantiertes klappentragendes Konduit in einer Wistar-Ratte. End-zu-Seit-Anastomose an *infrarenaler* Abdominalaorta.
- (b) Schematische Darstellung der *infrarenalen* Implantation des klappentragenden Aortenkonduits mittels einer doppelten End-zu-Seit-Anastomose.
- P proximaler Aortenabschnitt
- ° proximale Anastomose der klappentragenden A1-Region des Kondukts
- \* Ligierte Abgänge des Aortenbogens
- → Ligierte Aorta abdominalis

Ist das Konduit erfolgreich angebracht, wird die Aorta der Empfängerratte zwischen der proximalen und distalen Anastomose, wie in Abb. 1a/b [→] abgebildet, ligiert, um so den Blutfluss über das Konduit zu lenken. Erneut werden alle Klammern gelöst und die Dichtigkeit der Anastomosen überprüft. Nach Verschließen der Bauchdecke und Entfernung des ZVK erfolgt die Ausleitung der Narkose und die Extubation des Versuchstieres. Vor der Extubation wird der Blutfluss und der Klappenschluss des Implantats in der Dopplersonographie überprüft.

#### 2.3.5 Konduit-Explantation

Die operierten Tiere werden 4 bzw. 12 Wochen lang beobachtet. Nach diesem Zeitraum werden die Konduits wieder explantiert und die Ratte unter inhalativer Vollnarkose durch Ausbluten getötet. Bevor das Konduit entnommen wird, führt man zunächst eine dopplersonografische Untersuchung des Konduits und der Funktion der darin liegenden Aortenklappe.

Nun wird die mediane Laparatomienarbe wieder eröffnet und die *infrarenalen* Aorta mit dem daran angebrachten Konduit dargestellt. Unter Vollheparinisierung mit 300 IE/kg KG Heparin über die *V. cava inferior* wird das Konduit von der *infrarenalen* Aorta getrennt und mit einem PBS-Heparin-Gemisch gespült, um mögliche Gerinnsel herauszulösen und das Thrombosieren des Blutes im Konduit zu verhindern. Die Präparate werden vom umgebenden Fett- und Bindegewebe freipräpariert und die Koronargefäßabgänge ligiert. Während der Vollnarkose wird durch eine Punktion des Herzens das Ausbluten der Versuchstiere erreicht. In den darauffolgenden Schritten wird das Konduit für die molekulargenetische Auswertung mittels PCR als Ganzes (Abb. 2) kryokonserviert. Für die histologische Auswertung wird es in vier Abschnitte, wie in Abb. 3 dargestellt, geteilt



Abbildung I2p Septemistern Kolgieite Die Konstante Abgildung I2p Septemistern Kolgieite Die Konstante Abgiltern konstante Abgiltern konstante Abgiltern and eine gleiche Länge gebracht wie die Aorta ascendens. Anschließend wird das Konduit in die vier Regionen A1, A2, B1, B2 unterteilt und die Regionen anschließend kryokonserviert.



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Konduits** Für die histologische Auswertung wird das Konduit in vier Regionen A1, A2, B1 und B2 unterteilt und die Regionen anschließend kryokonserviert.

### 2.4 Dopplersonografische Untersuchung

Zur Feststellung des Schweregrades der induzierten Aorteninsuffizienz der nativen Aortenklappen sowie der Funktionalität des implantierten klappentragendes Konduits wird bei den Ratten während der Al-Induktion, während der Implantation des Konduits als auch vor der Konduitexplantation nach 4 bzw. 12 Wochen eine dopplersonografische Untersuchung durchgeführt. Die Untersuchung, wie auch die Implantation und Explantation, wird stets von Frau Dr. med. Kathrin Assmann (geb. Schmidt) durchgeführt. So soll sichergestellt werden, dass die Durchführung der Untersuchungsmethode zwischen den einzelnen Untersuchungen möglichst wenig variiert.

Während der Al-Induktion wird die Flussgeschwindigkeit an der nativen, insuffizienten Herzklappe sowie an der Aorta abdominalis pro Zeiteinheit (VTI = velocity time integral) in der Systole (VTI I) und in der Diastole (VTI II) untersucht. Aus dem Wert während der Diastole und dem Wert während der Systole wird eine Ratio bestimmt. Diese Ratio zeigt das Ausmaß des Pendelvolumens an. Je höher die Ratio, desto größer das Pendelvolumen und damit höher der Grad der Klappeninsuffizienz. Tiere mit einer mittelgradigen Al werden in den Versuch eingeschlossen. Die dopplersonografische Untersuchung nach Implantation des Konduits soll zeigen, dass die implantierte Aortenklappe richtig schließt und funktionell einwandfrei ist. Zum Explantationszeitpunkt wird das klappentragenden Konduits nochmals überprüft und damit der funktionelle Zustand der sich darin befindenden Aortenklappen nach 4 bzw. 12 Wochen.
## 2.5 Kryokonservierung

Für die spätere histologische Auswertung wird das explantierte Präparat auf Kompressen gelagert und in vier Abschnitte geschnitten (Abb. 4, oben). Diese vier Abschnitte stellen den klappennahen Bereich (A1), den aufsteigenden Aortenbogen (A2), den absteigenden Aortenbogen (B1) und den proximalen Teil der *Aorta descendens* (B2) dar. Für die darauffolgende Bearbeitung am Kryotom werden die Abschnitte in Plastikschalen gelegt und mit einem Kryomedium (KP Cryocompound) bedeckt. Diese Präparate werden in einen Behälter mit vorher im flüssigen Stickstoff gekühlten Isopentan hineingelegt und der Behälter 30-40sek in flüssigen Stickstoff gehalten, bis das Präparat kryokonserviert ist. Für die molekularbiologische Auswertung mittels qPCR werden die Präparate als Ganzes in Mikroreaktionsgefäße gegeben und im flüssigen Stickstoff kryokonserviert. Beide Proben werden bis zur weiteren Bearbeitung in einem -80°C Schrank aufbewahrt. Für histologische, immunhistologische Auswertungen und die enzymatische Analyse mittels qPCR werden insgesamt aus 40 Tieren Aortenkonduits entnommen.



Abb. 4: Kryokonservierung

Für die Histologie wird das Konduit in vier Regionen unterteilt (oben: A1, A2, B1, B2). Diese werden in einer Plastikform mit Kryo-Compound bedeckt und im zuvor gekühlten Isopentan vorgekühlt. Das Präparat wird schließlich im Isopentanbehälter 30 Sekunden lang im flüssigen Stickstoff kryokonserviert. Für die PCR (unten) wird das ganze Konduit in einem Mikroreaktionsgefäß direkt im flüssigen Stickstoff kryokonserviert.

### 2.6 Kryotomie

Für die histologische und immunhistologische Auswertung müssen die kryokonservierten Präparate zunächst am Kryotom geschnitten werden. Für alle histologischen und immunhistologischen Färbungen werden am Kryotom 5µm dicke Gewebeschnitte des explantierten Konduits angefertigt und auf einen Objektträger aus Glas angebracht. Die Präparate werden dann bis zur weiteren Bearbeitung bzw. histologischen und immunhistologischen Färbung bei -20°C gelagert.

## 2.7 Histologie

#### 2.7.1 Allgemeines

Für die histologische Auswertung werden aus jedem Versuchsansatz Konduits aus jeweils 4 Ratten explantiert. Ein Versuchsansatz definiert sich aus dem Fütterungsansatz (Normalfutter und Futter mit Pioglitazon-Zusatz) und dem Zeitpunkt der Explantation (Explantation nach 4 und 12 Wochen). Das Konduit wird in 4 Abschnitte unterteilt (A1, A2, B1, B2) und die Abschnitte am Kryotom für die Histologie verarbeitet. Dabei entstehen 5µm dicke Schnitte, die auf Objektträgern platziert und mit verschiedenen, im folgenden aufgeführten Verfahren angefärbt werden. Mit Ausnahme der H.E.-Färbung wird pro Färbung und Region je ein Objektträger gefärbt. Bei der H.E.-Färbung werden pro Region des Konduits immer 3 Objektträger verwendet.

#### 2.7.2 Hämatoxylin Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) dient als Übersichtsfärbung, in der das saure Eosin azidophile Strukturen rot und das basische Hämatoxylin basophile Strukturen blau färbt. Damit erscheint das Zellplasma rosa bis rötlich und die Zellkerne dunkelblau bis violett. Für diese Färbung werden pro Region jeweils drei Objektträger gewählt. Die Objektträger werden zu Beginn in Hämatoxylin angefärbt und dann in destilliertes (dest.) Wasser und in 4-5%igen Eisessig gestellt. Es folgt eine Waschung in dest. Wasser und eine Waschung unter fließendem Leitungswasser. Danach werden die Objektträger in 70%igem Ethanol dehydriert und in eine alkoholhaltige Eosin-B-Lösung gestellt und angefärbt. Hiernach folgt eine stufenweise Dehydrierung und Entziehung des überschüssigen Eosins über eine aufsteigenden Ethanolreihe. Schließlich wird durch Eintauchen in Xylol das Ethanol vollständig beseitigt. Die Objektträger werden an der Luft getrocknet und mit dem synthetischen, im Xylol löslichen Einschlussmittel (*Roti® Histokitt II*) und einem Deckglas konserviert.

## 2.7.3 Intima-Media-Ratio

Mit der *Intima-Media-Ratio* (*IMR*) lässt sich auf eine mögliche Intimahyperplasie schließen. Dazu werden pro Tier und Region jeweils drei H.E. gefärbte Objektträger ausgewertet. Dabei wird auf die Auswertung der A1-Region (klappentragende Region) verzichtet, da sich hierbei die manuelle Differenzierung der *Intima* und *Media* als schwierig erweist.



Italia: Mosedarado (IIIII) Lala: Mosedarado (IIIII) Idal: Mosedarado (Jeracht Messstellen an einer Gefälannschuittrot die Media. IMR berechnet sich aus dem Quotienten aus Idal: Aussochnitt einer H.E.-Färbung (10-fache Vergrößerung): grün stellt die Intima dar, rot die Media. IMR berechnet sich aus dem Quotienten der gemessenen Dicke der Intima und Media.

Mit Hilfe der Software Fiji kann die Dicke der Intima und Media an acht Stellen (s. Abb. 5) maßstabsgerecht in µm gemessen werden. Durch eine Division (µm [Intima] / µm [Media]) wurde die *IMR* an einer Stelle des gesamten Gefäßanschnittes ermittelt. Um eine Annäherung an eine repräsentative *IMR* des gesamten vorliegenden Schnittpräparates zu bekommen, wird ein Mittelwert aus insgesamt acht *IMRs* errechnet. Für jede Region (d.i. A2, B1, B2), die je an drei Gefäßanschnitten bzw. Objektträgern vermessen wird, werden ebenfalls Mittelwerte gebildet. So entstand aus den drei Einzelwerten der Gefäßabschnitte ein repräsentativer Mittelwert für die gesamte Region.

#### 2.7.4 Von Kossa Versilberung

Die von Kossa Versilberung ermöglicht den indirekten Nachweis von Kalzium über das Anfärben von Phosphatanionen in Kalziumphosphat-Verbindungen. Dabei werden unter Bestrahlung mit Licht Phosphatsalze in Silbersalze umgewandelt, die in einem weiteren Schritt zu sichtbarem, metallischem Silberniederschlag reduziert werden. Diese Ablagerungen erkennt man an der dunkelbraunen bis schwarzen Färbung. Durch eine Gegenfärbung mit Kernechtrot (*Nuclear Fast Red*) werden die Zellkerne rot und das Zellplasma rosa gefärbt.

Für diese Färbung wird pro Region jeweils ein Objektträger gewählt. Zusätzlich zu den eigentlichen Präparaten wird bei jedem Färbegang eine Positivkontrolle mitgefärbt. Zunächst werden die Präparate bei -20°C in Aceton entwässert und fixiert. Nach Abwaschen in dest. Wasser werden die Objektträger in eine 5%ige Silbernitratlösung gestellt und mit einer Neonröhre beleuchtet. Ziel ist dabei der Austausch des Kalziums im Gewebe durch Silber. Danach wird die Silbernitratlösung mit Hilfe von dest. Wasser abgewaschen. Es folgt eine Reduktion der Silberionen zu metallischem Silber in einer Natriumkarbonat-Formaldehydlösung. Dabei bildet sich ein überschüssiger metallischer Silberniederschlag, der in einem späteren Waschschritt unter fließendem Leitungswasser von den Gewebeproben entfernt wird. Nun werden die Präparate unter möglichst lichtfreien Bedingungen in einer 5%igen Natriumthiosulfat-Lösung fixiert und das überschüssige Silber wird damit entfernt. Nach einem erneutem Waschschritt werden die Präparate mit Kernechtrot-Alluminiumsulfat gegengefärbt und in dest. Wasser gestellt. Im Anschluss findet eine Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol) statt. Die Entfernung des Ethanols von den Präparaten erreicht man durch Eintauchen in Xylol. Am Ende werden die gefärbten Präparate mit dem Roti® *Histokitt II fixiert* und mit einem Deckglas konserviert.

## 2.7.5 Von-Kossa-Score

Zur qualitativen Auswertung der Kalzifizierung bzw. der Kalziumphosphatablagerungen (Hydroxylapatit) eines Konduits wird ein bereits etablierter *Von-Kossa-Score* herangezogen und für dieses Projekt angepasst. Der Score ist in Tabelle 2 dargestellt. Pro Tier und pro Region wird ein gefärbter Anschnitt bewertet. Dazu wird dieser wie in Abb. 6 in vier Quadranten aufgeteilt und jeder dieser Quadranten wird für sich mit einer Punktzahl von mindestens 0 bis maximal 5 Punkten bewertet. In der maximalen Ausprägung kann die Kalzifizierung eines Abschnitts somit mit einem Gesamtscore von 20 Punkten bewertet werden. Die Bewertung erfolgt für Intima und Media separat.



Abb. 6: Anwendung des von-Kossa-Scores (a) Einteilung der Messbreiche im Quadranten.

#### Von Kossa Score

Punkte	Beschreibung
0	keine sichtbare Kalzifizierung / Hydroxyapatitablagerung
1	minimale bis geringe Kalzifizierung (Mikrokalk), schwache bräunliche Verfärbungen (Hinweis auf beginnende degenerative Prozesse)
2	stärkere Kalzifizierung sowie stärkere, großflächigere braune Verfärbungen
3	Kalkscholle, die <50% der Fläche im entsprechenden Quadranten einnimmt
4	Kalkscholle, die 50-75% der Fläche im entsprechenden Quadranten einnimmt
5	Kalkscholle, die >75% der Fläche im entsprechenden Quadranten einnimmt

#### Tabelle 2: von-Kossa-Score

Punktevergabe je nach Grad der Kalzifizierung für Media und Intima. Maximale Punktzahl für den gesamten Gefäßanschnitt liegt bei 20.

## 2.7.6 Alizarin Rot

Diese Alizarin Rot Färbung dient dem Nachweis von Kalziumablagerungen in Geweben oder dem Gefäßsystem. Der Anthrachinon-Farbstoff lagert sich an das Kalzium und erscheint lichtmikroskopisch rot.

Da diese Färbung eine Ergänzung zur von Kossa Färbung darstellt, wird hier ein Objektträger pro Region gewählt, auf dem sich ein Anschnitt des Präparates befindet, der räumlich möglichst nah an dem liegt, der bereits mit von Kossa gefärbt wurde. Zusätzlich zu den eigentlichen Präparaten wird bei jedem Färbegang auch eine Positivkontrolle mitgefärbt.

Für diese Färbung werden die kryokonservierten Objektträger zunächst auf Raumtemperatur gebracht und dann im 4%igen Formaldehyd fixiert. Danach werden die Präparate in der Alizarinrot-S-Lösung (pH-Wert 4,1 bis 4,3) gefärbt. Das überschüssige Alizarin wird von den Objektträgern vorsichtig abgeklopft und die Objektträger kurz in dest. Wasser eingetaucht. Es folgt eine Dehydrierung durch mehrmaliges Eintauchen in Aceton und danach in eine 1:1 Aceton-Xylol-Lösung. Am Ende werden die Präparate im Xylol gesäubert, an der Luft getrocknet und mit *Roti® Histokitt II* und einem Deckglas haltbar gemacht.

#### 2.7.7 Alizarin Flächenberechnung

Für die Bewertung von kalzifizierenden Prozessen im fortgeschrittenen Stadium wird die Alizarin Rot Färbung eingesetzt. Die angefärbten Bereiche innerhalb eines Gefäßanschnitts lassen sich mit Hilfe des Softwareprogramms Fiji berechnen und in Relation zu der Gesamtfläche, bestehend aus Intima und Media, setzen. Dieses Verhältnis gibt einen prozentualen Anteil der Summe aller kalzifizierten alizarin-positiven Flächen innerhalb eines Gefäßanschnitts pro Gesamtfläche aus Intima und Media wieder.

Für die Auswertungsmethode werden die Flächen der Intima und Media gemessen und summiert. Das Zusammenfassen der Flächen der beiden Gefäßwandbestandteile ist notwendig, da sich die Differenzierung zwischen Intima und Media in der Alizarinfärbung als schwierig erweist. Das Bild wird zunächst in eine 8-bit Graustufenversion konvertiert (Abb. 7; 1). Für die Erfassung der gewünschten Gesamtfläche wird eine *Region of interest* (*ROI*) mit dem Markierungswerkzeug *Selection Brush Tool* erfasst (Abb. 7; 2). Die Bereiche außerhalb der *ROI* werden mit Hilfe der Software herausgeschnitten (*Clear outside*) und mit dem Schwellenwertverfahren (*Threshold*) auf die Alizarin-Bereiche eingegrenzt. Der verwendete *Threshold* liegt zwischen 1 bis 120-130, je nach Intensität der Färbung (Abb. 7; 3). Mit der Partikelanalyse (*Tool: Analyze Particeles*) werden alle alizarin-positiven Flächen gemessen und zu einer Summe zusammengefasst (Abb. 7; 4). Für die Partikelanalyse wird der Messbereich zwischen 1 und unendlich eingestellt werden. Mit dem Anheben des unteren Grenzbereichs soll zumindest ein Teil der Schmutzpartikel herausgefiltert werden, da diese i.d.R. kleiner als valide Alizarin-Spots

waren. Die gemessene gesamte Alizarinfläche kann dann mit der *ROI* in Relation gesetzt werden. Das Verhältnis wird in Prozent angegeben.



#### Abb. 7: Alizarin Score Berechnung

1: Umwandlung des RGB-Bildes in 8bit-Graustufen. 2: Bestimmen der *ROI* (*region of interest*) und Messung der Gesamtoberfläche des Gewebes. Für die Auswertung war die Fläche der Media und Intima von Interesse. 3: Einstellen des *Threshold* um die alizarin-positiven Bereiche zu selektieren. 4: Messung der Gesamtfläche Alizarin positver Bereiche. Aus der gefärbten Fläche und der Gesamtfläche wurde ein Quotient gebildet und in Prozent angegeben.

#### 2.7.8 Movat Pentachrom

Die Movat-Pentachrom Färbung ist eine Übersichtsfärbung und dient der Darstellung des Bindegewebes. Hierbei werden Kerne und elastische Fasern schwarz, Muskulatur rot-blau, Kollagen und retikuläres Bindegewebe gelb, Glykosaminoglykane grün-blau und Fibrin und Fibrinoid rot gefärbt. Im Prinzip wird das Gewebe mit Alcianblau, Weigert's Eisenhämatoxylin, Crocein-Säurefuchsin sowie mit alkoholischem Safran gefärbt. Pro Region wird jeweils ein Objektträger gefärbt. Die entsprechenden Objektträger werden vorher über Nacht bei 37°C getrocknet. Eine native Aorta wird bei jedem Färbegang zusätzlich zu den eigentlichen Präparaten als Vergleichskontrolle mitgefärbt. Die zuvor über Nacht inkubierten Objektträger werden in einer 4%iger Formalinlösung fixiert und in dest. Wasser abgewaschen. Dann werden die Schnitte in eine erhitzte Bouinsche Lösung gegeben und anschließend unter fließendem kaltem Leitungswasser abgespült. Nach einer Fixierung im 5%igen Natriumthiosulfat und erneuter Spülung mit dest. Wasser werden die Präparate im 1%igen Alacianblau gefärbt. Die Präparate werden mit Leitungswasser gespült, in erhitzten alkalischen Alkohol getaucht und erneut abgespült. Die Weigert's Working Solution wird in der Zwischenzeit aus 60ml 2%iges Hämatoxylin, 40ml Eisenchlorid und 20ml Jodlösung hergestellt. Die Objektträger werden darin gefärbt und erneut mit Leitungswasser sowie mit dest. Wasser abgespült. Eine Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Working-Lösung, bestehend aus 80ml Brilliant Crocein R Stock sowie aus 20ml Säurefuchsin Stock, wird frisch angesetzt und die Präparate in der genannten Lösung gefärbt. Die angefärbten Präparate werden mit Hilfe einer 5%igen Phosphorwolframsäure differenziert und dann einmal in einer 1%igen Essigsäurelösung sowie mit dest. Wasser gespült. Danach entwässert man die Präparate in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe. Schließlich werden die Präparate im alkoholischen Safran gefärbt, in 100%igen Ethanol gespült und im Xylol entfettet. Am Ende werden die gefärbten Präparate mit dem Roti® Histokitt II und einem Deckglas konserviert.

## 2.8 Immunfluoreszenz

#### 2.8.1 vWF & aSMA

Mit dieser Färbung werden Endothelzellen bzw. Fibroblasten nachgewiesen. Das ist bei Hyperplasie oder einem strukturellen Umbau im Gefäß von Interesse. Es wird ein Objektträger pro Region gefärbt. Als Positivkontrolle wird pro Färbegang Myokard mitgefärbt, da dieses Gewebe erfahrungsgemäß besonders viel von Willebrand Faktor (vWF) und *alpha-smooth muscle actin* (*aSMA*) aufweist und damit besonders empfänglich für diese Färbung ist. Als erstes werden die Anschnitte auf den Objektträgern mit einem DAKO-Pen (Fettstift) umrandet, damit die Arbeitslösungen später innerhalb der Umrandung bleiben. Danach fixiert man die Objektträger in 4%iger Formaldehyd-Lösung. Dann werden die Objektträger in PBS gewaschen und in eine 0,25%ige Triton X-Lösung gestellt, damit die Membran der Zellen für einen besseren Zugang der Antikörper (AK) permeabilisiert wird. Die Triton X-Lösung wird mit PBS abgewaschen und die Anschnitte dann in eine Feuchtkammer gelegt und mit 5%iger BSA-Lösung blockiert. Der Proteinblock soll verhindern, dass der Primär-AK nicht unspezifisch binden kann. In der Zwischenzeit wird die Primär-AK-Lösung angesetzt. Bei einem Mischverhältnis von 1:300 wird der AK gegen von Willebrand Faktor (vWF) und der gegen alpha-smooth muscle actin (aSMA) in 1%iger BSA-Lösung gelöst und am Vortexer durchmischt. Da es eine Doppelfärbung ist, müssen die beiden AK von jeweils verschiedenen Wirten stammen (mouse und rabbit). Nach dem Proteinblock werden die Objektträger in 0,1%ige Tween-Lösung gestellt. Nun wird der Primär-AK auf die Anschnitte zu je 40 µl pipettiert. Dabei werden die linken Anschnitte mit der AK-Lösung versehen und die rechten dienen als eine Negativkontrolle - hier wird statt der AK-Lösung 1%ige BSA-Lösung pipettiert. Nun werden die Objektträger in die Feuchtkammer gelegt und bei 37°C in den Wärmeschrank gestellt. Der Sekundär-AK wird mit einem Mischverhältnis von 1:200 aus dem AK Alexa 488 und Alexa 546 in 1%iger BSA-Lösung gelöst und am Vortexmischer durchmischt. Danach werden die Objektträger erneut in 0,1%ige Tween-Lösung gestellt. Anschließend wird auf jeden Anschnitt (sowohl auf die Positiv- als auch auf die Negativkontrolle) die Sekundär-AK-Lösung zu je 40µl unter abgedunkelten Lichtverhältnissen pipettiert. Der Sekundär-AK muss dabei auf den Primär-AK abgestimmt sein - d.h. anti-mouse bzw. anti-rabbit. Die Objektträger kommen wieder in die Feuchtkammer und in den Wärmeschrank. Nach dem Sekundär-AK färbt man die Präparate mit DAPI bei einer Verdünnung von 1:1000. Als letztes werden die Objektträger in PBS und in dest. Wasser gewaschen. Im Anschluss werden diese kurz in 100%igen EtOH getaucht und mit dem Leica Mounting Medium sowie einem Deckplättchen konserviert.

#### 2.8.2 CD3 / CD68

Mit der CD3 / CD68 Doppelfärbung lässt sich die Expression von entzündlichen Oberflächenmarkern bestimmen. Das CD3 ist ein Transmembranprotein der T-Lymphozyten und das CD68 ist ein für Makrophagen spezifisches Oberflächenprotein. Die Schnittdicke der Präparate ist bei 5µm und gefärbt wird ein Objektträger pro Region. Als Positivkontrolle färbt man ein Milzpräparat. Das Milzpräparat als sekundär lymphatisches Organ bietet mit der roten und weißen Pulpa eine hohe Dichte an Makrophagen sowie T- und B-Lymphozyten. Daher eignet sich das Präparat gut zum Nachweis der Oberflächenmarkern CD3 an T-Lymphozyten und CD68 an Makrophagen. Die Färbung läuft wie die Doppelfärbung von vWF und *aSMA* nach dem gleichen Protokoll ab. Hier verwendet man die Primär-AK gegen CD3 (*rabbit*) und CD68 (*mouse*). CD3 wird in einem Verhältnis von 1:300 und CD68 in einem Verhältnis von 1:200 verdünnt. Die Sekundär-AK werden bei 1:200 verdünnt und sind gegen den entsprechenden Wirt des Primär-AK gerichtet.

#### 2.8.3 CD3 / CD68 Zellzählung

Die semiquantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung von CD3- und CD68-Oberflächenmarkern dient der Einschätzung der Inflammation der Zellen im Bereich der Intima und Media. Hierbei werden Zellen in einem repräsentativen Bildabschnitt ausgezählt und dann in Relation zu den CD3- bzw. CD68-positiven Zelle gesetzt. So sollte ein Verhältnis zwischen der Gesamtzellzahl und der immunreaktiven Prozesse der T-Zellassoziierten Inflammation sowie der Makrophagen-assoziierten Inflammation berechnet werden.

Für die Auswertung werden Fotoaufnahmen der gefärbten Präparate in 40-facher Vergrößerung als *Overlay* und als Einzelaufnahmen angefertigt. Dafür werden die gefärbten Gefäßanschnitte in 4 Quadranten unterteilt und es wurde pro Quadrant ein repräsentatives Bild erstellt. Mit Hilfe des Programms Fiji werden die Zellkerne in der DAPI-Teilaufnahme vollautomatisiert gezählt. Dazu wird das Bild in 8bit-Graustufen eingestellt und ein Threshold bestimmt, mit dem dann über das Tool "Analzye Particles" die Anzahl der Zellkerne bestimmt werden (Abb. 8).



#### Abb. 8: DAPI- Zellzählung

1: Umwandlung des RGB-Bildes der in 8bit-Graustufen. Ggf. wird eine *ROI* eingestellt, um nur die Media und Intima zu erfassen. 2: Einstellen des *Threshold* um die Zellen zu selektieren. 3: Nahe liegende Zellen, die im *Threshold* als ein großer Fleck imponieren, können geteilt werden. Dies geschieht durch das Plug-In "*Watershed"*. 4: Automatisierte Zellzählung mit dem Plug-In "*Aanalyze Particles"*. Hierfür wurde die Mindestgröße der Partikel auf 400µm<sup>2</sup> eingestellt, um kleinere Schmutzpartikel von der Zählung auszuschließen. 5: Die Anzahl der Zellen im entsprechenden Quadranten wird in der Spalte "*Count"* angezeigt.



Abbildung 11: CD3 / CD68 - Manuelle Zählung

Die Zählung CD3 bzw. CD68 positiver Zellen erfolge manuell. Als Hilfestellung wurde ein Raster verwendet. Die Zählung erfolgte bei jedem Quadranten doppelt, um, die Ungenauigkeit zu reduzieren. Links: Mit einem grünem Fluoreszenzfarbstoff gefärbte CD3 positive Zellen. Rechts: Mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gefärbte CD68 positive Zellen. Anzahl der Quadranten geteilt und so auf einen finalen Mittelwert für eine Region (A1-B2) gebracht.



#### Abb. 9: CD3 / CD68 - Manuelle Zählung

Vergrößerung 40-fach. Die Zählung CD3- bzw. CD68-positiver Zellen erfolge manuell. Als Hilfestellung wurde ein Raster verwendet. Die Zählung erfolgte bei jedem Quadranten doppelt, um, die Ungenauigkeit zu reduzieren. Positiv angefärbte Zellen sind exemplarisch mit einem Pfeil markiert ( $\rightarrow$ ).

(a) Mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gefärbte CD68-positive Zellen.

(b) Mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff gefärbte CD3-positive Zellen.

## 2.8.4 Syndecan-3

Mit dieser Färbung lässt sich Heparansulfat-Proteoglykan an chondralen Veränderungen bestimmen. Für diese Färbung wird ein Objektträger pro Region gefärbt. Als Positivkontrolle färbt man ein Milzpräparat, da die Milz eine ausgeprägte Expression von Syndecan-3 aufweist.

Die Färbung verläuft nach den gleichen Schritten wie die Immunfluoreszenzfärbung vWF und *aSMA* oder CD3 und CD68. Hier wird der Primärantikörper gegen Syndecan-3 (*rabbit*) in einer Verdünnung von 1:300 verwendet. Der entsprechende Sekundärantikörper, Alexa Fluor 488 mit grünem Fluoreszenzfarbstoff, wird mit einem Verhältnis von 1:200 verdünnt.

## 2.8.5 Syndecan-3-Score

Dieser *Score* basiert auf einer rein qualitativen Auswertung des gesamten gefärbten Schnittes. Die Auswertung erfolgt am gesamten Anschnitt des Präparates unter dem Mikroskop und immer einen Tag nach der Färbung, damit die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes bei der Auswertung möglichst gleichbleibt. Dabei wird in einem groben Bewertungsverfahren ein Score-Wert von 0 bis 3, je nach Signalausprägung über die Gesamtfläche des Anschnitts, bestimmt. Da es sich um eine rein qualitative Einschätzung handelt, werden die Abstufungen möglichst groß gewählt:

0 = kein Signal

1 = vereinzelte Signal-Spots

2 = Syndecan-3-positive Zellen sind auf bis zu 50% der Gesamtfläche des Anschnitts verteilt

3 = Syndecan-3-positive Zellen sind auf mehr als 50% der Gesamtfläche des Anschnitts verteilt

### 2.9 PCR

#### 2.9.1 RNA-Isolation

Um die RNA aus dem Gewebe isolieren zu können, muss das Gewebe zunächst zerkleinert bzw. homogenisiert werden. Dieser Prozess zerstört die Zellen und setzt damit den Inhalt frei. Ein Denaturierungsmittel, in dem sich das Probenmaterial während der Homogenisierung befindet, sorgt für die Lyse der Zellbestandteile und damit auch die Freisetzung des genetischen Materials. Das Homogenisieren des Gewebes mit dem Homogenisator erfolgt unter einem Abzug. Vor einer Zerkleinerung einer Probe wird der Homogenisator nach einem standardisierten Protokoll von möglichen Zellmaterial und RNA-Resten mittels EtOH und RNAse Away gereinigt. Das Homogenisieren der kryokonservierten Probe findet in TRIzol statt. Das TRIzol-Konduit-Homogenisat wird anschließend in ein 2ml Mikroreaktionsgefäß pipettiert.

Für die Phasentrennung wird Chloroform zum Homogenisat dazugegeben. Damit sich eine wässrige, eine anorganische und eine Interphase bildet, werden die Proben bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase (enthält RNA) wird in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Zu der wässrigen Phase wird in gleichen Mengen 70%iger EtOH pipettiert und gut vermischt. Als nächstes gibt man 700µl des RNA- und Ethanol-Gemischs auf eine RNeasy Säule in einem Collection-Tube und zentrifugiert diesen bei 11000rpm und 20°C. Der Durchfluss kann verworfen werden. Nun folgen mehrere Schritte an der Zentrifuge bei 11000rpm: Dabei erfolgt in mehreren Schritten die Gabe von 350µl RW1-Puffer, 75µl aus dem RDD-Puffer/DNAse *Mastermix* zum DNAse-Verdau sowie 350µl RW1-Puffer und schließlich 500µl RPE-Puffer auf die Säulen gegeben. Der Durchfluss wird jeweils verworfen. Nun werden die Einsätze mit dem Zwischenprodukt in frische 2ml Collection *Tubes* aus dem *Qiagen-Kit* gesteckt, erneut zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der Rest in ein frisches 1,5ml Mikroreaktionsgefäß aus dem *Qiagen-Kit* hineingetan. Nach vorsichtiger Gabe von 50µl RNAse-freiem Wasser aus demselben Kit auf die Membran, werden die Mikroreaktionsgefäße ein letztes Mal zentrifugiert. Der letzte Durchfluss bzw. die isolierte RNA wird bis zur RNA-Quantifizierung kryokonserviert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt anschließend am *Tecan Reader*.

#### 2.9.2 RNA-Quantifizierung

Die RNA-Proben werden auf Eis langsam aufgetaut. Die isolierte RNA wird mit Hilfe des *Tecan-Readers* und der Software *"Tecan-i-Control"* quantifiziert.

Im ersten Schritt wird 2µl RNase-freies Wasser auf die Vertiefungen der *Tecan-Reader*-Platte pipettiert, die Platte zugeklappt und in den *Tecan-Reader* gelegt. Die Vertiefungen werden im Programm mit dem *Cursor* markiert und mit der Funktion *"Start Blanking"* auf 0 gesetzt. Die Messung mit dem RNase-freiem Wasser dient der Qualitätskontrolle der Messung und kann Hinweise auf Pipettierfehler oder Verschmutzungen der Platte geben, Dann entfernt man das RNase-freie Wasser von der Platte und die aufgetauten Proben werden geschüttelt, kurz zentrifugiert und mit jeweils 2µl der RNA-Probe auf die Vertiefungen der Platte pipettiert. Die zugeklappte Platte wird in den *Tecan-Reader* zum Auswerten gelegt. Im Anschluss werden die Platten mit RNase-freiem Wasser gereinigt.

#### 2.9.3 Reverse Transkription

Zunächst wird mit Hilfe der zuvor gemessenen RNA-Konzentration im *Tecan-Reader* das Probevolumen bestimmt. Dann werden 200µl-Mikroreaktionsgefäße beschriftet und die RNA-Proben auf Eis langsam aufgetaut. Das zuvor errechnete Probenvolumen mit der umzuschreibenden RNA-Menge wird in die beschrifteten Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Die Mikroreaktionsgefäße mit RNA werden mit RNase-freiem Wasser auf 12µl aufgefüllt und zu allen Proben wird 2µl gDNA *Wipeout Buffer* gegeben. Die Mikroreaktionsgefäße werden in den Thermocycler hineingestellt und das Programm "Qua.Tect" ausgeführt. Zwischendurch werden die Proben herausgenommen und zu jeder Probe zusätzlich 5µl eines *Master-Mix*, bestehend aus 4µl *RT Buffer* und 1µl *RT Primer Mix*, hinzugegeben. Als nächstes wird 1µl Reverse Transkriptase dazugegeben. Im Anschluss werden die Proben wieder in den Thermocycler gestellt und das Programm fortgesetzt. Die Proben werden bis zur weiteren Verwertung bei -20°C gelagert.

## 2.9.4 qPCR

In der Vorbereitung wird die *Primer*-Stocklösung mit einer Konzentration von 100pmol/µl auf ein Verhältnis von 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, so dass die fertige Lösung eine Konzentration von 10pmol/µl hat. Dann wird der *GoTaqR* qPCR *Master Mix* mit *CXR Reference Dye* vermischt. Das Mischverhältnis ist dabei bei 20µl *CXR Reference Dye* pro 1ml *Mastermix*. Im nächsten Schritt verdünnt man die cDNA mit Rase-freiem Wasser, sodass die Lösung eine Konzentration von 5ng cDNA pro 1µl hat. *GoTaqR* qPCR *Master Mix* und RNase-freies werden mit cDNA zusammengemischt und mit 19,4µl pro *Well* verteilt. Zu der Gesamtlösung wird dann nachträglich die 0,6µl *Primer*-Lösung hinzugegeben. Insgesamt beträgt das Volumen eines jeden *Wells* 20µl. Die Platte wird abgedichtet und bei Bedarf bei niedriger Umdrehungszahl zentrifugiert, falls größere Blasen in den Wells zu sehen sind. Danach wird das *"StepOnePlus" Real Time PCR System* mit folgenden Einstellungen eingestellt:

- 1. Instrument: "StepOnePlus (96 Wells)"
- 2. Type: "ΔΔCt, Quantitation-Comparative CT"
- 3. Reagents: "SYBRR Green Reagents"
- 4. Ramp Speed: "Standard (2 hours to complete run)"

Im Plate Setup werden Targets (d.i. *Primer*) und Samples (d.i. Proben bzw. Wasser) benannt und die Platte entsprechend markiert. Dann legt man die Platte ein und startet den PCR-Durchgang. Die Datei wird am Ende gespeichert. Für den osteochondrogenen Umbau werden die *Primer* für Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OCN), *Bone morphogenetic protein 2* (BMP2) und *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) gewählt. Für die inflammatorischen Prozesse sind es die Marker Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1β (IL-1β), *Tumor necrosis factor alpha* (TNFα) und *Receptor for advanced*  *glycation endproducts* (RAGE). Alle verwendeten *Primer* sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Als *housekeeping* Gen wird RLP13A verwendet.

Primer	Basensequenz vorwärts	Basensequenz rückwärts
IL-6	5'-ACCACCCACAACAGACCAGT-3'	5'-AGTGCATCATCGCTGTTCAT-3'
IL-1 β	5'-AGGACCCAAGCACCTTCTTT-3'	5'-CATCATCCCACGAGTCACAG-3'
Osteopontin	5'-AAGCCTGACCCATCTCAGAA-3'	5'-ATGGCTTTCATTGGAGTTGC-3'
Osteocalcin	5'-AAGCAGGAGGGCAGTAAGGT-3'	5'-GTCCGCTAGCTCGTCACAAT-3'
RUNX2	5'-GATGACACTGCCACCTCTGA-3'	5'-GATGAAATGCCTGGGAACTG-3'
Bone Morphogenetic Protein	5'-GCTCAGCTTCCATCACGAA-3'	5'-AAGAAGCGTCGGGAAGTTTT-3'
RAGE	5'-TGAACTCACAGCCAATGTCC-3'	5'-TCAGAGGTTTCCCATCCAAG-3'
TNFa	5'-GCTCCCTCTCATCAGTTCCA-3'	5'-GCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
RPL13A (housekeeping-Gen)	5'-GAAAGGTGGTGGTTGTACGC-3'	5'-GAGACGGGTTGGTGTTCATC3'

#### Tabelle 3: Primer mit Basensequenzen:

Alle verwendeten Primer mit entsprechenden Basensequenzen. Das housekeeping Gen ist das RPL13A.

## 2.9.5 **Δ**ΔCt-Methode

Die Auswertung der PCR-Daten erfolgt mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Dabei wird zunächst die Differenz aus einem gemessenen Wert eines *Primers* und dem Wert des *housekeeping* Gens (RLP13a) berechnet ( $\Delta$ Ct = gewähltes Gen (*Primer*) - RLP13a).

Dann berechnet man die Differenz ( $\Delta\Delta$ Ct) aus dem  $\Delta$ Ct-Wert und dem Mittelwert der Expression des entsprechenden *Primers* in der Kontrollgruppe. Der  $\Delta\Delta$ Ct-Wert wird dann in die folgende Gleichung eingesetzt: relative Genexpression = 2<sup>(- $\Delta\Delta$ Ct)</sup>.

#### 2.10 Statistik

Alle Werte werden als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (*mean±SEM*) dargestellt. Alle Gruppenvergleiche wurden mit Hilfe von ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney-U-Tests, falls eine Normalverteilung der Werte nicht vorlag, analysiert und verglichen. Als Indikator für einen signifikanten Unterschied zweier Werte wurde p <0.05 angenommen. Die Datenanalyse und alle Grafiken wurden mit den Programmen GraphPad Prism 6 von Graphpad Software, CA, USA, sowie Fiji (by ImageJ) von Wayne Rasband, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA durchgeführt bzw. erstellt.

# 2.11 Materialliste

Material	Hersteller
Aceton (99,5%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. 5025.6
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr.: 8076.3
Alcianblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr. A5268
Alizarinrot S	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. 0348.3
Alkalischer Alkohol	360ml 96% Ethanol, 40ml 30% Ammoniumhydroxid
Alkoholisches Hämatoxylin 2%	10g Hämatoxylin, 500ml 96% Ethanol
Alkoholischer Safran	12g Safran du Gatinais, 200ml 100% Ethanol, 48h bei 60°C erhitzt
Ammoniumhydroxid 30%	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. CP17.1
Bouinsche Lösung	300ml Pikrinsäure, 100ml Formaldehyd 37-40%, 20ml 100% Essigsäure
Brilliant Croceine R	Waldeck, Münster, Deutschland, ArtNr. 1B-109
Brilliant Crocein R Stock	4g Brilliant Crocein R, 398ml dest. Wasser
Brillant-Crocein-Säurefuchsin-Lösung	80ml Brilliant Crocein R Stock, 20ml Säurefuchsin Stock
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr. C2432
DAKO-Pen	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, Art Nr.: S2002
Deckplättchen (24x50mm)	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland, ArtNr. K12450
Destilliertes Wasser	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Eindeckmedium (KP-Cryo-Compound)	KP Klinipath - a VWR Company, Duiven, Niederlande, ArtNr. VWRK1620-C
Eisenchlorid-Hexahydrat	VWR International bvba, Leuven, Belgien, ArtNr. 24208.237
Eisenchlorid-Lösung	12,4g Eisenchlorid-Hexahydrat, 500ml dest. Wasser, 5ml 32-37% HCl
Eosin B	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr. 861006
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. 6755.2
Ethanol 70%, 100%	VWR International bvba, Leuven, Belgien
Ethanol 96%	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol reinst. 70%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr. SZBF236EV
Formaldehyd 4%	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. P087.3
Formaldehyd <37%	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. 4979.1

GoTaq qPRC Master Mix	Promega Corporation, Madison, WI, USA, ArtNr. A6002
Hämatoxylin, Gill 3	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, ArtNr. 6765009
Heparin 5000 I.E / ml	B.Braun, Melsungen, Deutschland, Zul.Nr. 1708.00.00
Inhalationsnarkose (Isofluran-Piramal)	Actavis, Langenfeld, Deutschland, Zul.Nr. 30372.00.00
Isopentan	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. 3927.2
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr. 14996AM
Jod	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. 7335.1
Jodlösung	10g Jod, 20g Kaliumjodid, 500ml dest. Wasser
Jonosteril Infusionslösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland, Zul.Nr. 6100285.00.00
Kaliumjodid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. 6750.3
Leica Eindeckmedium	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland, ArtNr. 070937891
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, ArtNr. 1.06392.1000
Natrium-Thiosulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr. 72049
Nuclear Fast Red (Kernechtrot)	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. N069.1
Obejktträger 75x25x1mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland, Art Nr. 03-0060
PCR-Platte	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, ArtNr. 4346906
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr. P4006
Pikrinsäure	VWR International bvba, Leuven, Belgien, ArtNr. 84512.260
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art.Nr. 205313
RNAse Away	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. A998.3
RNAse-freies DNAse Set	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art.Nr. 79254
RNAse-freies Wasser	Promega Corporation, Madison, WI, USA, ArtNr. P119E
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art.Nr. 74104
Roti® Histokitt II	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. T160.1
Safran du Gatinais	Waldeck, Münster, Deutschland, ArtNr. 5A-394
Salzsäure (32-37%)	VWR International bvba, Leuven, Belgien, ArtNr. 20255.290
Säurefuchsin	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. T128.1

Säurefuchsin Stock	0,5g Säurefuchsin, 497,5ml dest. Wasser, 2,5ml 100% Essigsäure
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. 9370.2
Sprague Dawley Ratte	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschlang
Stickstoff	Linde, Dublin, Irland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr. T9284
Trizol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr. T9424
Tween 20 Detergent	Merck, Darmstadt, Deutschland, ArtNr.: 655205
Weigerts Working solution (Eisenhämatoxylin- Lösung)	60ml 2% Hämatoxylin, 40ml Eisenchlorid, 20ml Jodlösung
Wistar Ratte	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschlang
Xylol	VWR International bvba, Leuven, Belgien, ArtNr. 28975.325

# 2.12 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor 488 (anti-rabbit)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, ArtNr.: A11070
Alexa Fluor 488 (anti-rabbit)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, ArtNr.: A11008
Alexa Fluor 546 (anti-mouse)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, ArtNr.: A11030
Alexa Fluor 546 (anti-mouse)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, ArtNr.: A11003
aSMA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr.: A5228
CD3 (rabbit)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, ArtNr.: C7930
CD68 (mouse)	Abcam, Cambridge, Großbritannien, ArtNr.: ab31630
DAPI	Roth, Karlsruhe, Deutschland, ArtNr. 6335
Syndecan-3 (rabbit)	Abcam, Cambridge, Großbritannien, ArtNr.: ab63932
vWF	DAKO, Santa Clara, USA, ArtNr.: A0082

# 2.13 Software

Software	Hersteller
Endnote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
Excel	Microsoft Corporation, Redmend, WA, USA
Fiji (by ImageJ)	Wayne Rasband, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA
GIMP 2.1	The Gimp Team, University of California in Berkeley, USA
Graphpad Prism 6	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Leica Imaging Software Ver. 3.8.0	Leica, Wetzlar, Deutschland
Numbers	Apple Inc., Cupertino, CA, USA
Pages	Apple Inc., Cupertino, CA, USA
Powerpoint	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Word	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Applied Biosystems StepOne Software 2.2	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

# 2.14 Geräteliste

Geräte	Hersteller
Abzug	wrt-Laborbau GmbH & Co. KG, Stadtlohn, Deutschland, maxxima
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Model HFU700TV
Kaltlichtquelle	Karl Kaps GmbH & Co KG, Asslar, Deutschland, LVE 100
Kryotom	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland, CM 1950
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland, comfort KSD 3534
Magnetrührer mit Heizplatte	Roth, Karlsruhe, Deutschland, MH 15
Mikroskop mit Digitalkamera und Fluoreszenzlampe	Leica, Wetzlar, Deutschland, DM 2000 mit EL6000 und DFC 425C
Narkosegasanlage	UGO Basile S.R.L., Comerio, Italien, Model 7025
OP-Lampe	Leica, KL 1500 electronic
OP-Mikroskop	Karl Kaps GmbH & Co KG, Asslar, Deutschland, SLM 1
pH-Meter	Wissenschftliche Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland, ino Lab pH Level 1
Pipette 1000ul	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, StepOnePlus

Tecan Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland, Infinite M1000 Pro
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland, T3000
Tiefkühltruhe (-20°C)	AEG, Frankfurt am Main, Deutschland, AHB93331LW
Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, HERAcell 240i
Ultraschallgerät	Philips Healthcare, Hamburg, Deutschland, HD11 Ultrasound System
Vapor	Drägerwerk, Lübeck, Deutschland, vet.med.vapor
Waage (UG)	Sartorius, Göttingen, Deutschland, Basic BA 110 S
Wärmeunterlage	Witte & Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland, ThermoLux Wärmeunterlage
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland, 5804 R

## 2.15 Nachweise

## 2.15.1 Aktenzeichen für die Tierversuchsgenehmigung

Aktenzeichen 84-02.04.2017.A182, genehmigt vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) am 27.07.2017

## 2.15.2 Teilnahme an der Felasa-Tierversuchsfachkunde



HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDOR

FELASA Certificate ID: F048/16 # 0273

# CERTIFICATE

Daniel Goschmer Date of Birth: 12.07.1994 Place of Birth: Charkow

has completed with success the FELASA Accredited Course F048/16

#### Versuchstierkundliche Einführung zur Erlangung des Fachkundenachweises gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes

Theory (from 11.04.2018 to 16.05.2018) Practice (from 27.06.2018 to 29.06.2018)

Prof. Dr. Martin Sager

Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wiss. Tierschutzaufgaben, Universitätsklinikum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany

for persons carrying out procedures on animals (Function A) and euthanasia (Function D)

It covered the species mouse, rat, rabbit, dog and cat and included the additional task specific modules nr 20 Anaesthesia for minor procedures" and 22 "Principles of surgery"

The FELASA accredited course F048/16 covered according to the Directive 2010/63/EU and the related EC Guidelines (EC, 2014<sup>6</sup>) the following:

#### Modules:

Core Modules	1, 2, 3.1, 4, 5 and 6.1	
Function Modules	3.2, 6.2, 7, and 8	
Additional Task Modules	20 and 22	
Other Additional Tasks Modules	-	

#### Use of Live Animals for:

Handling teaching	mouse, rat, rabbit, dog, cat
Minor Invasive Procedures teaching	mouse, rat, rabbit, dog, cat
Date of issue: 29.06.2018 <u>UKD</u> UKD UKD UKD UKD UKD UKD UKD UKD	atskilnikum fr nichtung für schutzaufgation ager Signature av 0211 81Name, Prof. Dr. Martin Sager 22 - 40225 Dusseldorf
6 http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_a	nimals/pdf/Endorsed_E-T.pdf.

Version C / November 2015 / printed on 30/11/2015

# 3 Ergebnisse

## 3.1 In vivo Daten

#### 3.1.1 Gewicht und aufgenommene Futtermenge

Die Tiere wurden ab Beginn bis zum Explantationszeitpunkt täglich gewogen und inspiziert. Die Beobachtung des Fressverhaltens diente dem Rückschluss auf den Allgemeinzustand und das Wohlbefinden der Tiere. In allen Phasen des Tierversuches war unbedingt notwendig, das Wohlbefinden der Tiere zu beobachten um die Auswirkungen der induzierten Aortenklappeninsuffizienz (AI) im Verlauf sowie den Erfolg nach der Implantation (Impl.) bewerten zu können. Die Gewichtsentwicklung der Tiere wird in Abb. 10 dargestellt. Dabei stieg das Gewicht der Tiere in beiden Versuchsgruppen jeweils vom Zeitpunkt der Induktion der AI zum Zeitpunkt der Impl. sowie vom Zeitpunkt der Impl. zum Zeitpunkt der Explantation (Expl.) signifikant an. Dies war sowohl im Kurzzeitversuch nach 4 Wochen (PIO-Gruppe: Al vs. Impl., p<0,0001; Impl. vs. Expl. p=0,0048; Kontrollgruppe: Al vs. Impl., p<0,0001; Impl. vs. Expl., p=0,014) als auch im Langzeitversuch nach 12 Wochen zu beobachten (PIO-Gruppe: Al vs. Impl., p<0,0001; Impl. vs. Expl., p<0,0001; Kontrollgruppe: AI vs. Impl., p=0,0022; Impl. vs. Expl., p<0,0001). Insgesamt haben alle Tiere adäquat an Gewicht zugenommen. Es gab keine Unterschiede zwischen der PIO- und der Kontrollgruppe. Die Gewichtszunahme entwickelte sich äquivalent zur Futteraufnahme.

Die aufgenommene Futtermenge pro Woche und pro Ratte wird in Abb. 11 veranschaulicht. Die Versuchsansätze über 4 Wochen und 12 Wochen werden jeweils separat dargestellt. In beiden Futtergruppen war zu beobachten, dass die Futteraufnahme nach der Induktion der Aortenklappeninsuffizienz zunächst einbrach und ab der ersten Woche nach der Implantation wieder stetig anstieg.



**Abb. 10: Gewichtsverlauf; Explantation nach 4 bzw. 12 Wochen** In beiden Versuchsansätzen (links: 4 Wochen; rechts: 12 Wochen, jeweils n=10) waren zwischen beiden Futtergruppen keine Unterschiede sichtbar (jeweils zum Zeitpunkt der AI, Impl., Expl.). Innerhalb einer Futtergruppe nahmen die Tiere im Kurz- und Langzeitversuch zum jeweils nächsten Messzeitpunkt (AI, Impl., Expl.) signifikant an Gewicht zu.



**Abb. 11: Durchschnittliche Futteraufnahme pro Woche; Explantation nach 4 bzw. 12 Wochen** Links: Kurzzeitversuch, n=10. Rechts: Langzeitversuch, n=10. Ein ähnlicher Verlauf in beiden Versuchsansätzen und beiden Futtergruppen. Ein Einbruch der Futteraufnahe war nach der Induktion der Aortenklappeninsuffizienz (AI) zu beobachten. Erst nach der ersten Woche nach der Implantation des Konduit stieg die Futteraufnahme.

#### 3.1.2 Dopplersonografie

Nach der Induktion der Aortenklappeninsuffizienz (AI) ließ sich sowohl über der nativen Aortenklappe als auch in der *Aorta abdominalis* ein Pendelvolumen messen. Dabei sollte die Ratio der VTI II/ VTI I über der Klappenebene bei etwa 0,6 liegen, einer mittelgradigen AI. Der Grad der AI war innerhalb der Futtergruppen im Kurz- (Abb.12a) und im Langzeitversuch (Abb. 13a) gleichermaßen stark. Nach Implantation des Aortenkonduits war die Insuffizienz an der *nativen Aortenklappe* nach wie vor im Kurzzeitwie auch im Langzeitversuch stark ausgeprägt und in beiden Gruppen gleich. Die *VTI-Ratio* der implantierten Aortenklappe an der *Aorta abdominalis* zeigte einen vollständige

Induktion der Aorteninsuffizienz (12 Wochen) Konduit Implantation (12 Wochen) Konduit Explantation (12 Wochen) Kiappenschluss mit einem Mittelwert von VTI II/I = 0,0 im Kurzzeitversuch (Abb.12b) und ∍im zeinersuch (Abb.13b). Läge dieser Wert über 0 und entspräche damit nicht mehr emem vollständigen Klappenschluss, müssten die Tiere vom Versuch ausgeschlossen warden. Das Ziel war eine maximale Zuverlässigkeit der implantierten Aortenklappe, die für die Beobachtung der möglichen degenerativen Prozesse und deren Einflüss auf die Funktionalität der Klappe essenziell ist. Zum Zeitpunkt der Konduitexplantation im Kurzzeitversuch lag der Mittelwert von VTI II/I in der PIO-Gruppe bei 0,0 (Abb. 12c) und zeigte damit eine vollständigen Klappenschluss. Die Kontrollgruppe zeigte im Mittel eine beginnende Insuffizienz der implantierten Aortenklappe mit einem Mittelwert von VTI II/I bei 0,1186 ± 0,0653 (Abb. 12c). Im Langzeitversuch war die Insuffizienz mit einem Mittelwert von VTI II/I bei 0,213 ± 0,056 in der Kontrollgruppe signifikant stärker ausgeprägt (Abb. 13c) als in der PIO-Gruppe mit einem Mittelwert von VTI II/I bei 0,007 ± 0,005, p=0,0012.



Abb. 12: Dopplersonografische Erfassung der Aortenklappensuffizienz; Explantation nach 4 Wochen

- (a) Starkes Pendelvolumen in der nativen Aorta und in der Aorta abdominalis nach Induktion der Aortenklappeninsuffizienz; n=10.
- (b) Nachweis der Insuffizienz der nativen Aortenklappe in beiden Futtergruppen. Vollständige Suffizienz der implantierten Aortenklappe; n=10.
- (c) Beginnende Insuffizienz bei der Futtergruppe ohne Pio. Vollständige Suffizienz der Aortenklappe in der Pio-Gruppe. Keine Anzeichen für eine Insuffizienz unter Pioglitazon; ND-P-4: n=9, ND-4, n=10.



Abb. 13: Dopplersonografische Erfassung der Aortenklappensiffizienz; Explantation nach 12 Wochen

- (a) Starkes Pendelvolumen in der nativen Aorta und in der Aorta abdominalis nach Induktion der Aortenklappeninsuffizienz; n=10.
- (b) Nachweis der Insuffizienz der nativen Aortenklappe in beiden Futtergruppen. Vollständige Suffizienz der implantierten Aortenklappe; n=10.
- (c) Signifikant höhere Insuffizienz in der Kontrollgruppe; ND-P-12: n=10, ND-12, n=9.

#### 3.1.3 Serumwerte zum Zeitpunkt der Explantation

Das Blutserum der vier Gruppen wurde jeweils auf den Kalziumspiegel, den anorganischen Phosphatgehalt, das Gesamtcholesterin, die Triglyceride, sowie Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin untersucht.

Nach 4 Wochen zeigte sich ein signifikant niedrigerer Kalziumwert in der PIO-Gruppe (Abb. 14; p = 0,0341). Die Werte für das Phosphat im Serum zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Beim Vergleich der Serumwerte von Blutlipiden zwischen der PIO- und Kontrollgruppe zeigte sich innerhalb der Kontrollgruppe nach 12 Wochen ein signifikant höherer Cholesterinspiegel als nach 4 Wochen (Abb. 15; p=0,0391). Ein solcher Anstieg blieb in der PIO-Gruppe aus. Die Triglyceride waren in der PIO-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert.

Nach 12 Wochen waren die Spiegel des Kreatinins (Abb. 16; p=0,0397) und der Harnsäure (Abb. 16; p=0,0096) in der PIO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger. In der Kontrollgruppe gab es zudem einen höheren signifikanten Anstieg des Kreatinins zwischen dem 4-Wochen- und dem 12-Wochenansatz (Abb. 16; p=0,0029) als in der PIO-Gruppe (Abb. 16; p=0,0117). Auch der Anstieg der Harnsäure war in der Kontrollgruppe zwischen dem 4-Wochen- und dem 12-Wochenansatz signifikant angestiegen (Abb. 16; p=0,0024), während sich in der PIO-Gruppe kein signifikanter Anstieg zeigte. Die Serumwerte von Harnstoff waren zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikanten unterschiedlich. Alle Werte sind den Abbildungen 14, 15 und 16 für beide Explantationszeitpunkte und Futtergruppen dargestellt.



# Abb. 14: Blutserumanalyse Kalzium und anorganisches Phosphat (n=10)

Signifikante Reduzierung der Kalziumwerte nach 4 Wochen in der PIO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Keine signifikanten Unterschiede nach 12 Wochen.



#### Abb. 15: Blutserumanalyse Gesamtcholesterin, Triglyceride (n=10)

Signifikanter Anstieg des Cholesterins innerhalb der Kontrollgruppe im Vergleich des 4-Wochen- mit dem 12-Wochen-Ansatz. Keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der PIO-Gruppe nach 12 Wochen.



#### Abb. 16: Blutserumanalyse Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure (n=10)

Signifikante Reduzierung des Kreatinins und der Harnsäure nach 12 Wochen in der PIO-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und PIO-Gruppe nach 4 Wochen. Im Vergleich des 4-Wochen- mit dem 12-Wochenansatz signifikant stärkerer Anstieg des Kreatinins innerhalb der Kontrollgruppe als in der PIO-Gruppe. Innerhalb der Kontrollgruppe signifikanter Anstieg der Harnsäure, während dieser in der PIO-Gruppe ausblieb.

## 3.2 Histologie

## 3.2.1 Intima-Media-Ratio

Mit dieser Übersichtsfärbung Hämatoxylin Eosin (H.E.) ist es möglich, erste Anzeichen für kalzifizierende, hyperplastische und osteochondrogene Prozesse zu erkennen. Exemplarisch zeigt Abb. 17 diese Färbung jeweils in einer Region eines Tieres aus der PIO-Gruppe und aus der Kontrollgruppe. Dazu wurden pro Tier und Region immer drei Objektträger gefärbt, unter lichtmikroskopischer Betrachtung für eine erste Einschätzung des Kalzifizierungsgrades und einer möglichen Intimahyperplasie angeschaut, das Präparat als Ganzes in mehreren Vergrößerungen fotografiert und dann mittels der *Intima-Media-Ratio* beurteilt. Die A1 Region wurde aufgrund eingeschränkter Differenzierung zwischen der Intima und Media rausgenommen.





- a) ND-12-7, Region B2, 10-fache Vergrößerung: deutlich erkennbare Kalkschollen (\*) und osteochondrogene Veränderungen (→)
- b) ND-P-12-2, Region B2, 10-fache Vergrößerung: Ein unauffälliges Erscheinungsbild

Mit der Bestimmung einer *Intima-Media-Ratio* (*IMR*) in einem Gefäßanschnitt bzw. an einem Objektträger lässt sich auf eine mögliche Intimahyperplasie im entsprechenden Bereich schließen. Wie zuvor erwähnt wurde auf die Auswertung der A1-Region verzichtet. In Abb. 18 sind die zusammengefassten *IMRs* pro Futtergruppe und Explantationszeitpunkt dargestellt. Im Kurzzeitversuch zeigte sich zwischen der Kontrollund PIO-Gruppe keine signifikante Veränderung. Im Langzeitversuch ist die *IMR* in der PIO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant angestiegen (Abb. 18; p= 0,0165).

#### Intima-Media-Ratio





#### 3.2.2 Von-Kossa-Score

Mit dieser spezifischen Färbung lassen sich Hydroxyapatiteinlagerungen im Gefäß nachweisen und damit eine beginnende Kalzifizierung. Dabei zeigt sich vor allem in der Kontrollgruppe des Langzeitversuches eine verstärkte Kalkschollenbildung als in der PIO-Gruppe. Eine exemplarische Darstellung der Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigt Abb. 19. Hier ist zum Explantationszeitpunkt nach 12 Wochen anhand der Region B2 die unterschiedliche Ausprägung der Kalzifizierung je nach Futtergruppe zu beobachten. In Abb. 20 sind exemplarische Nahaufnahmen von Intima und Media aus beiden Futtergruppen dargestellt.

Nach 12 Wochen zeigt sich ein signifikant niedrigerer *Score* für die Intima (Abb. 21; p= 0,0075) und Media (Abb. 22; p= 0,0245) der PIO-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Nach 4 Wochen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Kalzifizierung von Intima und Media. Innerhalb der Kontrollgruppe gibt es eine signifikante Zunahme des *von-Kossa-Scores* von der 4. zur 12. Woche, sowohl für die Intima (Abb. 21; p= 0,0196) als auch Media (Abb. 22; p= 0,0276). Eine vergleichbare Zunahme gab es in der PIO-Gruppe nicht.



Exemplarische Übersicht der Kegion B2 von je einem Tier aus der Kontrollgruppe (a; ND-P-12-2) und aus der PIO-Gruppe (b; ND-12-7). Die schwarz gefärbten Kalkschollen sind beim Tier in der Kontrollgruppe ( $\rightarrow$ ) stärker ausgeprägt als in der PIO-Gruppe. 10-fache Vergrößerung.



Abb. 20: Nahaufnahme, von Kossa Färbung - Kalzifizierung nach 12 Wochen

Exemplarische Nahaufnahme einer ausgeprägten Kalzifizierung (schwarz angefärbt) der Intima (a) und der Media (c) eines Tieres aus der Kontrollgruppe und einem unauffälligen Erscheinungsbild bei einem Tier aus der PIO-Gruppe (b und d). 10-fache Vergrößerung. (Assmann et al., 2021)

#### Kalzifizierung Intima



#### Abb. 21: Von-Kossa-Score der Intima, Explantation nach 4 und 12 Wochen (n=4) Bewertung der Intima in vier Abschnitten und im

Gesamtvergleich nach dem von-Kossa-Score.

- Im Kurzzeitversuch sind keine signifikanten a) Unterschiede zu erkennen.
- Im Langzeitversuch sind keine signifikanten b) Unterschiede zu erkennen.

#### Kalzifizierung Media



#### Abb. 22: Von-Kossa-Score der Media, Explantation nach 4 und 12 Wochen (n=4)

Bewertung der Media in vier Abschnitten und im Gesamtvergleich nach dem von-Kossa-Score.

- Im Kurzzeitversuch sind keine signifikanten a) Unterschiede zu erkennen.
- Im Langzeitversuch ist eine signifikant niedrigere b) Kalzifizierung in der PIO-Gruppe zu erkennen.

## 3.2.3 Alizarin Flächenberechnung

Mit der Alizarin Rot Färbung lassen sich Kalziumablagerungen im Gewebe spezifisch rot anfärben und die kalzifizierte Fläche berechnen. Abb. 23 zeigt dabei beispielhaft den Unterschied anhand der Region B2 zwischen einem Tier aus der PIO-Gruppe und einem aus der Kontrollgruppe.





Exemplarische Darstellung der Region B2 von je einem Tier aus der Kontrollgruppe (a: ND-12-7) und aus der PIO-Gruppe (b: ND-P-12-2). Die alizarin-positiven Flächen sind beim Tier in der Kontrollgruppe (→) erkennbar größer als in der PIO-Gruppe. 10-fache Vergrößerung.

Die Konduits, die nach 4 Wochen explantiert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der PIO- und der Kontrollgruppe. Nach 12 Wochen war eine signifikante Reduktion der alizarin-positiven Flächen in der PIO-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe erkennbar (Abb. 24; p=0,0286). Zudem gab es innerhalb der Kontrollgruppe von der 4. Woche zur 12. Woche einen signifikanten Anstieg (Abb. 24; p=0,0442), während ein solcher Anstieg innerhalb der PIO-Gruppe ausblieb.



Abb. 24: Alizarin Flächenberechnung im Gesamtvergleich (n=4) Bewertung der summierten Alizarin-Bereiche in gefärbten Kryoschnitten pro Futtergruppe und pro Explantationszeitpunkt. Ein Punkt entspricht einem Mittelwert aller Regionen eines Versuchstiers. Keine signifikanten Unterschiede im Kurzzeitversuch (4 Wochen). Im Langzeitversuch (12 Wochen) gibt es eine signifikante Reduktion der alizarin-positiven Bereiche in der PIO-Gruppe. Zusätzlich eine signifikante Zunahme alizarin-positiver Bereiche im Vergleich des Kurz- und Langzeitversuchs innerhalb der Kontrollgruppe.

#### 3.2.4 Movat-Pentachrom

Die GAG-spezifische grün-blaue Färbung ist im Kurzzeitvergleich lediglich in der Klappenregion A1 zu erkennen. Die restlichen Regionen waren kaum bis minimal grünblau angefärbt. Deutlicher fällt der Unterschied im Langzeitversuch aus. Hier war eine intensivere und großflächigere grün-blaue Färbung in allen Regionen der Futtergruppe ohne Pioglitazon zu beobachten. In Abb. 25 und Abb. 26 sieht man am Beispiel von jeweils einem Tier aus beiden Futtergruppen die unterschiedliche Ausprägung der grünblauen Färbung. Während im Kurzzeitversuch (Abb. 25) die Unterschiede gering ausfallen, ist die Ausprägung der grünen Färbung im Langzeitversuch (Abb. 29) ohne Pioglitazon stärker ausgeprägt.



#### Abb. 25: Movat Pentachrom - Vergleich beider Futtergruppen im Kurzzeitversuch

Exemplarische Gegenüberstellung der Regionen eines Konduits von einem Tier pro Futtergruppe aus dem Langzeitversuch. Eine stärkere grün-bläulichen GAG-Färbung fällt in der A1 Region der Kontrollgruppe auf. 10-fache Vergrößerung. (Assmann et al., 2021)



#### Abb. 26: Movat Pentachrom - Vergleich beider Futtergruppen im Langezeitversuch

In der Kontrollgruppe erkennt man eine erhöhte Glykosaminglykaneinlagerung über den höheren grün-bläulichen Anteil über das gesamte Konduit. In der Region A1 ist dies im Gewebe der Aorta und in den Aortenklappen zu beobachten. In der PIO-Gruppe ist die Sättigung der GAG-spezifischen Färbung qualitativ betrachtet geringer. 10fache Vergrößerung. (Assmann et al., 2021)

## 3.3 Immunfluoreszenz

### 3.3.1 vWF & aSMA

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war in der PIO-Gruppe eine ausgeprägte Intimahyperplasie anzunehmen. Dies zeigte sich an der erhöhten *IMR*, bei gleichbleibender Mediadicke. Im Vergleich der gleichen Anschnitte in der H.E.-Färbung konnte man feststellen, dass bei Vorliegen einer Intimahyperplasie auch eine *alpha smooth muscle actin (aSMA)* Einlagerung zu beobachten war. Die Bereiche der Präparate, die eine Intimahyperplasie aufwiesen, hatten sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitversuch überwiegend *aSMA*-Einlagerungen in der Intima. Abb. 27 zeigt dies dabei beispielhaft an zwei Explantaten aus dem Langzeitversuch.



Abb. 27: Exemplarische Darstelllung der Intimahyperplasie und aSMA-positiven Zellen

Oben (a und b): Explantat (ND-P-12-5) nach einer 12-wöchigen Pioglitazonbehandlung und einer sichtbaren Intimahyperplasie und einem *aSMA*-positven Korrelat in der Immunfluoreszenzfärbung.

Unten: (c und d): Explantat (ND-12-9) ohne Pioglitazon nach 12 Wochen. Hier ist eine Intimahyperplasie nur vereinzelt sichtbar und die *aSMA*-positven Zellen kommen in gerigerem Maße vor.

a und c: H.E.-Färbung, 10-fache Vergrößerung

b und d: vWF/aSMA-Doppelfärbung, 20-fache Vergrößerung. Blau: DAPI-Zellkernfärbung, Rot: aSMA, Grün: von Willebrand Faktor

Während sich die Intimahyperplasie in der Kontrollgruppe in geringem Maß darstellt, zeigt diese sich in der PIO-Gruppe ausgeprägt und über die gesamte Intima erstreckend. Die Anfärbung des von-Willebrand-Faktor (vWF) zeigte trotz einiger Unterbrechung der dafür spezifischen Grünfärbung, dass die Konduits gut endothelialisiert sind. Ein Zusammenhang zwischen dem Zustand des Endothels und den hyperplastischen Bereichen der Intima war dabei nicht erkennbar.

#### 3.3.2 CD3 / CD68

CD3 war weder im Kurzzeit- noch und im Langzeitversuch zwischen den beiden Futtergruppen signifikant unterschiedlich (Abb. 28). In der Auswertung des CD68-Signals zeigte sich im Kurzzeitversuch im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der CD68-positiven Zellen in der PIO-Gruppe (Abb. 29; p=0,0303). Auch im Langzeitversuch zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe ein gleichermaßen signifikanter Rückgang von CD68-positiven Zellen unter Pioglitazon (Abb. 29; p=0,0122).



#### Abb. 28: Semiquantitative Auswertung des CD3-Signals (n=4)

Die Ausprägung des CD3-Signlas war zu keinem Explantationszeitpunkt zwischen den beiden Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich.



**CD68** 

#### Abb. 29: Semiquantitative Auswertung des CD68-Signals (n=4)

Signifikante Reduktion des CD68-Signals in der PIO-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe in beiden Explantationszeitpunkten.

## 3.3.3 Syndecan-3



Abb. 31: Chondrogener Umbau in Syndecan-3 und H.E. in der PIO-Gruppe In der H.E.-Färbung (b) gibt es keine Anzeichen für einen osteochondrogenen Umbauprozess. In der Syndecan-3-Färbung bestätigt sich diese Annahme durch ein ausbleibendes Signal. ND-P-12-2, Region B2 H.E.-Färbung (b), 10-fache Vergrößerung. Syndecan-3-Färbung (a), 40-fache Vergrößerung, Blau: DAPI-Zellkernfärbung, Grün: Syndecan-3




Ausprägung des Syndecan-3-Signals, vergeben. 12 Wochen zeigt sich in der PIO-Gruppe eine insgesamt signifikant geringere Ausprägung des Syndecan-3-Signals. Nach 4 Wochen gibt es keine Unterschiede.

## 3.4 PCR-Ergebnisse

Um den Einfluss von Pioglitazon auf die relative Genexpression von Genen, die bei inflammatorischen und osteochondrogenen Umbauprozessen eine Rolle spielen, wurde eine quantitative Messung mittels einer qPCR durchgeführt. Im Kurzzeitversuch waren die Expressionen von OPN und OCN zwischen den Futtergruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 33, 34). Im Langzeitversuch zeigte sich eine signifikante Reduktion der relativen Genexpression des OPN (Abb. 33; p=0,0022) und des OCN (Abb. 34; p=0,0152) in der PIO-Gruppe. Auch der Rückgang der Genexpression von OPN (Abb. 33; p=0,0043) und von OCN (Abb. 34; p=0,0043) war innerhalb der PIO-Gruppe von der 4. zur 12. Woche signifikant, während in der Kontrollgruppe eine solche signifikante Reduktion ausblieb.

Die Expression von RUNX2 (Abb. 35) und BMP2 (Abb. 36) zeigte sich in beiden Gruppen unverändert, sowohl im Kurzzeit- wie auch im Langzeitversuch. Man konnte jedoch eine signifikante Reduktion der Genexpression des BMP2 (Abb. 36; p=0,0152) in der PIO-Gruppe vom Kurz- zum Langzeitversuch, während die Genexpression in der Kontrollgruppe sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen unverändert blieb. Im Langzeitversuch zeigte sich unter Pioglitazon ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanter Rückgang der Expression von IL-6 (Abb. 37; p=0,0152). Anders als in der Kontrollgruppe gab es zudem in der PIO-Gruppe vom Kurz- zum Langzeitversuch auch eine signifikante Reduktion der IL-6-Expression (Abb. 37; p=0,0411). Die Expression von TNFa (Abb. 39; p=0,0087) war im Langzeitversuch in der PIO-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Es zeigte sich kein Unterschied in beiden Gruppen bezüglich der IL-1 $\beta$  (Abb. 38) und RAGE-Expression (Abb. 40), weder nach 4 noch nach 12 Wochen.



Abb. 33: Relative Genexpression von OPN (n=6) Signifikant niedrigere Expression von OPN in der PIO-Gruppe im Langzeitversuch. Zusätzlich signifikanter Rückgang innerhalb der PIO-Gruppe im Langzeitversuch verglichen mit dem Kurzzeitversuch.



Abb. 35: Relative Genexpression von RUNX2 (n=6) Keine signifikanten Veränderungen.



Abb. 34: Relative Genexpression von OCN (n=6) Signifikant niedrigere Expression von OCN in der PIO-Gruppe im Langzeitversuch. Zusätzlich signifikanter Rückgang innerhalb der PIO-Gruppe im Langzeitversuch verglichen mit dem Kurzzeitversuch.



**Abb. 36: Relative Genexpression von BMP2 (n=6)** Signifikanter Rückgang der Expression innerhalb der PIO-Gruppe im Langzeitversuch verglichen mit dem Kurzzeitversuch.



**Abb. 37: Relative Genexpression von IL-6 (n=6)** Signifikant niedrigere Expression von IL-6 in der PIO-Gruppe im Langzeitversuch und zusätzlich signifikanter Rückgang innerhalb der PIO-Gruppe im Langzeitversuch verglichen mit dem Kurzzeitversuch.



**Abb. 39: Relative Genexpression von TNFa (n=6)** Signifikant höhere Expression von IL-6 in der PIO-Gruppe als in der Kontrollgruppe im Langzeitversuch.



**Abb. 38: Relative Genexpression von IL-1β (n=6)** Keine signifikanten Veränderungen.



**Abb. 40: Relative Genexpression von RAGE (n=6)** Keine signifikanten Veränderungen.

# 4 Diskussion

## 4.1 Effekte der PPARy-Aktivierung

Diese Studie zeigt in einem Kleintiermodell an Ratten die Degeneration von biologischen Aortenklappenprothesen *in vivo* und untersucht dabei die Rolle des PPAR<sub>Y</sub>-Agonismus im Hinblick auf die Degeneration von kardiovaskulären Implantaten.

Die Gabe von Pioglitazon zeigte dabei einen protektiven Effekt über eine Reduktion kalzifizierender und inflammatorischer Prozesse in den klappentragenden Konduits.

### 4.1.1 Reduktion der Kalzifizierung durch PPARy-Agonismus

In unserer Studie konnte im Langzeitversuch in der von Kossa und in der Alizarin Färbung deutlich gezeigt werden, dass die Kalzifizierung der Konduits durch die Gabe von Pioglitazon signifikant reduziert wurde. Diese Erkenntnis deckt sich mit der Studienlage zu artherosklerotischen Vorgängen: An genetisch veränderten Mäusen mit einem LDL-Rezeptormangel konnte ein hemmender Effekt von PPARY-Agonisten auf das Fortschreiten einer Atherosklerose in nativen Gefäßen gezeigt werden (Li et al., 2000). In einer weiteren Studie an Mäusen mit inaktiviertem Apolipoprotein E konnte ein PPARY-Agonist die Ausbildung von atherosklerotischen Plaques aus makrophagischen Schaumzellen reduzieren. Dieser Vorgang wurde über eine verringerte Expression von *scavenger*-Rezeptoren vermittelt, sodass die Aufnahme von LDL in den Schaumzellen und damit das Fortschreiten der Atherosklerose gehemmt wurde (Chen et al., 2001).

Um zu klären, welche degenerativen Kalzifizierungsprozesse Einfluss auf die in der aktuellen Studie verwendeten kardiovaskulären Implantate haben, stellt sich die Frage nach den parallelen Mechanismen zwischen der Kalzifizierung von Gefäßen bei der Atherosklerose und der Degeneration von nativen und implantierten Aortenklappen.

In unserer Studie konnte im Kurzzeitversuch ein signifikant reduzierter Kalziumspiegel im Serum der PIO-Gruppe beobachtet werden. Dies kann die zu Beginn verzögerte bzw. gehemmte Kalziumeinlagerung in das Implantat erklären. Dass die Gabe von Pioglitazon Kalziumeinlagerungen ähnlich wie in unserer Studie signifikant verringern kann, konnte in einem Tierversuch an Kaninchen mit Hypercholesterinämie gezeigt werden (Li et al., 2012). Die Kalzifizierung der Aortenklappenprothesen ist ein degenerativer Prozess, bei dem es - ähnlich wie an der nativen Aortenklappen - über inflammatorische aber auch durch passive Prozesse zu Einlagerung von Kalzium kommt.

Es bestehen Ähnlichkeiten zur Atherosklerose in der Akkumulation von Lipoproteinen aber auch in der beginnenden Einlagerung von Kalzium in der frühen Phase der Aortenklappendegeneration. Je fortgeschrittener der degenerative Vorgang ist, desto stärker kommt es zur Differenzierung von Makrophagen und zur Aktivierung von T-Zellen. Dies wiederum führt zur Schaumzellbildung und zum Ausschütten von inflammatorischen Zytokinen, wie etwa IL-1, die zusammen zum *Remodeling* des Gewebes und zur Akkumulation und Aufnahme von Kalzium führen (Freeman und Otto, 2005) (Otto et al., 1994). Bei *Xenografts* führt zuerst die humorale und zelluläre Immunantwort zu einer Inflammation, bei der Makrophagen und T-Zellen eine Kalzifizierung induzieren. Dabei greifen Makrophagen die Prothesen als erstes an, da diese nicht auf HLA-Antigene angewiesen sind. Erst über die Ausschüttung von Zytokinen und Botenstoffen kommt es zu einer verzögerten T-Zell-Reaktion (Manji et al., 2006).

Des Weiteren wurde in unserer Studie die osteochondrogene Differenzierung mit Hilfe der Expression von OCN und OPN in der qPCR gemessen. Hierbei fiel die signifikant reduzierte osteochondrogene Differenzierung bei Tieren im Langzeitversuch unter Pioglitazon auf. Dabei sind signifikant erhöhte Plasma-OPN-Spiegel nicht nur bei degenerativen Prozessen in Gefäßen von Bedeutung. Die erhöhten OPN-Spiegel waren auch in Patientengruppen mit kalzifizierender Aortenklappenstenose zu beobachten, sodass ein Zusammenhang zwischen dem osteochondrogen Differenzieriungsmarker OPN und dem Fortschreiten der Aortenklappendegeneration angenommen werden kann (Sainger et al., 2012) (Shen et al., 1997).

Das von Osteoblasten gebildete Peptidhormon OCN ist ein Marker der Knochenbildung und damit üblicherweise im Knochen zu finden. Sein Vorkommen im Aortenkonduit ist damit ein Hinweis auf einen degenerativen Umbau bzw. eine Ossifizierung der Gefäßwand. Eine mögliche Korrelation zwischen der OCN-Konzentration und degenerativer Kalzifizierung im Herz-Kreislaufsystem zeigt eine Metaanalyse von Millar et al. (Millar et al., 2017). Die in unserer Studie signifikant reduzierten OCN-Spiegel deuten zusammen mit der geringeren Kalzifizierung in der PIO-Gruppe ebenfalls auf diesen Zusammenhang hin. Außerdem konnte bereits zuvor an Ratten gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPARγ zu einer geringeren Expression von OCN führt (Lin et al., 2007).

Interessant im Zusammenhang mit dem ostechondrogenen Umbau war auch der Nachweis des Syndecan-3 Proteins und der Glykosaminglykane (GAG). In der Anfärbung von Syndecan-3 konnte eine Reduktion des chondrogenen Umbauprozesses in der PIO-Gruppe nach 12 Wochen beobachtet werden. Passend zu den Ergebnissen der Syndecan-3-Färbung konnte in der Movat Pentachrom Färbung eine Tendenz zu vermehrter Bildung von GAGs und damit eine erhöhte chondrogene Differenzierung beobachtet werden. Sowohl Syndecan-3 als auch GAGs sind Marker für die frühe Phase eines chondrogenen Umbaus. GAGs sind ein wichtiger Bestandteil der Hyaluronsäure und damit ein Hinweis für das Vorkommen von Chondrozyten sind, die einen Bestandteil von osteochondrogenen Prozessen in der Aorta darstellen (Purnomo et al., 2013). Ebenso wie in dieser Studie konnten ähnliche degenerative Prozesse in einer Studie von Kurabayashi et al. gezeigt werden. Darin wurde die vermehrte Bildung von Knorpel und später der osteochondrogene Umbau auf die Differenzierung von VSMCs in Gefäßen zu chondrozytenartigen Zellen zurückgeführt (Kurabayashi, 2015).

Im Gegensatz zur bisherigen Studienlage zur Atherosklerose konnte in der aktuellen Studie die Kalzifizierung der Implantate in der PIO-Gruppe zwar signifikant reduziert werden, jedoch zeigte sich nach der Pioglitazonbehandlung im Langzeitversuch eine verstärkte Intimahyperplasie. Bisherige Studien beschreiben einen protektiven Effekt von PPARγ-Agonisten auf kardiovaskuläre Strukturen und eine mögliche Regulation der Atherosklerose. So zeigten einige Studien an Patienten mit DM2 eine Verminderung der Intimahyperplasie durch die Behandlung mit PPARγ-Agonisten (Mazzone et al., 2006) (Xiang et al., 2005). Auch Minamikawa et al. zeigten in ihrer Studie den inhibierenden Einfluss von PPARγ-Agonisten über die Messung der Intima-Media-Ratio an Patienten mit DM2 auf die Hyperplasie der Intima (Minamikawa et al., 1998). Eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden Effekt von PPARγ-Agonisten auf die Intima-Hyperplasie könnten einige Faktoren sein, in denen sich diese Arbeit von den anderen Studien unterscheidet: Zum einen beschreiben die zuvor genannten Studien in Bezug auf die Intimahyperplasie einen Effekt an Menschen mit DM2. Diese Studie dagegen wurde an Ratten durchgeführt. Im Gegensatz zur diabetischen Stoffwechsellage der Patienten in den zuvor genannten Studien wiesen die Versuchstiere einen über die Studiendauer hinweg normoglykämischen Zustand auf. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist eine andere Ausprägung des Insulin-*Sensitizing*-Effekts von Pioglitazon in einer nichtdiabetischen Stoffwechsellage und damit auf die Reduktion von *scavenger*-Rezeptoren durch den PPARy-Agonismus, für die es jedoch weiterer Studien bedarf.

Besonders hervorzuheben ist, dass in unserer Studie die Funktionalität der Aortenklappenprothese in der PIO-Gruppe keinerlei Einschränkungen hatte, während sich in der Kontrollgruppe nach 12 Wochen dopplersonografisch eine relevante Insuffizienz der Prothese zeigte. Letztendlich hat die erhöhte Hyperplasie der Intima unter Pioglitazon-Substitution keinen relevanten Einfluss auf die Funktionalität des Klappenapparates.

Zusammengefasst wies die Gruppe mit einem Pioglitazonfuttergemisch eine signifikant bessere Klappenfunktion sowie einen Rückgang der degenerativen Kalzifizierung des Implantats auf. Diese Beobachtungen bestätigen den bisher an nativen Gefäßen beobachteten protektiven Effekt von Pioglitazon auch an kardiovaskulären Implantaten. Auch Le Tourneau et al. stellten in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen Risikofaktoren für Atherosklerose und für die Stenosierung der nativen Aortenklappe und deren Einfluss auf die Entstehung einer kalzifizierten Aortenklappenstenose von biologischen Herzklappenprothesen dar (Le Tourneau et al., 2007).

### 4.1.2 Einfluss von Pioglitazon auf die Inflammation

In unserer Studie konnte die Gabe von Pioglitazon auch inflammatorische Prozesse im Konduit reduzieren und somit zur Haltbarkeit und Funktionalität des klappentragenden Konduits beitragen. Dabei wurde der Einfluss des PPARY-Agonismus u.a. auf die Expression von IL-1ß und IL-6 untersucht und es zeigte sich eine signifikante Reduktion von IL-6. Dass PPARY-Agonisten einen hemmenden Effekt auf verschiedene Bereiche der Inflammation innerhalb der kardiovaskulären Degenration haben, konnte bereits an nativen Aortenklappen in vorherigen Studien gezeigt werden. Jiang et al. zeigte in einer *in vitro* Studie an humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes eine Reduktion von IL-1ß und IL-6 nach einer Behandlung mit einem PPARY-Agonisten (Jiang et al., 1998). Weitere Studien zeigten eine Reduktion der Inflammation über eine gehemmte Expression von inflammatorischen Zytokinen: Zum einen konnte sowohl *in vitro* an alveolaren Makrophagen-Zelllinien als auch *in vivo* an einem Mausmodell eine Reduktion von inflammatorischen Zielgenen nach Gabe eines PPARγ-Agonisten beobachtet werden. Dabei spielte die PPARγ-vermittelte Inhibiton von *Egr-1* (*early growth response gene-1*), einem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, zu dessen Zielgenen u.a. IL-1ß gehört, eine Rolle (Okada et al., 2002). Zum anderen führen PPARγ-Agonisten zu einer Reduktion von T-Zell- und Makrophagen-vermittelten Ausschüttung diverser Zytokine (Marx et al., 2002) (Ricote et al., 1998). An genetisch veränderten Mäusen konnte die Gabe von PPARγ-Agonisten auch die IL-6- und IL-1ß-vermittelete VSMC-Prolifertation und damit eine Intimahyperplasie im arteriellen System herunterregulieren (Zhang et al., 2011). Ähnliche Prozesse konnten an allogenen kardiovaskulären Implantaten in Wistar-Ratten gezeigt werden, bei denen eine durch PPARγ-Agonisten reduzierte Ausschüttung von IL-6 und TNFα zu einem Rückgang der inflammatorischen Degeneration der Implantate führte (Sun et al., 2009).

Der hemmende Effekt auf die Expression von TNFa blieb in unserer Studie jedoch entgegen der aktuellen Studienlage aus. Die Expression von TNFa war in dieser Arbeit im Langzeitversuch in der PIO-Gruppe erhöht. Zuvor zeigten Li et al. in ihrer Studie an Mäusen eine Reduzierung des inflammatorischen Signalstoffes TNFa unter Pioglitazon und damit einen hemmenden Effekt auf die Atherosklerose (Li et al., 2000). Auch in anderen Studien zeigte sich der hemmende Effekt von Pioglitazon auf die Ausschüttung von TNFa. Zum einen konnte die TNFa-Konzentration in Mäusen gesenkt werden (Murakami-Nishida et al., 2019). Zum anderen wurde die Sekretion von TNFa in im Fettgewebe durch PPARy-Agonisten inhibiert (Jiang et al., 1998). Zu einer konträren Aussage kam dagegen Zhang et al.: In deren Studie kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Inhibition von PPARy zu einer reduzierten Ausschüttung von TNFa führte. Außerdem regulierte eine Stimulation der Zellen mit TNFa die Aktivität von PPARy hoch. In der gleichen Studie konnte eine durch TNFa erhöhte LDL-Transzytose in die Gefäßwand (über eine Steigerung der Rezeptordichte für LDL) und dadurch induzierte Atherosklerose in einem Mausmodell durch PPARy-Inhibitoren reduziert werden (Zhang et al., 2014). Diese Aussagen decken sich mit den Ergebnissen in unserer Studie, in der der *PPAR*y-Agonismus die TNFa-Konzentration erhöhte. Trotzdem führte dies nicht zu einer ausgeprägten Degeneration des Aortenkonduits in der PIO-Gruppe.

Auch wenn TNFα ein Zytokin ist, dessen proinflammatorische Eigenschaften bereits lange bekannt sind, sind dessen Mechanismen nicht vollständig untersucht. Bekannt ist, dass es v.a. von Makrophagen im Entzündungsprozess ausgeschüttet wird. Ein bereits beschriebener Zusammenhang besteht dabei zwischen CD3-aktivierten CD-4-T-Zellen. Diese sind für die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie etwa IFN-γ oder IL-2, zuständig. Letzte wiederum aktivieren die Sekretion von TNFα aus Makrophagen (Marx et al., 2002).

Ein Effekt auf CD3-positive T-Zellen blieb in unserer Studie durch Pioglitazon aus, während andere Studien einen Effekt in der Regulation der T-Zellantwort durch die Aktivierung von PPARγ beschrieben und einen Rückgang der spenderspezifischen T-Zell-Immunreaktion feststellten (Foryst-Ludwig et al., 2010) (Marx et al., 2002).

Eine Studie von Foryst-Ludwig et al. untersuchte das Ausmaß der T-Zellimmunantwort im Fettgewebe in adipösen Mäusen. Diese wurden mit hochkalorischer Kost gefüttert und entwickelten daraufhin eine diabetische Glucoseintoleranz, die mit einer erhöhten T-Zelldichte im Fettgewebe assoziiert war. Diese T-Zellantwort konnte mit Hilfe von PPARY-Agonisten herunterreguliert werden (Foryst-Ludwig et al., 2010). Es gibt dabei einen Zusammenhang zwischen der adipösen Stoffwechsellage und dem Ausmaß der T-Zell-Immunantwort: Gerade Adipozyten wirken in höheren Mengen, wie z.B. bei einer Adipositas, auf viele andere Gewebe proinflammatorisch und können eine Immunantwort verstärken (Maurizi et al., 2018) (Fernandez-Sanchez et al., 2011). Auch Kintscher et al. kamen ebenfalls zu der Feststellung, dass in Mäusen mit einer Insulinresistenz aufgrund einer adipösen Stoffwechsellage eine signifikant höhere Menge an proinflammatorischen T-Zellen im Fettgewebe vorkommt (Kintscher et al., 2008). Im Gegensatz zur zuvor genannten Studienlage wiesen die Versuchstiere in unserer Studie eine normoglykämischer und isokalorischer Stoffwechsellage auf, was den ausbleibenden Einfluss von PPARY-Agonisten auf die CD3-Expression erklären kann.

In der vorliegenden Studie war unter der Gabe von Pioglitazon im Langzeitversuch eine Reduktion der Infiltration mit Makrophagen zu beobachten. Zusammen mit der geringeren Kalzifizierung der Implantate darf dies in einen Zusammenhang gebracht werden.

Es ist schon seit Jahrzehnten bekannt, dass Makrophagen bei kardiovaskulären Inflammationsprozessen wie der Atherosklerose beteiligt sind. Die Monozyten-Makrophagen Reaktion stellt eines der inflammatorischen Hauptprozesse dar und ist die Ursache für die Aggregation von Lipiden sowie der Ausbildung von Schaumzellen in Gefäßwänden (Beltowski et al., 2003) (Ross, 1999). An Mäusen mit einer LDL-Rezeptordefizienz und cholesterinreicher Kost konnten in atherosklerotischen Läsionen proliferierte Makrophagen nachgewiesen werden (Lamharzi et al., 2004). In weiteren Tierversuchen an Kaninchen konnte neben der Migration von Monozyten in die Gefäßwand, die Relevanz von proliferierten Makrophagen für die Entstehung von Schaumzellen und athersoklerotischen Läsionen gezeigt werden. (Spagnoli et al., 1991) (Rosenfeld und Ross, 1990). Aikawa et al. stellten dabei in einer *in vivo* Studie an Mäusen einen Zusammenhang zwischen der Makrophagenaktivität und dem osteochondrogenen Umbau in VSMCs dar. Die Mikrokalzifizierung in der frühen Phase der Atherosklerose wurde dabei v.a. auf die inflammatorische Komponente über die Makrophagen zurückgeführt. Die Makrophagen stellen einen wichtigen Bestandteil des Degenerationskreislaufs der Gefäßwand dar: Es kommt dabei zur Kalziumeinlagerung, die in einer Stimulation der Makrophagen resultiert und diese wiederum weitere Kalziumeinlagerung induzieren (Aikawa et al., 2007).

Wie auch in unserer Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPARy dabei die Makrophagenaktivität regulieren kann. Dies zeigten Ricote et al. in einer *in vitro* Studie, in der PPARy-Agonisten die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen inhibieren konnte, indem die Expression von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, STAT und NF-kappaB, herunterreguliert wurde (Ricote et al., 1998).

Des Weiteren wurde in unserer Studie die Expression des Rezeptors für *advanced glycation endproducts* (RAGE) unter Pioglitazon untersucht. In der PIO-Gruppe konnte jedoch kein Effekt auf die RAGE-Aktivität festgestellt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung von RAGE die kardiovaskuläre Kalzifizierung begünstigt. An

diabetischen Ratten konnte gezeigt werden, dass hohe Glucosespiegel im Blut über eine nichtenzymatischen Glykierung von Lipiden und Proteinen zur Bildung von AGEs führen (Wei et al., 2013). Diese AGEs haben einen eigenen Rezeptor, den RAGE, dessen Aktivierung zu oxidativem Stress sowie zur Kalzifizierung von VSMCs und so zu kardiovaskulärer Kalzifizierung führt (Ren et al., 2009) (Tanikawa et al., 2009). Auch an Menschen zeigen sich unter Diabetikern höhere AGE-Spiegel im Blut (Katz et al., 2009). Dabei besteht auch ein Zusammenhang zwischen der AGE-Konzentration bei der Kalzifizierung von arteriellen Gefäßen und der Kalzifizierung von Aortenklappen (Baidoshvili et al., 2004).

Dass Pioglitazon bzw. die Aktivierung von PPARy einen hemmenden Effekt auf die durch RAGE vermittelten degenerativen Prozesse an kalzifizierenden Aortenklappenstenosen hat, konnte bereits *in vivo* an Kaninchen gezeigt werden (Li et al., 2012). Der protektive Effekt von PPARy-Agonisten im kardiovaskulären System wird in weiteren Studien bestätigt: So konnte an diabetischen Ratten die Reduktion der RAGE-Expression und die Reduktion einer mit Diabetes einhergehenden Myokardfibrose nachgewiesen werden (Ihm et al., 2010). Weiterhin wurde eine Reduktion des Gefäßumbaus durch Proliferation und Migration von VSMCs bei Ratten im Rahmen einer Hyperplasie der Gefäßwand nachgewiesen. Dabei fiel die Reduktion bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage deutlicher als bei Tieren mit nicht-diabetischer Stoffwechsellage aus (Wang et al., 2006). Auch an diabetischen Mäusen konnte eine durch Pioglitazon herunterregulierte RAGE-Expression in VSMCs gezeigt und so die Annahme eines prognoseverbessernden Verlaufs der Atherosklerose getroffen werden (Gao et al., 2017).

Unsere Studie untersucht im Gegensatz zu den zuvor genannten Studien, den potenziell protektiven Effekt von Pioglitazon auf kardiovaskuläre klappentragende Implantate an nativen Ratten unter Normoglykämie. Dies hat zur Folge, dass die Konzentration von *AGEs* dementsprechend nicht auf die gleiche Weise anstieg, wie dies in diabetischen oder adipösen Stoffwechsellagen (Wei et al., 2013) (Katz et al., 2009) möglich ist und damit die AGE-RAGE-Reaktion insgesamt geringer ausfällt. Es ist also anzunehmen, dass die RAGE-Regulierung durch Pioglitazon aufgrund einer normoglykämischen Stoffwechsellage unserer Versuchstiere eher von geringerer Bedeutung ist.

80

Auch die Expression von RUNX2 und BMP2 ist in dieser Studie unter Pioglitazon nicht beeinflusst worden. RUNX2 und BMP2 sind beides Faktoren, die den osteochondrogenen Umbau und damit die Kalzifizierung im kardiovaskulären Gewebe induzieren. RUNX2 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor und reguliert die Differenzierung von Osteoblasten und die Kalzifizierung von arteriellen Gefäßen. Es induziert eine Differenzierung der VSMCs zu einem osteochondrogenen Umbau während der Atherosklerose und reguliert die Infiltration von Makrophagen in die verkalkte Läsion (Lin et al., 2016) (Sun et al., 2012) (Prince et al., 2001). BMP2 ist ein wichtiger Faktor für die Bildung von Knochen- und Knorpelgewebe und in vielen Geweben vorhanden. Dieser ist auch für die Kalzifizierung von arteriellen Gefäßen bei einer Atherosklerose verantwortlich (Boström et al., 1993). Auch in Aortenklappen spielt BMP2 bei der Entwicklung einer Aortenklappenstenose eine Rolle, in dem die Klappenverkalkung u.a. durch das BMP2 hochreguliert wird (Kaden et al., 2004). In ihrer Studie an Kaninchen befasste sich Li et al. mit der Regulierung des Rezeptors für AGEs (RAGE) durch Pioglitazon. Zum einen führte die Stimulation von RAGE zu einem Anstieg von BMP2 und RUNX2. Zum anderen hat die Behandlung mit Pioglitazon zu einer verminderten Expression von RAGE geführt, sodass in Pioglitazon eine Möglichkeit zur Reduktion der Aortenklappekalzifizierung gesehen wurde (Li et al., 2012). Die Aktivierung von RAGE verursacht oxidativen Stress in VSMCs. Die Bildung von Sauerstoffradikalen führt zu einer Aktivierung von Monozyten und Makrophagen und damit zur inflammatorischen Rektion. Darunter gehört auch die Freisetzung von RUNX2 und BMP2, die in den VSMCs zu einer osteochondrogene Differenzierung induzieren (Towler, 2011). In unserer Arbeit hatte Pioglitazon keinen Einfluss auf die RAGE-Regulation. Damit ließe sich erklären, warum auch die RUNX2- und BMP2-Spiegel durch Pioglitazon unverändert blieben, da deren Ausschüttung von der Aktivierung des RAGE abhängig sind und beide Versuchsgruppen keine Unterschiede in der RAGE-Expression aufwiesen.

#### 4.1.3 Weitere Effekte von Pioglitazon

In der Auswertung des Blutserums konnte interessanterweise neben der zuvor erwähnten Reduktion des Kalziums auch eine signifikante Reduktion der Kreatinin- und der Harnsäurespiegel nach 12 Wochen festgestellt werden. Das kann ein Hinweis auf eine Besserung der Nierenfunktion sein.

Angiotenisin-II (AT-II) ist für die Regulation des Blutdrucks ein wichtiger Botenstoff. Das in der Niere gebildete Angiotensin-I (AT-I) aus Angiotensinogen wird von dem Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) im Gefäßendothel zum aktiven vasokonstriktorischen AT-II umgewandelt. AT-II hat dabei über den Angiotensin-II-Typ 1-Rezeptor (AT-1-R) Auswirkung auf das vaskuläre und kardiale Remodeling. Ist der AT-1-R überexprimiert, kann dies zu kardialer Hypertrophie, arterieller Hypertonie sowie renaler Funktionseinschränkung führen (Sugawara et al., 2001) (Newaz und Oyekan, 2001) (Paradis et al., 2000) (Yanagisawa et al., 1998). Die Expression des AT-1-R ist über das PPARy in den VSMCs regulierbar. Es konnte gezeigte werden, dass die Aktivierung von PPARy die Transkription des AT-1-R inhibierte und damit die Wirkung von AT-II verringerte (Sugawara et al., 2001). Eine Studie von Newaz et al. zeigte zudem an Ratten, bei denen mit Glycerol ein akutes Nierenversagen induziert wurde, dass eine Vorbehandlung mit PPARy-Agonisten ein Nierenversagen verhindern konnte (Newaz et al., 2006). Andere Studien zeigten ebenfalls positive Effekte von PPARy-Agonisten auf die diabetische Nephropathie durch eine Reduktion von fibrotischen Veränderungen in der Niere und damit einer Vorbeugung von Nierenversagen durch antiproliferative und antiapoptotische Eigenschaften der PPARy-Aktivierung (Lee und Han, 2010) (Toblli et al., 2009) (Okada et al., 2006).

## 4.2 Limitierende Faktoren dieser Arbeit

Für die Vorhersage des Verlaufs und die Therapieplanung von kardiovaskulären Erkrankungen beim Menschen und den damit einhergehenden degenerativen Veränderungen der Gefäße und Herzklappen ist die Erfassung von diversen Risikofaktoren, wie z.B. der Grad der Herzinsuffizienz, Nikotinabusus oder Ernährungsgewohnheiten, notwendig.

Besagte Risikofaktoren sind oft menschenspezifisch und als Folge einer zivilisierten Gesellschaft zu sehen. Das stellt eine Einschränkung in der Anwendung dieses Modells insofern am Menschen dar, dass Nagetiere, in diesem Fall Ratten, diese Art von Risikofaktoren nicht entwickeln oder durch andere Risikofaktoren mehr beeinflusst sind, als es der Mensch ist.

Bei Menschen kommt es oft erst im höheren Alter zum notwendigen Aortenklappenersatz. Das hohe Alter bedeutet oftmals das Vorhandensein von Komorbiditäten und der damit einhergehenden Polypharmazie. Beides können relevante Einflüsse auf die strukturelle Veränderung der Prothese haben.

Ein weiterer Unterschied unserer Studie im Vergleich zur Implantation beim Menschen besteht in der Lage der Prothesenimplantation. Bei den Versuchstieren wurden die klappentragenden Konduits aufgrund technischer Einschränkungen heterotop eingenäht. So wird im Tiermodell das Konduit *infrarenal* an die *Aorta abdominalis* genäht und der Blutfluss dann über das Konduit umgeleitet, während das Implantat beim Menschen direkt im *Bulbus Aortae* in einer physiologischen Lage eingenäht wird.

## 4.3 Fazit: Haltbarkeit von Herzklappenprothesen und Pioglitazon

In unserer Studie wurde zum ersten Mal der Einfluss von Pioglitazon auf die Degeneration und damit einhergehenden Haltbarkeit von kryokonservierten klappentragenden Aortenkonduits *in vivo* untersucht. Anhand eines etablierten Rattenmodells konnte die systemische Behandlung mit Pioglitazon anhand verschiedener Faktoren, wie der Inflammation, der Kalzifizierung und der Funktionalität des Aortenkonduits, untersucht werden.

Die Behandlung mit Pioglitazon konnte eine Prothesendegeneration verhindern und die Funktionalität des Klappenersatzes über die gesamte Versuchsdauer aufrechterhalten. Immunhistologisch und molekulargenetisch konnte ein Rückgang des Entzündungsprozesses festgestellt werden. Darüber hinaus war das Ausmaß der Kalzifizierung in der Intima und Media vermindert. Auch die osteochondrogene Differenzierung der Prothese war unter Pioglitazon rückläufig. Jedoch waren nicht alle am osteochondrogenen Umbau beteiligten Prozesse von der Pioglitazonbehandlung betroffen. So blieb die Regulierung von RAGE und des damit assoziierten Transkriptionsfaktor RUNX2 sowie des Signalproteins BMP2 aus.

Viele Faktoren sind für die kalzifizierende Degeneration des kardiovaskulären Systems, darunter auch der Herzklappen, verantwortlich. Die Regulierung dieser Faktoren kann eine Möglichkeit für die Reduktion degenerativer Prozesse nicht nur an nativen Aortenklappen, sondern auch an Aortenklappenprothesen sein. Für eine bessere Einordnung der Wirkung von Pioglitazon auf die Haltbarkeit biologischer kardiovaskulärer Implantate und der Übertragung der Wirkprinzipien auf den Menschen bedarf es weiterer translationaler Studien. Weitere Tierversuchsstudien können dabei helfen, Inflammation, kalzifizierende Prozesse oder die Intimahyperplasie genauer zu analysieren, auch unter der Berücksichtigung weiterer Risikofaktoren wie der Insulinresistenz oder des metabolischen Syndroms.

# 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

Aikawa, E., M. Nahrendorf, J. L. Figueiredo, F. K. Swirski, T. Shtatland, R. H. Kohler, F. A. Jaffer, M. Aikawa und R. Weissleder (2007). "Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo." Circulation **116**(24): 2841-2850.

Akhyari, P., H. Kamiya, P. Gwanmesia, H. Aubin, R. Tschierschke, S. Hoffmann, M. Karck und A. Lichtenberg (2010). "In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position." European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery **38**: 539-546.

Aronson, D. und E. J. Rayfield (2002). "How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms." Cardiovasc Diabetol **1**: 1.

Assmann, A., P. Akhyari, C. Delfs, U. Flogel, C. Jacoby, H. Kamiya und A. Lichtenberg (2012). "Development of a growing rat model for the in vivo assessment of engineered aortic conduits." J Surg Res **176**(2): 367-375.

Assmann, A., K. Horstkotter, H. Munakata, F. Schiffer, C. Delfs, K. Zwirnmann, M. Barth, P. Akhyari und A. Lichtenberg (2014). "Simvastatin does not diminish the in vivo degeneration of decellularized aortic conduits." J Cardiovasc Pharmacol **64**(4): 332-342.

Assmann, A. K., D. Goschmer, Y. Sugimura, A. Chekhoeva, M. Barth, A. Assmann, A. Lichtenberg, P. Akhyari (2021). "A Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists in Counteracting the Degeneration of Cardiovascular Grafts." Journal of Cardiovascular Pharmacology **79** (1): e103-e115.

Baidoshvili, A., H. W. Niessen, W. Stooker, R. A. Huybregts, C. E. Hack, J. A. Rauwerda, C. J. Meijer, L. Eijsman, V. W. van Hinsbergh und C. G. Schalkwijk (2004). "N(omega)-(carboxymethyl)lysine depositions in human aortic heart valves: similarities with atherosclerotic blood vessels." Atherosclerosis **174**(2): 287-292.

Bairati, A. und S. DeBiasi (1981). "Presence of a smooth muscle system in aortic valve leaflets." Anat Embryol (Berl) **161**(3): 329-340.

Baumgartner, H., V. Falk, J. J. Bax, M. De Bonis, C. Hamm, P. J. Holm, B. lung, P. Lancellotti, E. Lansac, D. Rodriguez Munoz, R. Rosenhek, J. Sjogren, P. Tornos Mas, A. Vahanian, T. Walther, O. Wendler, S. Windecker, J. L. Zamorano und E. S. C. S. D. Group (2017). "2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease." Eur Heart J **38**(36): 2739-2791.

Beckmann, A., R. Meyer, J. Lewandowski, A. Markewitz und W. Harringer (2019). "German Heart Surgery Report 2018: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery." Thorac Cardiovasc Surg **67**(5): 331-344.

Beltowski, J., G. Wojcicka und A. Jamroz (2003). "[Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in pathophysiology of the circulatory system and prospective use of agonists of these receptors in therapy]." Postepy Hig Med Dosw **57**(2): 199-217.

Biermann, A. C., J. Marzi, E. Brauchle, M. Schneider, A. Kornberger, S. Abdelaziz, J. L. Wichmann, C. T. Arendt, E. Nagel, K. G. M. Brockbank, M. Seifert, K. Schenke-Layland und U. A. Stock (2018). "Impact of T-cell-mediated immune response on xenogeneic heart valve transplantation: short-term success and mid-term failure." Eur J Cardiothorac Surg **53**(4): 784-792.

Boström, K., K. E. Watson, S. Horn, C. Wortham, I. M. Herman und L. L. Demer (1993). "Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions." J Clin Invest **91**(4): 1800-1809.

Briand, M., P. Pibarot, J. P. Despres, P. Voisine, J. G. Dumesnil, F. Dagenais und P. Mathieu (2006). "Metabolic syndrome is associated with faster degeneration of bioprosthetic valves." Circulation **114**(1 Suppl): I512-517.

Chan, V., B. K. Lam, F. D. Rubens, P. Hendry, R. Masters, T. G. Mesana und M. Ruel (2012). "Long-term evaluation of biological versus mechanical prosthesis use at reoperative aortic valve replacement." J Thorac Cardiovasc Surg **144**(1): 146-151.

Chen, J. H., C. Y. Yip, E. D. Sone und C. A. Simmons (2009). "Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential." Am J Pathol **174**(3): 1109-1119.

Chen, W., F. J. Schoen und R. J. Levy (1994). "Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves." Circulation **90**(1): 323-329.

Chen, Z., S. Ishibashi, S. Perrey, J. Osuga, T. Gotoda, T. Kitamine, Y. Tamura, H. Okazaki, N. Yahagi, Y. Iizuka, F. Shionoiri, K. Ohashi, K. Harada, H. Shimano, R. Nagai und N. Yamada (2001). "Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(3): 372-377.

Chiang, Y. P., J. Chikwe, A. J. Moskowitz, S. Itagaki, D. H. Adams und N. N. Egorova (2014). "Survival and long-term outcomes following bioprosthetic vs mechanical aortic valve replacement in patients aged 50 to 69 years." Jama **312**(13): 1323-1329.

Coffey, S., B. Cox und M. J. Williams (2014). "The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis." J Am Coll Cardiol **63**(25 Pt A): 2852-2861.

Cote, N., P. Pibarot und M. A. Clavel (2017). "Incidence, risk factors, clinical impact, and management of bioprosthesis structural valve degeneration." Curr Opin Cardiol **32**(2): 123-129.

DESTATIS - Statistisches Bundesamt (2017) "Todesursachen in Deutschland." Zugriffsdatum: 23. März 2020, von https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\_inhalt.html.

Duan, S. Z., M. G. Usher und R. M. Mortensen (2008). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature." Circ Res **102**(3): 283-294.

Dunning, J., H. Gao, J. Chambers, N. Moat, G. Murphy, D. Pagano, S. Ray, J. Roxburgh und B. Bridgewater (2011). "Aortic valve surgery: marked increases in volume and significant decreases in mechanical valve use--an analysis of 41,227 patients over 5 years from the Society for Cardiothoracic Surgery in Great Britain and Ireland National database." J Thorac Cardiovasc Surg **142**(4): 776-782 e773.

Erdmann, E. (2011). Klinische Kardiologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Farivar, R. S. und L. H. Cohn (2003). "Hypercholesterolemia is a risk factor for bioprosthetic valve calcification and explantation." The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery **126**(4): 969-975.

Fernandez-Sanchez, A., E. Madrigal-Santillan, M. Bautista, J. Esquivel-Soto, A. Morales-Gonzalez, C. Esquivel-Chirino, I. Durante-Montiel, G. Sanchez-Rivera, C. Valadez-Vega und J. A. Morales-Gonzalez (2011). "Inflammation, oxidative stress, and obesity." Int J Mol Sci **12**(5): 3117-3132.

Foroutan, F., G. H. Guyatt, K. O'Brien, E. Bain, M. Stein, S. Bhagra, D. Sit, R. Kamran, Y. Chang, T. Devji, H. Mir, V. Manja, T. Schofield, R. A. Siemieniuk, T. Agoritsas, R. Bagur, C. M. Otto und P. O. Vandvik (2016). "Prognosis after surgical replacement with a bioprosthetic aortic valve in patients with severe symptomatic aortic stenosis: systematic review of observational studies." BMJ **354**: i5065.

Foryst-Ludwig, A., M. Hartge, M. Clemenz, C. Sprang, K. Hess, N. Marx, T. Unger und U. Kintscher (2010). "PPARgamma activation attenuates T-lymphocyte-dependent inflammation of adipose tissue and development of insulin resistance in obese mice." Cardiovasc Diabetol **9**: 64.

Freeman, R. V. und C. M. Otto (2005). "Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies." Circulation **111**(24): 3316-3326.

Gao, H., H. Li, W. Li, X. Shen und B. Di (2017). "Pioglitazone Attenuates Atherosclerosis in Diabetic Mice by Inhibition of Receptor for Advanced Glycation End-Product (RAGE) Signaling." Med Sci Monit **23**: 6121-6131.

Goldbarg, S. H., S. Elmariah, M. A. Miller und V. Fuster (2007). "Insights into degenerative aortic valve disease." J Am Coll Cardiol **50**(13): 1205-1213.

Hammermeister, K., G. K. Sethi, W. G. Henderson, F. L. Grover, C. Oprian und S. H. Rahimtoola (2000). "Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial." Journal of the American College of Cardiology **36**(4): 1152-1158.

Herold, G. (2017). Innere Medizin.

Hoekstra, F., C. Knoop, L. Vaessen, C. Wassenaar, N. Jutte, E. Bos, A. Bogers und W. Weimar (1996). "Donor-specific cellular immune response against human cardiac valve allografts." J Thorac Cardiovasc Surg **112**(2): 281-286.

Hogan, P., L. Duplock, M. Green, S. Smith, K. L. Gall, I. H. Frazer und M. F. O'Brien (1996). "Human aortic valve allografts elicit a donor-specific immune response." J Thorac Cardiovasc Surg **112**(5): 1260-1266; discussion 1266-1267.

Hsueh, W. A. und R. E. Law (2001). "PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(12): 1891-1895.

Ihm, S. H., K. Chang, H. Y. Kim, S. H. Baek, H. J. Youn, K. B. Seung und J. H. Kim (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation attenuates cardiac fibrosis in type 2 diabetic rats: the effect of rosiglitazone on myocardial expression of receptor for advanced glycation end products and of connective tissue growth factor." Basic Res Cardiol **105**(3): 399-407.

Isaacs, A. J., J. Shuhaiber, A. Salemi, O. W. Isom und A. Sedrakyan (2015). "National trends in utilization and in-hospital outcomes of mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacements." J Thorac Cardiovasc Surg **149**(5): 1262-1269 e1263.

lung, B. (2003). "A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease." European Heart Journal **24**(13): 1231-1243.

lung, B. und A. Vahanian (2014). "Epidemiology of acquired valvular heart disease." Can J Cardiol **30**(9): 962-970.

Jiang, C., A. T. Ting und B. Seed (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." Nature **391**(6662): 82-86.

Johnston, D. R., E. G. Soltesz, N. Vakil, J. Rajeswaran, E. E. Roselli, J. F. Sabik, 3rd, N. G. Smedira, L. G. Svensson, B. W. Lytle und E. H. Blackstone (2015). "Long-term durability of bioprosthetic aortic valves: implications from 12,569 implants." Ann Thorac Surg **99**(4): 1239-1247.

Jondeau, G., D. Detaint, F. Tubach, F. Arnoult, O. Milleron, F. Raoux, G. Delorme, L. Mimoun, L. Krapf, D. Hamroun, C. Beroud, C. Roy, A. Vahanian und C. Boileau (2012). "Aortic event rate in the Marfan population: a cohort study." Circulation **125**(2): 226-232.

Kaden, J. J., S. Bickelhaupt, R. Grobholz, C. F. Vahl, S. Hagl, M. Brueckmann, K. K. Haase, C. E. Dempfle und M. Borggrefe (2004). "Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis." J Heart Valve Dis **13**(4): 560-566.

Katz, R., M. J. Budoff, J. Takasu, D. M. Shavelle, A. Bertoni, R. S. Blumenthal, P. Ouyang, N. D. Wong und K. D. O'Brien (2009). "Relationship of metabolic syndrome with incident aortic valve calcium and aortic valve calcium progression: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)." Diabetes **58**(4): 813-819.

Khodeer, D. M., S. A. Zaitone, N. E. Farag und Y. M. Moustafa (2016). "Cardioprotective effect of pioglitazone in diabetic and non-diabetic rats subjected to acute myocardial infarction involves suppression of AGE-RAGE axis and inhibition of apoptosis." Can J Physiol Pharmacol **94**(5): 463-476.

Kintscher, U., M. Hartge, K. Hess, A. Foryst-Ludwig, M. Clemenz, M. Wabitsch, P. Fischer-Posovszky, T. F. Barth, D. Dragun, T. Skurk, H. Hauner, M. Bluher, T. Unger, A. M. Wolf, U. Knippschild, V. Hombach und N. Marx (2008). "T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(7): 1304-1310.

Klein, R. L., M. Laimins und M. F. Lopes-Virella (1995). "Isolation, characterization, and metabolism of the glycated and nonglycated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects." Diabetes **44**(9): 1093-1098.

Kurabayashi, M. (2015). "[Vascular Calcification - Pathological Mechanism and Clinical Application - . Role of vascular smooth muscle cells in vascular calcification]." Clin Calcium **25**(5): 661-669.

Lamharzi, N., C. B. Renard, F. Kramer, S. Pennathur, J. W. Heinecke, A. Chait und K. E. Bornfeldt (2004). "Hyperlipidemia in concert with hyperglycemia stimulates the proliferation of macrophages in atherosclerotic lesions: potential role of glucose-oxidized LDL." Diabetes **53**(12): 3217-3225.

Law, R. E., S. Goetze, X. P. Xi, S. Jackson, Y. Kawano, L. Demer, M. C. Fishbein, W. P. Meehan und W. A. Hsueh (2000). "Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells." Circulation **101**(11): 1311-1318.

Le Tourneau, T., S. Marechaux, A. Vincentelli, P. V. Ennezat, T. Modine, A. S. Polge, G. Fayad, A. Prat, H. Warembourg und G. Deklunder (2007). "Cardiovascular risk factors as predictors of early and late survival after bioprosthetic valve replacement for aortic stenosis." J Heart Valve Dis **16**(5): 483-488.

Lee, Y. J. und H. J. Han (2010). "Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3beta, Snail1, and beta-catenin in renal proximal tubule cells." Am J Physiol Renal Physiol **298**(5): F1263-1275.

Li, A. C., K. K. Brown, M. J. Silvestre, T. M. Willson, W. Palinski und C. K. Glass (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice." J Clin Invest **106**(4): 523-531.

Li, F., Z. Cai, F. Chen, X. Shi, Q. Zhang, S. Chen, J. Shi, D. W. Wang und N. Dong (2012). "Pioglitazone attenuates progression of aortic valve calcification via down-regulating receptor for advanced glycation end products." Basic Res Cardiol **107**(6): 306.

Lichtenberg, A., I. Tudorache, S. Cebotari, M. Suprunov, G. Tudorache, H. Goerler, J. K. Park, D. Hilfiker-Kleiner, S. Ringes-Lichtenberg, M. Karck, G. Brandes, A. Hilfiker und A. Haverich (2006). "Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions." Circulation **114**(1 Suppl): I559-565.

Lin, M. E., T. M. Chen, M. C. Wallingford, N. B. Nguyen, S. Yamada, C. Sawangmake, J. Zhang, M. Y. Speer und C. M. Giachelli (2016). "Runx2 deletion in smooth muscle cells inhibits vascular osteochondrogenesis and calcification but not atherosclerotic lesion formation." Cardiovasc Res **112**(2): 606-616.

Lin, T. H., R. S. Yang, C. H. Tang, C. P. Lin und W. M. Fu (2007). "PPARgamma inhibits osteogenesis via the down-regulation of the expression of COX-2 and iNOS in rats." Bone **41**(4): 562-574.

Lok, Z. S. Y. und A. N. Lyle (2019). "Osteopontin in Vascular Disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **39**(4): 613-622.

Lorusso, R., S. Gelsomino, F. Luca, G. De Cicco, G. Bille, R. Carella, E. Villa, G. Troise, M. Vigano, C. Banfi, C. Gazzaruso, P. Gagliardotto, L. Menicanti, F. Formica, G. Paolini, S. Benussi, O. Alfieri, M. Pastore, S. Ferrarese, G. Mariscalco, G. Di Credico, C. Leva, C. Russo, A. Cannata, R. Trevisan, U. Livi, R. Scrofani, C. Antona, A. Sala, G. F. Gensini, J. Maessen und A. Giustina (2012). "Type 2 diabetes mellitus is associated with faster degeneration of bioprosthetic valve: results from a propensity score-matched Italian multicenter study." Circulation **125**(4): 604-614.

Lüllmann, H., K. Mohr, M. Wehling und L. Hein (2016). Pharmakologie und Toxikologie, Thieme.

Manji, R. A., L. F. Zhu, N. K. Nijjar, D. C. Rayner, G. S. Korbutt, T. A. Churchill, R. V. Rajotte, A. Koshal und D. B. Ross (2006). "Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection." Circulation **114**(4): 318-327.

Marx, N. (2002). "PPARgamma and vascular inflammation: adding another piece to the puzzle." Circ Res **91**(5): 373-374.

Marx, N., H. Duez, J. C. Fruchart und B. Staels (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells." Circ Res **94**(9): 1168-1178.

Marx, N., B. Kehrle, K. Kohlhammer, M. Grub, W. Koenig, V. Hombach, P. Libby und J. Plutzky (2002). "PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis." Circ Res **90**(6): 703-710.

Matta, A. und N. Moussallem (2019). "Coronary artery disease is associated with valvular heart disease, but could it Be a predictive factor?" Indian Heart J **71**(3): 284-287.

Maurizi, G., L. Della Guardia, A. Maurizi und A. Poloni (2018). "Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation." J Cell Physiol **233**(1): 88-97.

Mazzone, T., P. M. Meyer, S. B. Feinstein, M. H. Davidson, G. T. Kondos, R. B. D'Agostino, Sr., A. Perez, J. C. Provost und S. M. Haffner (2006). "Effect of pioglitazone compared with glimepiride on carotid intima-media thickness in type 2 diabetes: a randomized trial." Jama **296**(21): 2572-2581.

McClure, R. S., S. McGurk, M. Cevasco, A. Maloney, I. Gosev, E. M. Wiegerinck, G. Salvio, G. Tokmaji, W. Borstlap, F. Nauta und L. H. Cohn (2014). "Late outcomes comparison of nonelderly patients with stented bioprosthetic and mechanical valves in the aortic position: a propensity-matched analysis." J Thorac Cardiovasc Surg **148**(5): 1931-1939.

Millar, S. A., H. Patel, S. I. Anderson, T. J. England und S. E. O'Sullivan (2017). "Osteocalcin, Vascular Calcification, and Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis." Front Endocrinol (Lausanne) **8**: 183.

Minamikawa, J., S. Tanaka, M. Yamauchi, D. Inoue und H. Koshiyama (1998). "Potent inhibitory effect of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1818-1820.

Mohler, E. R., M. J. Sheridan, R. Nichols, W. P. Harvey und B. F. Waller (1991). "Development and progression of aortic valve stenosis: atherosclerosis risk factors--a causal relationship? A clinical morphologic study." Clin Cardiol **14**(12): 995-999.

Munakata, H., A. Assmann, B. Poudel-Bochmann, K. Horstkotter, H. Kamiya, Y. Okita, A. Lichtenberg und P. Akhyari (2013). "Aortic conduit valve model with controlled moderate aortic regurgitation in rats: a technical modification to improve short- and long-term outcome and to increase the functional results." Circ J **77**(9): 2295-2302.

Murakami-Nishida, S., T. Matsumura, T. Senokuchi, N. Ishii, H. Kinoshita, S. Yamada, Y. Morita, S. Nishida, H. Motoshima, T. Kondo, Y. Komohara und E. Araki (2019). "Pioglitazone suppresses macrophage proliferation in apolipoprotein-E deficient mice by activating PPARgamma." Atherosclerosis **286**: 30-39.

Nagele, H., V. Doring, W. Rodiger und P. Kalmar (2000). "[Aortic valve replacement with homografts. An overview]." Herz **25**(7): 651-658.

New, S. E. und E. Aikawa (2011). "Cardiovascular calcification: an inflammatory disease." Circ J **75**(6): 1305-1313.

Newaz, M., Z. Yousefipour und A. Oyekan (2006). "Role of PPAR-gamma on the pathogenesis and vascular changes in glycerol-induced acute renal failure." Pharmacol Res **54**(3): 234-240.

Newaz, M. A. und A. O. Oyekan (2001). "Vascular responses to endothelin-1, angiotensin-II, and U46619 in glycerol-induced acute renal failure." J Cardiovasc Pharmacol **38**(4): 569-577.

Nkomo, V. T., J. M. Gardin, T. N. Skelton, J. S. Gottdiener, C. G. Scott und M. Enriquez-Sarano (2006). "Burden of valvular heart diseases: a population-based study." The Lancet **368**(9540): 1005-1011.

Nollert, G., J. Miksch, E. Kreuzer und B. Reichart (2003). "Risk factors for atherosclerosis and the degeneration of pericardial valves after aortic valve replacement." The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery **126**(4): 965-968.

Ogawa, D., T. Nomiyama, T. Nakamachi, E. B. Heywood, J. F. Stone, J. P. Berger, R. E. Law und D. Bruemmer (2006). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses telomerase activity in vascular smooth muscle cells." Circ Res **98**(7): e50-59.

Okada, M., S. F. Yan und D. J. Pinsky (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) activation suppresses ischemic induction of Egr-1 and its inflammatory gene targets." Faseb j **16**(14): 1861-1868.

Okada, T., J. Wada, K. Hida, J. Eguchi, I. Hashimoto, M. Baba, A. Yasuhara, K. Shikata und H. Makino (2006). "Thiazolidinediones ameliorate diabetic nephropathy via cell cycle-dependent mechanisms." Diabetes **55**(6): 1666-1677.

Olsson, M., M. Rosenqvist und J. Nilsson (1994). "Expression of HLA-DR antigen and smooth muscle cell differentiation markers by valvular fibroblasts in degenerative aortic stenosis." J Am Coll Cardiol **24**(7): 1664-1671.

Otto, C. M., J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, A. M. Gown und K. D. O'Brien (1994). "Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies." Circulation **90**(2): 844-853.

Paradis, P., N. Dali-Youcef, F. W. Paradis, G. Thibault und M. Nemer (2000). "Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 931-936.

Phua, W. W. T., M. X. Y. Wong, Z. Liao und N. S. Tan (2018). "An aPPARent Functional Consequence in Skeletal Muscle Physiology via Peroxisome Proliferator-Activated Receptors." Int J Mol Sci **19**(5).

Pibarot, P. und J. G. Dumesnil (2009). "Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management." Circulation **119**(7): 1034-1048.

Prince, M., C. Banerjee, A. Javed, J. Green, J. B. Lian, G. S. Stein, P. V. Bodine und B. S. Komm (2001). "Expression and regulation of Runx2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts." J Cell Biochem **80**(3): 424-440.

Purnomo, E., N. Emoto, D. A. Nugrahaningsih, K. Nakayama, K. Yagi, S. Heiden, S. Nadanaka, H. Kitagawa und K. Hirata (2013). "Glycosaminoglycan overproduction in the aorta increases aortic calcification in murine chronic kidney disease." J Am Heart Assoc **2**(5): e000405.

Rajput, F. A. und R. Zeltser (2020). Aortic Valve Replacement. StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing LLC.

Ren, X., H. Shao, Q. Wei, Z. Sun und N. Liu (2009). "Advanced glycation end-products enhance calcification in vascular smooth muscle cells." J Int Med Res **37**(3): 847-854.

Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly und C. K. Glass (1998). "The peroxisome proliferatoractivated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." Nature **391**(6662): 79-82.

Rodriguez-Gabella, T., P. Voisine, R. Puri, P. Pibarot und J. Rodes-Cabau (2017). "Aortic Bioprosthetic Valve Durability: Incidence, Mechanisms, Predictors, and Management of Surgical and Transcatheter Valve Degeneration." J Am Coll Cardiol **70**(8): 1013-1028. Rosenfeld, M. E. und R. Ross (1990). "Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits." Arteriosclerosis **10**(5): 680-687.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.

Sainger, R., J. B. Grau, P. Poggio, E. Branchetti, J. E. Bavaria, J. H. Gorman, 3rd, R. C. Gorman und G. Ferrari (2012). "Dephosphorylation of circulating human osteopontin correlates with severe valvular calcification in patients with calcific aortic valve disease." Biomarkers **17**(2): 111-118.

Schnittman, S. R., D. H. Adams, S. Itagaki, N. Toyoda, N. N. Egorova und J. Chikwe (2018). "Bioprosthetic aortic valve replacement: Revisiting prosthesis choice in patients younger than 50 years old." J Thorac Cardiovasc Surg **155**(2): 539-547 e539.

Schoen, F. J. und R. J. Levy (2005). "Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention." Ann Thorac Surg **79**(3): 1072-1080.

Scholz, H. und U. Schwabe (2005). Taschenbuch der Arzneibehandlung, Springer.

Schwartz, S. M., R. Virmani und M. E. Rosenfeld (2000). "The good smooth muscle cells in atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep **2**(5): 422-429.

Shen, M., P. Marie, D. Farge, S. Carpentier, C. De Pollak, M. Hott, L. Chen, B. Martinet und A. Carpentier (1997). "Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans." C R Acad Sci III **320**(1): 49-57.

Shetty, R., P. Pibarot, A. Audet, R. Janvier, F. Dagenais, J. Perron, C. Couture, P. Voisine, J. P. Despres und P. Mathieu (2009). "Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves." Eur J Clin Invest **39**(6): 471-480.

Silbernagl, S. und F. Lang (2013). Taschenatlas Pathophysiologie.

Sobenin, I. A., V. V. Tertov, T. Koschinsky, C. E. Bunting, E. S. Slavina, Dedov, II und A. N. Orekhov (1993). "Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells." Atherosclerosis **100**(1): 41-54.

Soler-Soler, J. und E. Galve (2000). "Worldwide perspective of valve disease." Heart **83**(6): 721-725.

Spagnoli, L. G., A. Orlandi und G. Santeusanio (1991). "Foam cells of the rabbit atherosclerotic plaque arrested in metaphase by colchicine show a macrophage phenotype." Atherosclerosis **88**(1): 87-92.

Stassano, P., L. Di Tommaso, M. Monaco, F. Iorio, P. Pepino, N. Spampinato und C. Vosa (2009). "Aortic valve replacement: a prospective randomized evaluation of mechanical versus biological valves in patients ages 55 to 70 years." J Am Coll Cardiol **54**(20): 1862-1868.

Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima und M. A. Lazar (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." Nature **409**(6818): 307-312.

Stewart, B. F., D. Siscovick, B. K. Lind, J. M. Gardin, J. S. Gottdiener, V. E. Smith, D. W. Kitzman und C. M. Otto (1997). "Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study." J Am Coll Cardiol **29**(3): 630-634.

Subramanian, V., J. Golledge, T. Ijaz, D. Bruemmer und A. Daugherty (2010). "Pioglitazoneinduced reductions in atherosclerosis occur via smooth muscle cell-specific interaction with PPAR{gamma}." Circ Res **107**(8): 953-958.

Sugawara, A., K. Takeuchi, A. Uruno, Y. Ikeda, S. Arima, M. Kudo, K. Sato, Y. Taniyama und S. Ito (2001). "Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells." Endocrinology **142**(7): 3125-3134.

Sugimura, Y., A. K. Schmidt, A. Lichtenberg, A. Assmann und P. Akhyari (2017). "A Rat Model for the In Vivo Assessment of Biological and Tissue-Engineered Valvular and Vascular Grafts." Tissue Eng Part C Methods **23**(12): 982-994.

Sun, H., X. Lu, S. Wu und W. Sun (2009). "The effects of C-reactive protein, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in rat allograft adventitial inflammation and allograft arteriosclerosis." Transplant Proc **41**(9): 3909-3912.

Sun, Y., C. H. Byon, K. Yuan, J. Chen, X. Mao, J. M. Heath, A. Javed, K. Zhang, P. G. Anderson und Y. Chen (2012). "Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification." Circ Res **111**(5): 543-552.

Takata, Y., Y. Kitami, Z. H. Yang, M. Nakamura, T. Okura und K. Hiwada (2002). "Vascular inflammation is negatively autoregulated by interaction between CCAAT/enhancer-binding protein-delta and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." Circ Res **91**(5): 427-433.

Tanikawa, T., Y. Okada, R. Tanikawa und Y. Tanaka (2009). "Advanced glycation end products induce calcification of vascular smooth muscle cells through RAGE/p38 MAPK." J Vasc Res **46**(6): 572-580.

Teshima, E., Burghard, F., Aubin, H., Assmann, A., Barth, M., Lichtenberg, A., & Akhyari, P. (2015). PPAR-gamma activation for inhibition of in vivo calcific degeneration of cardiovascular bioprostheses. In Heart Valve Society 1st Annual Meeting, Monte Carlo, Monaco.

Thiebaud, D., E. Jacot, R. A. DeFronzo, E. Maeder, E. Jequier und J. P. Felber (1982). "The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man." Diabetes **31**(11): 957-963.

Toblli, J. E., M. G. Ferrini, G. Cao, D. Vernet, M. Angerosa und N. F. Gonzalez-Cadavid (2009). "Antifibrotic effects of pioglitazone on the kidney in a rat model of type 2 diabetes mellitus." Nephrol Dial Transplant **24**(8): 2384-2391.

Towler, D. A. (2011). "Vascular calcification: it's all the RAGE!" Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(2): 237-239.

Vlassara, H., M. Brownlee, K. R. Manogue, C. A. Dinarello und A. Pasagian (1988). "Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling." Science **240**(4858): 1546-1548.

von Knobelsdorff-Brenkenhoff, F., R. F. Trauzeddel, A. J. Barker, H. Gruettner, M. Markl und J. Schulz-Menger (2014). "Blood flow characteristics in the ascending aorta after aortic valve replacement--a pilot study using 4D-flow MRI." Int J Cardiol **170**(3): 426-433.

Wang, K., Z. Zhou, M. Zhang, L. Fan, F. Forudi, X. Zhou, W. Qu, A. M. Lincoff, A. M. Schmidt, E. J. Topol und M. S. Penn (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma down-regulates receptor for advanced glycation end products and inhibits smooth muscle cell

proliferation in a diabetic and nondiabetic rat carotid artery injury model." J Pharmacol Exp Ther **317**(1): 37-43.

Wang, N., R. Yin, Y. Liu, G. Mao und F. Xi (2011). "Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in atherosclerosis: an update." Circ J **75**(3): 528-535.

Wei, Q., X. Ren, Y. Jiang, H. Jin, N. Liu und J. Li (2013). "Advanced glycation end products accelerate rat vascular calcification through RAGE/oxidative stress." BMC Cardiovasc Disord **13**: 13.

Wilhelmi, M. H., H. Mertsching, M. Wilhelmi, R. Leyh und A. Haverich (2003). "Role of inflammation in allogeneic and xenogeneic heart valve degeneration: immunohistochemical evaluation of inflammatory endothelial cell activation." J Heart Valve Dis **12**(4): 520-526.

Xiang, A. H., R. K. Peters, S. L. Kjos, C. Ochoa, A. Marroquin, J. Goico, S. Tan, C. Wang, S. P. Azen, C. R. Liu, C. H. Liu, H. N. Hodis und T. A. Buchanan (2005). "Effect of thiazolidinedione treatment on progression of subclinical atherosclerosis in premenopausal women at high risk for type 2 diabetes." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 1986-1991.

Yanagisawa, H., M. Nodera, Y. Umemori, Y. Shimoguchi und O. Wada (1998). "Role of angiotensin II, endothelin-1, and nitric oxide in HgCl2-induced acute renal failure." Toxicol Appl Pharmacol **152**(2): 315-326.

Yu, P. J., A. Skolnick, G. Ferrari, K. Heretis, P. Mignatti, G. Pintucci, B. Rosenzweig, J. Diaz-Cartelle, I. Kronzon, G. Perk, H. I. Pass, A. C. Galloway, E. A. Grossi und J. B. Grau (2009). "Correlation between plasma osteopontin levels and aortic valve calcification: potential insights into the pathogenesis of aortic valve calcification and stenosis." J Thorac Cardiovasc Surg **138**(1): 196-199.

Zhang, L. L., C. Y. Gao, C. Q. Fang, Y. J. Wang, D. Gao, G. E. Yao, J. Xiang, J. Z. Wang und J. C. Li (2011). "PPARgamma attenuates intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells." Cardiovasc Res **92**(3): 484-493.

Zhang, Y., X. Yang, F. Bian, P. Wu, S. Xing, G. Xu, W. Li, J. Chi, C. Ouyang, T. Zheng, D. Wu, Y. Zhang, Y. Li und S. Jin (2014). "TNF-alpha promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells: crosstalk between NF-kappaB and PPAR-gamma." J Mol Cell Cardiol **72**: 85-94.

Zhao, X. M., M. Green, I. H. Frazer, P. Hogan und M. F. O'Brien (1994). "Donor-specific immune response after aortic valve allografting in the rat." Ann Thorac Surg **57**(5): 1158-1163.

# 6 Danksagungen

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari, für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die Bereitstellung aller nötigen Grundlagen zur Durchführung aller Experimente sowie für die anregenden und produktiven Gespräche herzlichst bedanken.

Prof. Dr. Artur Lichtenberg, dem Leiter der Klinik für Herzchirurgie, möchte ich dafür danken, mich in seinem Forschungsteam aufgenommen und mir die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Partizipation in der Düsseldorfer Herzchirurgie gegeben zu haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Anna Kathrin Assmann: Für die herausragende und motivierende Betreuung des Projekts, die fortwährende Unterstützung in allen Situationen der Arbeit, die viele Geduld in jeder Lage und die kompetente Beratung zur Erarbeitung dieser Dissertation.

Ich danke allen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Postdocs des Labors für experimentelle Chirurgie. Ganz besonders danke ich Frau Dr. Mareike Barth, für die Organisation im Labor, alle labortechnischen Unterweisungen sowie für die Vermittlung des Dissertationsthemas.

Ein großer Dank geht an Frau Gisela Müller für jede Unterstützung bei experimentellen Arbeiten und die Einarbeitungen in die Methodik der qPCR.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitdoktoranden des Labors für experimentelle Chirurgie, die stets bereit waren zu helfen, zu motivieren und aufzuheitern. Insbesondere danke ich Vanessa Winnicki für die produktive und humorvolle Zusammenarbeit!

# 7 Eidesstattliche Versicherung

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

05.02.2023, Daniel Goschmer