

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

**Einfluss einer Streptozotocin-induzierten diabetogenen
Stoffwechsellage auf Degeneration und Umbau
von Bioprothesen-Material in einem
Biglykan-defizienten Mausmodell**

Dissertation

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

Vorgelegt von

Franziska Japes

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: PD Dr. med. Florian Simon

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Selig JI, Japes F, Fischer JW, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M (2018) *Ectopic calcification of prosthetic valve material - hyperglycaemia induces calcification, while loss of biglycan has a protective effect.* – Vortrag beim 8. zweijährigen Kongress für Herzklappenbiologie und Tissue Engineering

Selig JI, Japes F, Kueppers C, Hartwig S, Lehr S, Fischer JW, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M (2022) *Hyperglycaemia-induced degeneration of bioprosthetic valve tissue and the pivotal role of the extracellular matrix molecule biglycan.* – Poster bei der 70. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie

Zusammenfassung

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (DAVD) stellt die häufigste Pathologie der Herzklappen in den westlichen Ländern dar. Neben der Degeneration von nativen Aortenklappen sind auch die als Klappenersatz implantierten biologischen Aortenklappenprothesen von Degenerationsprozessen betroffen. Ein wesentlicher Risikofaktor für eine verstärkte und beschleunigte Degeneration von Aortenklappen, wie auch von biologischen Aortenklappenprothesen, ist die Komorbidität mit Diabetes mellitus Typ 2. Dabei ist der zur Beschleunigung der degenerativen Veränderungen führende molekulare Mechanismus weiterhin unklar. Neben zellulären Prozessen spielt auch die Veränderung der extrazellulären Matrix (EZM) eine Rolle. Es gibt Hinweise darauf, dass das Proteoglykan Biglykan dabei eine Schlüsselrolle einnehmen könnte.

Um die Zusammenhänge genauer zu verstehen, wurde mittels eines etablierten ektopen Degenerationsmodells in Biglykan-defizienten ($Bgn^{-/0}$) Mäusen und Wildtyp (WT)-Wurfgeschwistern der Einfluss einer Hyperglykämie auf biologisches Prothesenmaterial untersucht. Dafür wurde in Mäusen durch intraperitoneale Injektionen von Streptozotocin eine hyperglykämische Stoffwechsellage mit signifikant erhöhten Blutglukosespiegeln induziert. Die Vergleichstiere erhielten eine äquivalente Injektion Citratpuffer, sodass sich vier Gruppen mit insgesamt 33 Versuchstieren ergaben. Nach zwei Wochen erfolgte die subkutane Implantation von Stanzbiopsien aus glutaraldehydfixiertem Bioprothesenmaterial, das nach weiteren acht Wochen wieder entnommen wurde. Die Analyse dieser Proben im Hinblick auf inflammatorische Prozesse, Degeneration und Kalzifizierung erfolgte durch histologische und immunhistochemische Färbungen.

Mittels Übersichtsfärbungen (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, DAPI-Zellkernfärbung, Movat-Pentachrom-Färbung) wurde die Morphologie der Proben untersucht. Es zeigte sich um die Patches herum eine zweischichtige Fremdkörperkapsel variabler Dicke mit einer zellreichen Schicht innen und einer zellarmen, kollagen- und glykosaminoglykanhaltigen Schicht außen als Korrelat der wirtseigenen Immunantwort. Zudem ergab sich im Vergleich der $Bgn^{-/0}$ -Gruppen für die hyperglykämische Gruppe eine im Vergleich zur normoglykämischen Gruppe signifikant erhöhte relative Migrationstiefe muriner Zellen in das Fremdgewebe. Ein Teil dieser Zellen ließ sich mittels Immunhistochemie als Makrophagen sowie Fibroblasten charakterisieren. Unter normoglykämischen Bedingungen konnte dabei eine signifikant erhöhte Einwanderung von Makrophagen in die Prothesenstanzen aus den $Bgn^{-/0}$ -Mäusen im Vergleich zu den Prothesenstanzen der WT-Tiere detektiert werden. Myofibroblasten fanden sich nicht. Vereinzelt ließen sich in den Prothesenstanzen sowie der umgebenden Fremdkörperkapsel kleine Ansammlungen von Endothelzellen nachweisen.

Neben den zellulären Umbauprozessen wurde die Bildung von Kollagen Typ 1, Elastin, Biglykan und Decorin untersucht. Immunhistochemisch ließen sich diese EZM-Moleküle in den Prothesenstanzen sowie der umgebenden Fremdkörperkapsel darstellen. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich nicht. Tendenziell kam es in der hyperglykämischen WT-Gruppe im Vergleich zur normoglykämischen WT-Gruppe zu einer vermehrten Einlagerung von Kollagen Typ I. Die Signale für Biglykan, Decorin und Kollagen wiesen zudem eine enge räumliche Assoziation zueinander auf.

Zum Nachweis von Kalzifizierungsvorgängen wurden die Prothesenstanzen mit Alizarin-Rot sowie nach Von-Kossa gefärbt. Es ergab sich eine signifikant höhere Einlagerung von Kalzium in den Prothesenstanzen der hyperglykämischen $Bgn^{-/0}$ -Mäuse im Vergleich zu denen der normoglykämischen $Bgn^{-/0}$ -Tiere. Auch im Vergleich der WT-Mäuse zeigte sich in den mit Streptozotocin-behandelten Tieren tendenziell eine höhere Einlagerung von Kalzium. Dieses Ergebnis unterstreicht die prodegenerative Rolle einer mit Diabetes assoziierten Hyperglykämie. Vergleichend erfolgte unter Modifikation der Methoden auch die Untersuchung der nativen Aortenklappen einiger Versuchstiere. Relevante degenerative Veränderungen ließen sich hier nicht darstellen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das verwendete Degenerationsmodell in der Lage ist, degenerative Veränderungen in Bioprothesenmaterial auf histologischer Ebene zu induzieren. Die Arbeit unterstreicht zudem den Einfluss von Diabetes mellitus auf die Degeneration von Bioprothesenmaterial. Die in der Literatur postulierte prodegenerative Wirkung von Biglykan konnte nur in Teilen durch die histologische Analyse der Proben abgebildet werden. Die Erkenntnisse können zu einem tieferen Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse beitragen, welches in Zukunft interessante Ansatzpunkte zur Entwicklung von verbesserten Bioprothesen liefern könnte.

Abstract

Degenerative aortic valve disease is the most common pathology of heart valves in Western countries. In addition to the degeneration of native aortic valves, biological aortic valve prostheses implanted as valve replacements are also affected by degeneration processes. A significant risk factor for increased and accelerated degeneration of aortic valves, as well as of biological aortic valve prostheses, is the comorbidity with diabetes mellitus. The molecular mechanisms leading to this accelerated degenerative changes are still unknown. In addition to cellular processes, changes in the extracellular matrix (ECM) also play a role. There are several implications that the proteoglycan biglycan might be a key influencing factor in these processes.

In order to understand the relationships more precisely, the influence of hyperglycemia on biological prosthetic material was investigated by using an established ectopic degeneration model in biglycan-knockout(Bgn⁻⁰)-mice and wild-type(WT)-littermates. For this purpose, hyperglycemia with significantly increased blood glucose levels was induced in mice by intraperitoneal injection of streptozotocin. Animals of control groups received an equivalent injection of citrate buffer, resulting in four groups with a total of 33 animals. After two weeks, punch biopsies of glutaraldehyde-fixed bioprosthesis material were implanted subcutaneously and removed after further eight weeks. The analysis of these samples with regard to inflammatory processes, degeneration and calcification was performed by histological and immunohistochemical staining.

Survey stainings (hematoxylin-eosin-staining, DAPI-nucleus-staining, Movats-pentachrome-staining) were used to examine the morphology of the samples. A bi-layered foreign body capsule of variable thickness with a cell-rich layer on the inside and a cell-poor, collagen- and glycosaminoglycan-containing layer on the outside as an indication of the host immune response was revealed around the tissue patches. In addition, a comparison of the Bgn⁻⁰ groups showed a significantly increased relative migration distance of murine cells into the tissue patches for the hyperglycemic group compared to the normoglycemic group. Some of these cells could be defined as macrophages and fibroblasts by immunohistochemistry. Under normoglycemic conditions a significantly increased migration of macrophages into the tissue patches of the Bgn⁻⁰ mice compared to the tissue patches of the WT mice was detected. Myofibroblasts were not found. Occasional accumulations of endothelial cells could be seen in the tissue patches and the surrounding capsule.

In addition to the cellular remodelling processes, the formation of collagen type 1, elastin, biglycan and decorin was also investigated. These ECM molecules could be visualized in tissue patches as well as in the surrounding foreign body capsule by using immunohistochemical methods. There were no significant differences between the four groups. However, there was a trend of an increased accumulation of type I collagen in the hyperglycemic WT group compared to the normoglycemic WT group. Additionally the signals for biglycan, decorin and collagen showed a close spatial association.

In order to detect calcification processes, the samples were stained with alizarin-red-staining and Von-Kossas-stainig. There was a significantly higher accumulation of calcium in the tissue patches of the hyperglycemic Bgn⁻⁰ mice compared to those of the normoglycemic Bgn⁻⁰ mice. A comparison of the wild-type mice also showed a trend of higher calcium accumulation in the streptozotocin-treated mice. This result underlines the pro-calcific role of a diabetes associated hyperglycemia.

Comparatively, the native aortic valves of some mice were also examined with a modified methodology. Relevant degenerative changes could not be shown here.

Overall, the results of this work show that the used ectopic degeneration model is capable of inducing histological changes in bioprosthesis material. The work also underlines the influence of diabetes mellitus on the degeneration of bioprosthesis material. The pro-degenerative effect of biglycan postulated in the literature could only be partially detected by histological analysis of the samples. The findings of this work may contribute to a deeper understanding of the underlying processes, which could provide interesting starting points for the development of improved bioprosthesis in the future.

Abkürzungsverzeichnis

αSMA	Glattmuskelaktin (<i>α smooth muscle actine</i>)
°C	Grad Celsius
ΔPm	mittlerer systolischer Druckgradient
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (<i>angiotensin converting enzyme</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Flächenanteil (<i>area fraction</i>)
AGE	fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (<i>advanced glycoxidation endproducts</i>)
Aqua_{dest}	destilliertes Wasser
Bgn^{-/0}	Biglykan-defiziente Mäuse
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cm²	Quadratcentimeter
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAVD	degenerative Aortenklappenerkrankung (<i>degenerative aortic valve disease</i>)
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GAG	Glykosaminoglykane
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HbA1c	relativer Anteil der glykierten Hämoglobinketten
HE	Hämytoxylin-Eosin-Färbung
IL	Interleukin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse raddish peroxidase</i>)
kg	Kilogramm
KÖF	Klappenöffnungsfläche
LDL	Lipoproteine niedriger Dichte (<i>low density lipoprotein</i>)
m/s	Meter pro Sekunde
min	Minuten
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)

ROI	Bereich von Interesse (<i>region of interest</i>)
SLRPs	kleine Leucin-reiche Proteoglykane (<i>small leucine-rich proteoglycans</i>)
SSRI	Selektiver-Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor (<i>selective serotonin reuptake inhibitor</i>)
STZ	Streptozotocin
TAVI	kathetergestützter Aortenklappenersatz (<i>transcatheter aortic valve implantation</i>)
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNF-α	Tumornekrosefaktor- alpha
vgl.	vergleiche
VIC	valvuläre Interstitialzellen (<i>valvular interstitial cells</i>)
V_{max}	maximale transvalvuläre Flussgeschwindigkeit
WT	Wildtyp-Mäuse
vWF	Von-Willebrand-Faktor
μm	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Degenerative Aortenklappenerkrankung	1
1.1.1 Degenerative Aortenklappenerkrankung – Epidemiologie	1
1.1.2 Degenerative Aortenklappenerkrankung – Klinik	1
1.1.3 Pathophysiologie und Risikofaktoren der DAVD	2
1.2 Therapie der DAVD	4
1.2.1 Klappenprothesen und ihre Vor- und Nachteile	5
1.2.2 Bioprothesendegeneration	6
1.3 Diabetes mellitus	8
1.3.1 Diabetes mellitus – Epidemiologie und Klassifikation	8
1.3.2 Diabetes als Risikofaktor für Bioprothesendegeneration	10
1.4 Biglykan	11
1.4.1 Biglykan – Ein Proteoglykan in der extrazellulären Matrix	11
1.4.2 Biglykan und seine Rolle in der DAVD und Prothesendegeneration	11
1.4.3 Biglykan und Diabetes mellitus	12
1.5 Ziele dieser Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.2 Probenherkunft	17
2.2.1 Biglykan-defiziente Mäuse	17
2.2.2 Effekt von Streptozotocin	17
2.2.3 Versuchsprotokoll	18
2.2.3 Aufbereitung und Lagerung der Proben	19
2.2.4 Stichprobe	20
2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	20
2.4 Movat-Pentachrom-Färbung	21
2.5 Nachweis von Kalkeinlagerungen mittels Von-Kossa-Färbung und Alizarin-Rot-Färbung	22
2.5.1 Von-Kossa Färbung	22
2.5.2 Alizarin-Rot-Färbung	23
2.6 4',6-Diamidin-2-phenylindo (DAPI)-Zellkernfärbung	23
2.7 Immunhistochemie	24
2.7.1 Prinzip der indirekten Immunhistochemie	24
2.7.2 Immunhistochemische Färbungen mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	24
2.7.3 Proteoglykanfärbungen mit DAB	26
2.7.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für α SMA und Vimentin	28
2.7.5 Etablierung von Versuchsprotokollen	29
2.8 Bildverarbeitung und Analyse	30
2.9 Statistische Auswertung	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Histologische Struktur der Explantate	32
3.2 Quantifizierung und Charakterisierung der Zellmigration	34
3.2.1 Quantifizierung der Zellmigration	34
3.2.2 Migration inflammatorischer Zellen	36
3.2.3 Nachweis myofibroblastischer Aktivierung	38
3.2.4 Migration mesenchymaler Zellen	39
3.2.5 Migration von Endothelzellen und Angiogenese	41
3.3 Umbau der EZM	42
3.4 Mineralisierung und Kalzifizierung	47

3.5 Untersuchung der nativen murinen Aortenklappen	50
3.5.1 Histologische Struktur der Aortenklappen	50
3.5.1 Inflammatorische Vorgänge in den Aortenklappen.....	52
3.5.3 Immunfluoreszenzfärbung gegen α SMA und Vimentin	53
3.5.4 Umbau der EZM in den Aortenklappen	55
3.5.5 Kalzifizierung der Aortenklappen	58
4 Diskussion	59
4.1 Diskussion der Ergebnisse	59
4.1.1 Probenmorphologie und Zellmigration unter dem Einfluss von Hyperglykämie und Biglykandefizienz	59
4.1.2 Migration inflammatorischer Zellen im ektopen Degenerationsmodell	60
4.1.3 Migration von Fibroblasten und myofibroblastische Aktivierung.....	61
4.1.3 Migration von Endothelzellen und Angiogenese	62
4.1.4 Migration weiterer Zellen	62
4.1.5 Umbau der EZM unter dem Einfluss von Hyperglykämie und Biglykandefizienz	62
4.1.6 Hyperglykämie verstärkt Mineralisierung und Kalzifizierung im ektopen Degenerationsmodell.....	64
4.1.7 Degeneration der nativen murinen Aortenklappen	65
4.2 Limitierungen	67
4.2.1 Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dem Tiermodell	67
4.2.2 Ektopes Degenerationsmodell.....	67
4.2.3 Induktion einer Hyperglykämie durch STZ.....	68
4.2.4 Quantifizierung histologischer Ergebnisse	68
4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	69
5 Literaturverzeichnis	70

1 Einleitung

1.1 Degenerative Aortenklappenerkrankung

1.1.1 Degenerative Aortenklappenerkrankung – Epidemiologie

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (*degenerative aortic valve disease*, DAVD) stellt die häufigste Pathologie der Herzklappen in den westlichen Ländern dar. Frühe Stadien der Erkrankung im Sinne einer Verdickung der Aortenklappentaschen finden sich je nach Studie bei 21 bis 31 % der über 65-jährigen, bei den über 85-Jährigen sind sogar bis zu 75 % aller Menschen betroffen [1-4]. Eine Aortenklappenstenose als Ausdruck einer fortgeschrittenen DAVD konnte bei 2-5 % aller Menschen über 65 Jahre festgestellt werden [5]. Im Jahr 2018 wurden in Deutschland insgesamt (operativ sowie katheterassistiert) 29.289 Aortenklappenprothesen implantiert, dies entspricht im Vergleich zum Jahr 2012 einem Zuwachs von ca. 35 % [6]. An diesen steigenden Zahlen lässt sich die wachsende Bedeutung der Erkrankung bei einer immer älter werdenden Bevölkerung ableiten.

1.1.2 Degenerative Aortenklappenerkrankung – Klinik

Patienten mit einer DAVD können trotz eines deutlichen Vitiums auch in späten Stadien des Krankheitsverlaufes asymptomatisch bleiben. Bei Fortschreiten einer Stenose oder Insuffizienz der Aortenklappe und daraus folgender hämodynamischer Relevanz kann es zum Auftreten von belastungsinduzierter Dyspnoe, Synkopen, Schwindel oder pectanginösen Beschwerden kommen [7].

Je nach Größe der verbliebenen Klappenöffnungsfläche (KÖF), dem mittleren systolischen Druckgradienten (ΔP_m) und der maximalen transvalvulären Flussgeschwindigkeit (V_{max}) wird echokardiographisch eine leichtgradige, mittelgradige und hochgradige Aortenklappenstenose unterschieden. Eine hochgradige Aortenklappenstenose ist nach den aktuellen internationalen Leitlinien definiert durch eine KÖF $< 1,0 \text{ cm}^2$, eine $V_{max} > 4,0 \text{ m/s}$ und einen $\Delta P_m > 40 \text{ mmHg}$ [8, 9].

Prospektive klinische Studien haben gezeigt, dass die Mortalität trotz hochgradiger Aortenklappenstenose bei asymptomatischen Patienten gering ist. Mit dem erstmaligen Auftreten von Symptomen sank die mittlere Überlebensdauer der Betroffenen jedoch auf zwei bis drei Jahre [7]. Ein operativer oder kathetergestützter Aortenklappenersatz ist in diesen Fällen sowie bei hochgradigen Aortenklappenstenosen und Vorliegen einer Risikokonstellation die einzige zur Verfügung stehende Therapiemöglichkeit.

1.1.3 Pathophysiologie und Risikofaktoren der DAVD

Die DAVD ist eine multifaktorielle, chronisch-progressive Erkrankung, die makroskopisch zunächst von einer sklerotischen Verdickung der Taschenklappen mit Verminderung der Klappenbeweglichkeit geprägt ist. Erst in späteren Stadien kommt es zur Kalzifizierung der Taschen und zur Entstehung von Vitien.

Zahlreiche Risikofaktoren scheinen diesen Prozess durch verschiedene Mechanismen zu begünstigen. Auf genetischer Ebene konnte die Assoziation zu spezifischen Allelen nachgewiesen werden, sodass von einer genetischen Prädisposition als signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer DAVD auszugehen ist [10, 11]. Auch anatomische Besonderheiten der Aortenklappe im Sinne einer bi- oder monokuspiden Aortenklappe stellen einen wesentlichen Risikofaktor für eine DAVD dar [10, 12, 13]. Weitere durch zahlreiche multifaktorielle Analysen belegte Risikofaktoren, sind die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Alter, männliches Geschlecht, arterielle Hypertonie, der Konsum von Nikotin sowie die Komorbidität mit Komponenten des metabolischen Syndroms (u.a. Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie) oder eine chronische Niereninsuffizienz [14-16].

Die DAVD wurde lange als ein degenerativer, passiver Prozess im Sinne einer Ermüdungserscheinung aufgrund von ständigem mechanischem Stress verstanden. Verschiedene Untersuchungen zur Entstehung der Erkrankung geben jedoch Hinweise darauf, dass die Pathophysiologie durch zelluläre sowie extrazelluläre Mechanismen aktiv reguliert wird [17, 18]. Die Vorgänge weisen Ähnlichkeiten zur Atherosklerose auf, sind jedoch keinesfalls mit dieser Erkrankung gleichzusetzen. Ähnlich wie bei der Atherosklerose kommt es unter dem Einfluss von endothelialer Dysfunktion, inflammatorischer Reaktion des Gewebes sowie oxidativem Stress zu Umbauprozessen und Mineralisation [14, 18]. Beide Erkrankungen haben zudem viele gemeinsame Risikofaktoren.

Zum Verständnis der Pathophysiologie der DAVD sind die zugrundeliegenden pathobiologischen Mechanismen in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

In der Initialphase [19] kommt es unter dem Einfluss von mechanischem Stress zur vermehrten Expression von Zytokinrezeptoren der aortalen Endothelzellen sowie zur Rekrutierung von inflammatorischen Zellen. Unter zunehmender Entstehung eines inflammatorischen Milieus entwickelt sich eine endotheliale Dysfunktion, die die weitere Einwanderung von Entzündungszellen sowie Lipoproteinen wie Lipoproteine niedriger Dichte (*low-density lipoprotein*, LDL) ermöglicht [18]. Makrophagen und T-Lymphozyten akkumulieren zusammen mit oxidiertem LDL subendothelial und bilden erste mikroskopisch nachweisbare Frühläsionen der DAVD [20]. In den Frühläsionen können

1 Einleitung

bereits Mikrokalzifizierungen nachgewiesen werden, die aus Apoptosekörperchen der Makrophagen freigesetzt werden.

Die eingewanderten Zellen sezernieren zahlreiche proinflammatorische Zytokine (z.B. transformierender Wachstumsfaktor-beta, Tumornekrosefaktor- alpha (TNF- α), Interleukin(IL)-1/2/6), die zu einer myofibroblastischen Aktivierung der valvulären Interstitialzellen (*valvular interstitial cells*, VIC) in der Fibrosa führen [18].

In der Ausbreitungsphase [19] spielen die entzündlichen Vorgänge weniger eine Rolle. Die Myofibroblasten sezernieren, neben einer Vielzahl von Zytokinen, Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) und wirken so auf den Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) [21]. Makroskopisch kommt es zu einer Verdickung der Klappentaschen, die unter anderem auf eine gesteigerte Kollagensynthese zurückzuführen ist. Mikroskopisch zeigt sich ein Aufbrechen der dreischichtigen Klappenstruktur mit Umverteilung der EZM-Moleküle [10, 22]. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, Angiotensin II und der veränderten EZM werden die Myofibroblasten zur osteoblastischen Differenzierung angeregt, die den Umbau der Klappe durch eine verstärkte Mineralisierung der EZM weiter vorantreibt [23, 24]. Durch die Verdickung der Klappentaschen und die damit einhergehende erhöhte Steifigkeit wird der mechanische Stress an den Klappen weiter verstärkt und es beginnt ein sich selbst verstärkender Umbauprozess. Aufgrund von dystropher Kalzifizierung sowie Vorgängen ähnlich der Osteogenese wachsen die Kalkdepots in den Klappentaschen an und werden schließlich auch makroskopisch sichtbar und funktionell relevant. Im Endstadium der DAVD kann zudem eine Angiogenese in den Klappen beobachtet werden, die durch eine Gewebshypoxie in den verdickten Klappentaschen begünstigt wird, da die Versorgung über Diffusion nicht mehr gewährleistet ist [18].

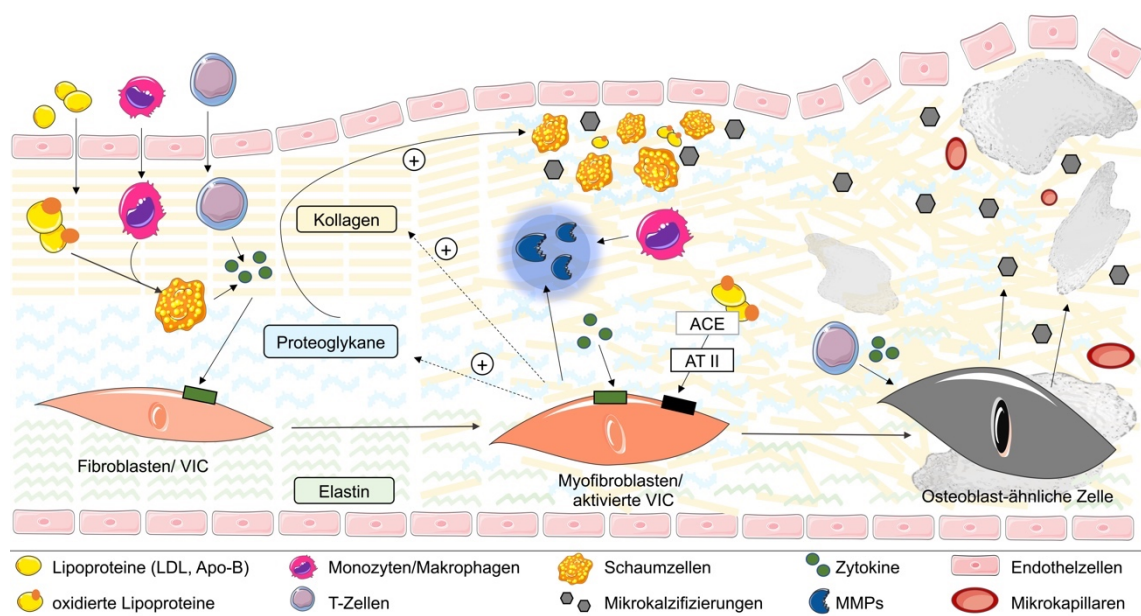


Abb. 1: Pathophysiologie der degenerativen Aortenklappenerkrankung (DAVD)

Bei der DAVD kommt es unter dem Einfluss von migrierenden inflammatorischen Zellen und subendothelial akkumulierenden Lipoproteinen zu Umbauprozessen und Mineralisierung der extrazellulären Matrix mit Verdickung der Klappentaschen und aufbrechen der dreischichtigen Klappenstruktur. Die valvulären Interstitialzellen (VIC) differenzieren dabei zunächst zu Myofibroblasten und im weiteren Verlauf zu Osteoblast-ähnlichen Zellen. MMP = Matrix-Metalloproteinasen, ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym, AT II = Angiotensin II. Nach [10, 17, 18, 25, 26], erstellt mit [27].

1.2 Therapie der DAVD

Das Verständnis der zur DAVD führenden zellbiologischen Mechanismen liefert in der Theorie zahlreiche Angriffspunkte für medikamentöse Therapieoptionen zur Eindämmung oder Verlangsamung der Erkrankung. Insbesondere der Effekt von Statinen, Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (*angiotensin converting enzyme*, ACE), selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern (*selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI), Bisphosphonaten, Denosumab und Vitamin K werden in der Literatur diskutiert. Zwar konnten in einigen Experimenten *in vitro* sowie tierexperimentell vielversprechende Ergebnisse erzielt werden, eine Verbesserung des klinischen Therapieerfolges für Patienten mit DAVD konnte jedoch bisher in randomisierten prospektiven Studien nicht gezeigt werden [19, 21, 23, 24, 28, 29].

Bei Vorliegen einer hochgradigen oder symptomatischen Aortenklappenstenose stellt der prothetische Ersatz der Klappe somit die einzige Therapieoption dar. Der konventionelle operative Klappenersatz kann mittels Autograft (die Pulmonalklappe des Patienten ersetzt die Aortenklappe, die Pulmonalklappe wird durch einen Homograft ersetzt), mittels Homograft (Aortenklappe eines Spenders im Rahmen einer Organspende), durch einen Xenograft (Bioprothese aus bovinem oder porcinem Gewebe) oder durch einen Allograft (mechanische Klappenprothese, meist aus Titan) erfolgen. Aufgrund der sehr begrenzten Verfügbarkeit von Spenderklappen spielen Homografts im klinischen Alltag aktuell nur in wenigen Ausnahmefällen (z.B. bei Kindern) eine Rolle. Für den chirurgischen Aortenklappenersatz wird das Herz mittels medianer Sternotomie freigelegt. Anschließend wird unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine die alte Aortenklappe entfernt und durch eine Prothese ersetzt.

Seit 2002 gewinnt zudem der minimalinvasive kathetergestützte Aortenklappenersatz (*transcatheter aortic valve implantation*, TAVI) zunehmend an Bedeutung [30]. Dabei wird ein Stent mit einer Bioprothese in der Regel transfemoral, seltener transapikal, in die aufgesprengte degenerierte Aortenklappe eingebracht. Aktuell wird dieses Verfahren hauptsächlich bei Patienten mit hohem perioperativem Risiko im Sinne eines EuroSCORE II über neun Prozentpunkte empfohlen [8, 9, 31]. Metaanalysen ergaben für den chirurgischen Aortenklappenersatz und TAVI ein vergleichbares Mortalitätsrisiko

bei einem deutlich ausgeprägteren Risikoprofil in der TAVI-Gruppe, wobei auch auf die fehlenden Langzeitdaten hingewiesen wird [32].

1.2.1 Klappenprothesen und ihre Vor- und Nachteile

Die Auswahl der Aortenklappenprothese ist ein komplexer Prozess, bei dem für den individuellen Patienten die Vor- und Nachteile von biologischen und mechanischen Klappenprothesen einbezogen werden müssen. Eine starre Altersgrenze für die Auswahl der Prothese besteht nicht, vielmehr sollten die Haltbarkeit der Prothese, das Blutungsrisiko durch Antikoagulation, der Lebensstil des Patienten, Komorbiditäten, hämodynamische Faktoren sowie der Patientenwunsch gegeneinander abgewogen werden [9, 33].

Mechanische Aortenklappenprothesen bestehen meist aus Titan oder Carbon und werden in Form von Doppelflügelprothesen oder Monokippscheiben verwendet [33]. Sie zeichnen sich durch eine sehr lange Haltbarkeit aus. Die Notwendigkeit von Reoperationen liegt 15 Jahre nach der Implantation zwischen 1,8 % und 5,9 % [34, 35]. Der direkte Kontakt des Blutes mit einer künstlichen Oberfläche führt jedoch zu einer erhöhten Aktivierung der Gerinnungskaskade, sodass eine lebenslange Antikoagulation zur Vermeidung von kardioembolischen Ereignissen für den Patienten unumgänglich ist [7]. Auch unter effektiver Antikoagulation beträgt das kumulative Risiko für embolische Ereignisse in den ersten zehn Jahren nach Implantation 6,3 % [36]. Diese erhöht zudem insbesondere das Risiko für Blutungsereignisse [37]. 15 Jahre nach der Implantation einer mechanischen Aortenklappenprothese konnten bei bis zu 51 % der Patienten Blutungsereignisse beobachtet werden [38, 39]. Insgesamt wird das jährliche Risiko, ein embolisches oder hämorrhagisches Ereignis zu erleiden, für Patienten zwischen 40 und 60 Jahren mit mechanischen Aortenklappenprothesen auf 2 bis 4 % geschätzt [40]. Nach dem ersten dieser Ereignisse ist zudem die Wahrscheinlichkeit für ein Zweitereignis erhöht [39]. Viele Patienten beklagen zudem eine psychische Belastung sowie Schlafstörungen aufgrund eines dauerhaften metallischen Klick-Geräusches [41]. Mechanische Aortenklappenprothesen werden aus den genannten Gründen aktuell nur bei jüngeren Patienten ohne Kontraindikation für eine Antikoagulation, bei Erwartung einer erhöhten Bioprothesendegeneration sowie bei Patienten, die aufgrund anderer Erkrankungen (z.B. mechanische Herzklappe an anderer Position, Vorhofflimmern) ohnehin eine lebenslange Antikoagulation benötigen, verwendet [7, 9, 33].

Biologische Aortenklappenprothesen werden aus porcinen Aortenklappen oder bovinem Perikard hergestellt. Das Gewebe moderner biologischer Aortenklappenprothesen wird während der Herstellung mit Glutaraldehyd fixiert. Die chemische Fixierung sterilisiert das Gewebe, erhöht die Stabilität des Materials und verringert die antigene Wirkung auf

1 Einleitung

den Empfängerorganismus. Zudem werden die Gewebe weiteren Prozessen unterzogen, die vor Thrombosierung und Kalzifizierung der Prothese schützen sollen [33, 42]. Da biologische Prothesen dennoch einen Fremdkörper darstellen, weisen auch diese ein erhöhtes Thrombembolierisiko von 6,4 % in den ersten zehn Jahren nach Implantation auf, das zum Risiko effektiv antikoagulierter Träger von mechanischen Aortenklappen etwa äquivalent ist [36]. Im Vergleich treten bei Patienten mit biologischen Prothesen aufgrund der fehlenden Antikoagulation jedoch signifikant weniger Blutungsereignisse auf [34, 38]. Das jährliche Risiko, ein embolisches oder hämorrhagisches Ereignis zu erleiden, beträgt für Patienten mit biologischen Aortenklappenprothesen etwa 1 % [40].

Das größte Problem der biologischen Aortenklappenprothesen ist ihre limitierte Haltbarkeit aufgrund von degenerativen Prozessen, die zu strukturellen Veränderungen und zur Dysfunktion der Prothese führen. Die Reoperationsrate liegt für biologische Prothesen zwar nach zehn Jahren noch unter 10 %, beträgt aber bereits 15 Jahre nach Implantation zwischen 21,4 % und 39,6 % [34, 35] und ist somit im Vergleich zu mechanischen Prothesen deutlich erhöht [38, 43].

Biologische Aortenklappenprothesen werden insbesondere bei älteren Patienten verwendet, bei denen die Haltbarkeit der Prothese mutmaßlich über der Lebenserwartung des Patienten liegt. Sie sind ebenso indiziert bei Patienten mit erhöhtem Blutungsrisiko oder Kontraindikationen für eine lebenslange Antikoagulation (z.B. aufgrund von Gerinnungsstörungen, Lebensumständen oder mangelnder Mitwirkung des Patienten) sowie bei Frauen im gebärfähigen Alter mit Kinderwunsch [9, 33].

1.2.2 Bioprothesendegeneration

In zahlreichen Untersuchungen konnten einige Faktoren identifiziert werden, die mit einer verfrühten Prothesendysfunktion bzw. einer erhöhten Reoperationsrate assoziiert sind. Dazu zählen neben Komorbiditäten wie Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, Hyperparathyreoidismus, Hypercholesterinämie und arterieller Hypertonie auch patientenbezogene Faktoren wie junges Alter bei Implantation, Rauchen, Schwangerschaft, erhöhte Körperoberfläche und hämodynamische Faktoren wie ein erhöhter postoperativer ΔP_m , insgesamt kleinere Prothesen sowie eine in Relation zur Körperoberfläche des Patienten kleine Klappenöffnungsfläche der Prothese [33, 36, 44-48]. Neuere Generationen von Bioprothesen scheinen zudem im Vergleich zu den ersten Generationen eine erhöhte Haltbarkeit aufzuweisen. Eine erhöhte Degenerationsrate von porcinen Bioprothesen gegenüber solchen aus Rinderperikard wird in der Literatur an mehreren Stellen diskutiert, bleibt aber umstritten [33, 47, 49].

1 Einleitung

Die der Degeneration von Bioprothesen zugrundeliegenden pathobiologischen Mechanismen weisen Ähnlichkeiten zu denen der DAVD auf [50]. In beiden Fällen kommt es im Endstadium zu einer Verdickung der Klappentaschen mit Einlagerung von Kalziumkristallen. Pibarot und Dumesnil beschreiben die Degeneration von Bioprothesen als Mischbild aus Degeneration, atherosklerotischen Vorgängen sowie inflammatorischen Prozessen [33]. Eine Übersicht ist in Abbildung 2 dargestellt.

Neben endogenen Faktoren ist die Degeneration von Aortenklappenbioprothesen auch auf die Fixierung des Gewebes mit Glutaraldehyd zurückzuführen. Dieses führt zu einer über die Zerstörung der Zellmembranen zu einem vermehrten Einstrom von Kalzium, das mit den residuellen Phospholipiden der Zellmembranen zu Kalziumkristallen akkumuliert. Zum anderen verlieren die Kollagenstränge durch die chemische Fixierung ihre natürliche Beweglichkeit, was in Zusammenspiel mit dem mechanischen Stress sowie der fehlenden Reparaturmöglichkeit durch devitalisierte Zellen dauerhaft zu Schäden an der Kollagenstruktur führt [51, 52] und zusätzlich Kalziumeinlagerungen an den Stellen mit höchster mechanischer Belastung begünstigt. Es kommt zu Umbauprozessen der EZM mit Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen [50, 52].

Trotz der antigenmaskierenden Wirkung von Glutaraldehyd kann eine Reaktion des humoralen und zellulären Empfängerimmunsystems gegen tierische Restantigene in der Aortenklappenbioprothese nicht vollständig verhindert werden. Eine Einwanderung von Makrophagen, T-Zellen sowie die Bildung von Antikörpern gegen bovine oder porcine Bestandteile der Bioprothesen konnten im Tierversuch nachgewiesen werden. Es kommt zu einer inflammatorischen Immunantwort, die über die Freisetzung von Zytokinen zur Degeneration und Mineralisation des Gewebes beiträgt [47, 53-55]. Die ausgeprägtere Immunantwort bei Jüngeren und Schwangeren wird als Erklärung für die erhöhten Degenerationsraten in ebendiesen Gruppen diskutiert [33, 50, 53].

Ähnlich wie in degenerierten nativen Aortenklappen können in explantierten Bioprothesen oxidiertes LDL sowie mit diesem räumlich assoziierte Makrophagen und MMP-9 histologisch nachgewiesen werden [56]. In elektronenmikroskopischen Darstellungen konnten zudem Schaumzellen als Korrelat von phagozytiertem LDL dargestellt werden [56] sowie multinukleäre Riesenzellen und neutrophile Granulozyten [57]. Zudem kommt es zum Umbau der EZM durch fibrotische Veränderungen und enzymatische Abbauprozesse durch MMP-1. Auch thrombotische Prozesse scheinen die Degeneration zu beschleunigen [58]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass eingewanderte Stammzellen zu einem osteoblastischen Phänotyp differenzieren und so die Degeneration und Kalzifizierung der Bioprothese weiter vorantreiben [33, 53].

1 Einleitung

Die genauen Mechanismen der zugrundeliegenden Prozesse sowie die Herkunft der eingewanderten Zellen sind bisher noch nicht endgültig geklärt. Das verbesserte Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge in der Bioprothesendegeneration könnte in der Zukunft dazu führen, die Degeneration der Prothesen durch Modifikation des Materials oder medikamentöse Therapie zu verlangsamen oder gänzlich zu verhindern.

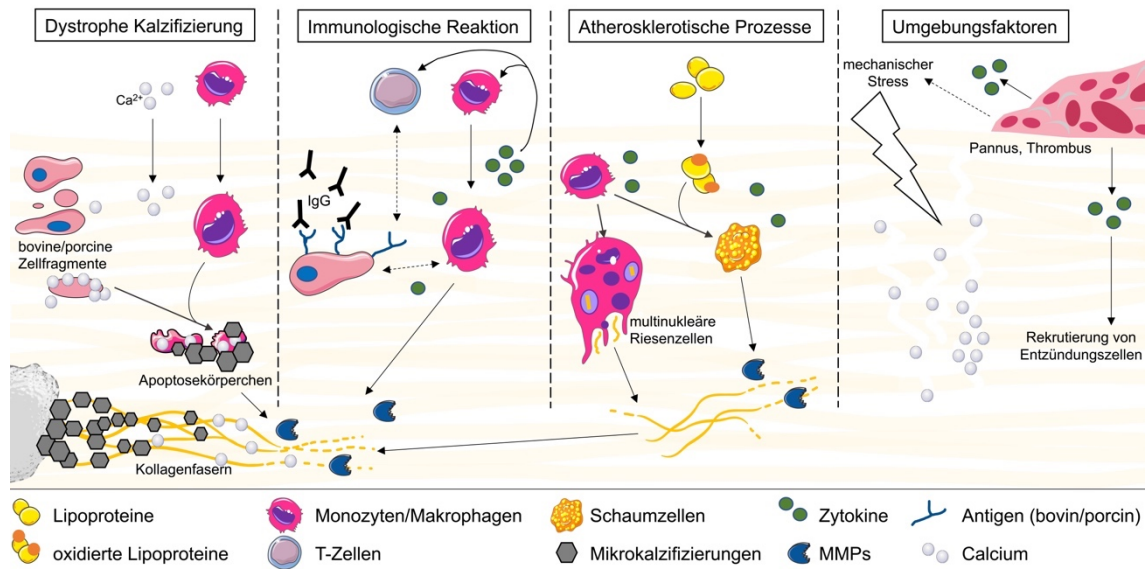


Abb. 2: Pathophysiologie der Bioprothesendegeneration

Durch dystrophe Kalzifizierung, das humorale und zelluläre Immunsystem des Trägerorganismus, artherosklerotische Prozesse sowie mechanischen Stress und Auflagerungen auf der Oberfläche der Bioprothese kommt es zu Ab- und Umbauprozessen der extrazellulären Matrix mit Einlagerung von Mikro- und Makrokalzifizierung. Dabei spielen neben einwandernden Entzündungszellen auch enzymatische Abbauprozesse eine Rolle. Freigesetzte Zytokine tragen zur Entstehung eines inflammatorischen Milieus bei. MMP = Matrix-Metallo-Proteinase. Nach [33, 59], erstellt mit [27].

1.3 Diabetes mellitus

1.3.1 Diabetes mellitus – Epidemiologie und Klassifikation

Diabetes mellitus ist die häufigste Stoffwechselstörung weltweit. 2021 wurde die globale Anzahl der Erkrankten auf 537 Millionen geschätzt. Die internationale Gesellschaft für Diabetes (*international diabetes federation*, IDF) prognostiziert einen Anstieg auf 783 Millionen Erkrankte bis zum Jahr 2045 [60]. In Deutschland lebten 2019 etwa 9,5 Millionen Menschen mit der Diagnose Diabetes mellitus, zudem wird die Dunkelziffer auf etwa 4,5 Millionen Menschen geschätzt. Dabei verursachte die Erkrankung allein in Deutschland in diesem Jahr 43 Milliarden US-Dollar krankheitsbezogene Kosten [61]. Der Begriff Diabetes mellitus bezeichnet eine heterogene Gruppe von Stoffwechselstörungen der Blutglukoseregulation, die zu einer Hyperglykämie führen. Dabei werden neben einer vorübergehenden hyperglykämischen Stoffwechsellage in der

1 Einleitung

Schwangerschaft (Gestationsdiabetes) vor allem Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 unterschieden. Seltener Sonderformen kommen als Begleitsymptomatik anderer Erkrankungen und im Rahmen genetischer Syndrome sowie toxischer oder medikamentöser Einflüsse vor [62].

Beim Typ 1-Diabetes kommt es in Folge einer autoimmunen Reaktion gegen die insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas zu einem absoluten Insulinmangel im Organismus. Die Ursache ist nicht vollständig geklärt, es wird aber von einem Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren, beispielsweise viralen Infekten, ausgegangen. Dieser Typ macht zwischen 5 % und 10 % der Erkrankungen mit Diabetes aus und manifestiert sich häufig, aber nicht immer, bereits in der Kindheit oder Jugend. Typ-1-Diabetiker sind lebenslang streng auf die Zufuhr von exogenem Insulin angewiesen [62, 63].

Der Typ 2-Diabetes ist mit 90 bis 95 % die am häufigsten auftretende Form des Diabetes mellitus. Er ist gekennzeichnet durch einen relativen Insulinmangel bei peripherer Insulinresistenz des Organismus und tritt meist im späteren Erwachsenenalter auf. Die absolute Insulinproduktion ist zu Beginn der Erkrankung meist normal oder erhöht (Hyperinsulinämie). Im Verlauf der Erkrankung kann der Körper den erhöhten Bedarf aber häufig nicht mehr decken und es kommt sekundär ebenfalls zu einem absoluten Insulinmangel. Typ-2-Diabetiker sind daher initial nicht insulinpflichtig. Ätiologisch besteht auch beim Typ-2-Diabetes eine genetische Prädisposition. Darüber hinaus sind Übergewicht, ein erhöhter abdominaler Körperfettanteil und Bewegungsmangel mit dem Ausbruch der Erkrankung assoziiert [62, 63].

Die Diagnosekriterien für das Vorliegen eines Diabetes mellitus sind nach der Deutschen Diabetes Gesellschaft ein Nüchternblutglukosewert über 126 mg/dl, ein Anstieg der venösen Blutglukosekonzentration über 200 mg/dl im Zwei-Stunden-oralen-Glukosetoleranztest oder ein HbA1c über 6,5 %. Der HbA1c gilt als Langzeitwert. Er gibt den Anteil des glykierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin an und erlaubt aufgrund der irreversiblen Bindung von Glukose an die β -Globin-Kette eine Aussage über die durchschnittliche Blutglukosekonzentration in den letzten 120 Tagen [64, 65].

Neben akut lebensbedrohlichen Komplikationen wie hypo- oder hyperglykämischen Entgleisungen, einer Laktatazidose oder einer Ketoazidose führt Diabetes mellitus langfristig zu Störungen der Makro- und Mikrozirkulation, die eine Vielzahl von Langzeitschäden in verschiedenen Organsystemen (diabetische Nephropathie, Retinopathie, Polyneuropathie, diabetisches Fußsyndrom) verursachen [61, 66]. Dass Diabetes mellitus zur Entstehung und Progression zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt, ist unumstritten. Insgesamt wird der Erkrankung etwa eine Verdopplung des kardiovaskulären Risikos zugeschrieben [61]. In einem

systematischen Review wiesen 32,2 % der Typ-2-Diabetiker eine kardiovaskuläre Erkrankung auf [67]. Ein 60-jähriger Patient mit Diabetes mellitus hat im Vergleich zu einem gleichaltrigen normoglykämien Patienten statistisch eine um sechs Jahre verkürzte Lebenserwartung. Bei Diabetikern ist das Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, einer koronaren Herzerkrankung sowie für thromboembolische Ereignisse im Rahmen eines Vorhofflimmerns signifikant erhöht [68, 69]. Zahlreiche Untersuchungen belegen auch den prodegenerativen Effekt des Diabetes mellitus im Rahmen der DAVD [69-72]. Dabei scheint das Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 ein unabhängiger Prädiktor für die Entwicklung einer DAVD zu sein, da auch eine adäquate Therapie des Diabetes mellitus den Progress der DAVD nicht eindämmen kann [73, 74].

1.3.2 Diabetes als Risikofaktor für Bioprothesendegeneration

Neben den nativen Aortenklappen sind auch biologische Aortenklappenprothesen von einer vermehrten Degeneration im Zusammenhang mit Diabetes mellitus betroffen. In einer großen multizentrischen Kohortenstudie aus Italien konnte sieben Jahre nach Implantation einer biologischen Aortenklappe bereits bei etwa 27 % der Typ-2-Diabetiker echokardiographisch eine strukturelle Prothesendegeneration nachgewiesen werden. Bei Nicht-Diabetikern lag die strukturelle Degenerationsrate zu diesem Zeitpunkt noch unter 5 % [45]. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus insgesamt [75, 76] bzw. eines Diabetes mellitus Typ 2 [45] stellt dabei in verschiedenen multifaktoriellen Analysen einen unabhängigen Risikofaktor für die Progression der Degeneration von Bioprothesen sowie für Reoperationen dar. Auch unabhängig von einer strukturellen Degeneration ist die Komorbidität mit Diabetes mellitus bei Patienten nach operativem Aortenklappenersatz mit einer höheren Mortalität assoziiert [77].

Die der Assoziation von Diabetes mellitus und vermehrter Degeneration zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sind, insbesondere spezifisch im Hinblick auf biologischen Aortenklappenprothesen, zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. In Bezug auf die DAVD scheinen neben den sogenannten fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten (*advanced glycoxidation endproducts*, AGEs), die eine heterogene Gruppe aus glykierten Proteinen und Lipiden darstellen, auch oxidativer Stress sowie eine durch Diabetes mellitus induzierte Inflammation und prokoagulatorische Effekte eine Rolle zu spielen [78-80].

1.4 Biglykan

1.4.1 Biglykan – Ein Proteoglykan in der extrazellulären Matrix

Biglykan gehört zu den kleinen, Leucin-reichen Proteoglykanen (*small leucine-rich proteoglycans*, SLRPs) und ist ein struktureller Bestandteil der EZM zahlreicher Gewebe. Es besteht aus einem Kernprotein, das am N-terminalen Ende mit ein oder zwei Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten aus Chondroitin- oder Dermatan-sulfat verbunden ist. Das Biglykan-Gen ist X-chromosomal lokalisiert [81].

Biglykan-defiziente Mäuse fallen insbesondere durch einen Osteoporose-ähnlichen Phänotyp mit geringerer Knochenmasse auf, sodass das Proteoglykan zunächst als strukturelle Komponente von Knochen und Bindegewebe verstanden wurde [82, 83]. Biglykan ist zudem an der Ausbildung von Kollagenfibrillen beteiligt [84-86] und kommt im Körper nahezu ubiquitär vor. In den Herzklappen ist Biglykan, wie auch andere Proteoglykane, vor allem in der Lamina spongiosa lokalisiert, wo es in radiären Strängen vorliegt und durch seine negativ geladenen GAG-Seitenketten Wasser bindet, was die Struktur und die Elastizität der Klappe sicherstellt [87, 88].

Neben seiner strukturellen Funktion interagiert Biglykan mit verschiedenen Zellen und scheint so eine Mediatorfunktion in immunologischen, inflammatorischen und degenerativen Signalkaskaden zu haben. Es kommt sowohl gebunden in der EZM, als auch in löslicher Form vor. Insbesondere der löslichen Form von Biglykan wird in der Literatur eine prodegenerative Rolle zugeschrieben. Durch Interaktion mit *Toll*-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR) 2 und 4 an Makrophagen kommt es dabei zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade, die letztlich zur Ausschüttung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1- β) und damit zur Aktivierung von B- und T-Lymphozyten sowie zur Rekrutierung weiterer Makrophagen führt [89].

Verschiedenen Untersuchungen, insbesondere aus der Forschung an atherosklerotischen Vorgängen, zeigen eine Assoziation von Biglykan mit bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, chronischer Niereninsuffizienz und Fettstoffwechselstörungen. Diese Beobachtungen führten dazu, dass Biglykan in der Literatur als gemeinsamer Schlüsselfaktor bei der Entstehung von degenerativen Erkrankungen diskutiert wird [90-93].

1.4.2 Biglykan und seine Rolle in der DAVD und Prothesendegeneration

Der Umbau der EZM spielt in der Pathogenese der DAVD eine entscheidende Rolle [22]. Einige Untersuchungen zeigen, dass Biglykan in der Lage ist, die Pathogenese der DAVD über verschiedene Mechanismen voran zu treiben. Biglykan wurde

immunhistologisch in kalzifizierten humanen Aortenklappen in der Umgebung von Kalkablagerungen nachgewiesen [94]. In stenosierten bzw. fibrosierten humanen Aortenklappen wird stadienabhängig eine vermehrte Expression von Biglykan im Vergleich zu nicht degenerativ veränderten Aortenklappen beschrieben [93-95]. Biglykan bindet mit seinen negativ geladenen GAGs die positiv geladenen Aminosäuren von Lipoproteinen und führt so zur subendothelialen Lipidretention sowohl in Arterienwänden [90, 96, 97], als auch in den Taschenklappen [98]. Biglykan verstärkt diesen artherosklerotischen Prozess zudem durch die Induktion der Produktion von Phospholipidtransferprotein an den VICs [95]. Über die Stimulation von TLR-2 und TLR-4 an Makrophagen führt Biglykan außerdem zu einer inflammatorischen Signalkaskade und so zur Progression der DAVD [99]. *In vitro* induziert es zudem an humanen VICs die Expression von osteogenen Faktoren, was die Kalzifizierung der Aortenklappe weiter vorantreibt.

Welche Rolle Biglykan in der Degeneration von Bioprothesenmaterial spielt, ist aufgrund der geringen Datenlage auf diesem Gebiet noch weitestgehend unklar. Die Ähnlichkeit zur Pathophysiologie der DAVD und Atherosklerose sowie einzelne Untersuchungen, die eine Veränderung der EZM im Rahmen der Bioprothesendegeneration zeigen [51, 100], lassen jedoch einen direkten oder indirekten Einfluss vermuten.

1.4.3 Biglykan und Diabetes mellitus

Diabetes mellitus bzw. eine Hyperglykämie führt in zahlreichen Geweben zu einer veränderten Zusammensetzung der EZM. Dabei kommt es beispielsweise durch eine gestörte Synthese oder vermehrten enzymatischen Abbau sowie eine Destruktion mittels reaktiver Sauerstoffspezies zu einem Verlust von GAGs und Proteoglykanen [101]. Für Biglykan zeigten bisherige Untersuchungen eine Hyperglykämie-assoziierte Überexpression im Zusammenhang mit einer Nephropathie [102], Adipositas [103] und Atherosklerose [104, 105] als Spätfolgen eines Diabetes mellitus [106, 107]. *In vitro* konnte in VIC zudem gezeigt werden, dass Hyperglykämie und Hyperinsulinämie zu einer erhöhten Expression des Biglykan-Gens führen [108]. Auch die Diabetes-assoziierte vermehrte Expression von TLR-2 und TLR-4 als Zielrezeptoren löslichen Biglykans legt einen Einfluss von Biglykan unter hyperglykämischer Stoffwechsellage nahe [109]. *In vivo* konnte intraperitoneal sowie intraventrikulär appliziertes Biglykan die Glukosetoleranz von Mäusen erhöhen und vor der Entwicklung von Übergewicht schützen [110].

Trotz des unstrittigen prodegenerativen Einflusses von Diabetes mellitus auf Aortenklappen sowie Aortenklappenbioprothesen ist die Wirkung einer hyperglykämischen Stoffwechsellage auf die EZM von Herzklappen bisher wenig

untersucht. Ein tieferes Verständnis der Mechanismen könnte Ansatzpunkte für eine medikamentöse Therapie zur Eindämmung der DAVD und die Entwicklung verbesserter Bioprothesen liefern.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Die DAVD stellt in Deutschland sowie weltweit eine epidemiologisch sowie ökonomisch bedeutsame Erkrankung dar. Ähnlich wie die nativen humanen Aortenklappen sind auch biologische Aortenklappenprothesen von degenerativen Umbauprozessen betroffen, die im fortgeschrittenen Stadium zu einer strukturellen Fehlfunktion der Bioprothese führen. Neben dem Einfluss migrierender Zellen spielen dabei auch verschiedene Komponenten der EZM eine entscheidende Rolle. Eine diabetische Stoffwechsellage scheint die ablaufenden Vorgänge zu beschleunigen, wenngleich die genauen dieser Assoziation zugrundeliegenden pathobiologischen Mechanismen aktuell noch nicht vollständig verstanden sind. Das Proteoglykan Biglykan scheint zum einen an Umbauprozessen im Rahmen einer DAVD und Prothesendegeneration beteiligt zu sein, zum anderen zeigt es in verschiedenen Untersuchungen eine Assoziation zu einer diabetischen Stoffwechsellage. Biglykan könnte daher eine Schlüsselrolle in der Entstehung einer beschleunigten Bioprothesendegeneration unter dem Einfluss eines Diabetes mellitus zukommen.

Um die Zusammenhänge tiefergehend zu untersuchen, sollen im Rahmen dieser Arbeit Proben aus einem Biglykan-defizienten Mausmodell unter hyperglykämischen sowie normoglykämischen Bedingungen mittels histologischer und immunhistologischer Methoden untersucht werden. Die Gewinnung der Proben erfolgte unter Verwendung eines etablierten ektopen Degenerationsmodelles, das auf der subkutanen Implantation von Aortenklappenbioprothesenmaterial basiert [111-113].

Die Proben sollen neben der Quantifizierung und Charakterisierung der an der Degeneration beteiligten Zellen auch auf Veränderungen der EZM sowie eine potenziell vorliegende Kalzifizierung untersucht werden. Zudem soll in diesen Punkten vergleichend eine Untersuchung der nativen Aortenklappen der Versuchstiere erfolgen. Im Hinblick auf die postulierte Beteiligung von Biglykan an der Bioprothesendegeneration und DAVD stellt sich dabei insbesondere die Frage, ob der Organismus der Biglykan-defizienten Mäuse auf das eingebrachte Fremdmaterial und eine Hyperglykämie anders reagiert als der Organismus der Wildtypiere. Ein tiefgreifendes Verständnis der ablaufenden Prozesse könnte in Zukunft Ansatzpunkte für eine medikamentöse Therapie der Erkrankung liefern oder zur Entwicklung von Bioprothesen mit verlängerter Haltbarkeit beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Zur Durchführung der aufgeführten Untersuchungen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Materialien und Chemikalien verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Materialien mit Artikelnummer sowie Bezugsquelle

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
Aceton	5025.5	Carl Roth, Karlsruhe
Alcianblau	A5268	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Alizarin S	0348.2	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydroxid (10 %)	6756.1	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydroxid (30 %)	CP17.1	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua _{dest}		
Biopsie-Stanzen 5 mm	8828767	pfm medical GmbH, Köln
Bovines Serum Albumin Fraction V	8076.4	Carl Roth, Karlsruhe
Brilliant Crocein R	1B-109	Waldeck, Münster
Chondroitin-ABC-Lyase	C2905	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DAB Substrate Kit	DAB530	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Dako Pen	S200230-2	Dako, Glostrup, Dänemark
DAPI	6335.1	Carl Roth, Karlsruhe
Deckgläser 24x50 mm	K12450	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Einbettmedium CryoCompound	0710-1620C	Klinipath BV, Duiven, Niederlande
Einbettschälchen 17x17x5 mm	48-6302-00	Medite GmbH, Burgdorf
Einbettschälchen 25x25x5 mm	48-6303-00	Medite GmbH, Burgdorf
Eindeckmedium Roti Histokitt II	T160.1	Carl Roth, Karlsruhe
Eindeckmedium Leica CV Mount	14046430011	Leica Biosystems, Buffalo, USA
Eisenchlorid-Hexahydrat	236489	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

2 Material und Methoden

Eosin B	861006	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure (100 %)	6755.2	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 70 %, 96 %, 99,8 %		Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf
Falcon 15 ml	62.554	Sarstedt AG, Nümbrecht
Falcon 50 ml	62.559	Sarstedt AG, Nümbrecht
Fetales Kälberserum (FCS)	S0615	Biochrom GmbH, Berlin
Filterpapier	534018	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Formaldehydlösung 37 %	4979.1	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung 4 %	P087.3	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	H3136	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Isopentan	M32631	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Jod	7935	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumiodid	8491.1	Carl Roth, Karlsruhe
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	N069.1	Carl Roth, Karlsruhe
Kryostatklingen Microtome Blades S-35	16031480P	pfm medical GmbH, Köln
Mayers Hämalaunlösung	1.092.490.500	Merck, Darmstadt
Microcentrifuge Tubes 1,5 ml	G052BP	Kisker, Steinfurt
Microcentrifuge Tubes 2,0 ml	G053BP	Kisker, Steinfurt
Natriumacetat-Trihydrat	1.062.671.000	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	1.063.921.000	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	1.064.041.000	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	72049-250G	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Objektträger SuperFrost Plus	03-0060	R. Langenbrinck, Emmendingen
PBS-Tabletten	79382	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Pikrinsäure	84.512.260	VWR Chemicals, Radnor, USA
Pipettenspitzen 10 µl	S1111-3800	Starlab, Hamburg
Pipettenspitzen 1000 µl	S1111-6800	Starlab, Hamburg
Pipettenspitzen 1000 µl mit Filter	S1122-1830	Starlab, Hamburg

2 Material und Methoden

Pipettenspitzen 20 µl	S1110-3800	Starlab, Hamburg
Pipettenspitzen 200 µl	S1111-0800	Starlab, Hamburg
Safran du Gatinais	5A-393	Waldeck GmbH, Münster
Salzsäure rauchend (37 %)	2601.1	Carl Roth, Karlsruhe
Säurefuchsin	T128.1	Carl Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	9370.1	Carl Roth, Karlsruhe
Soft Tissues	7730012	Tapira, Heidenheim
Stickstoff (flüssig)		Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf
Tris Sigma 7-9	T1378	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tris(hydromethyl)-aminomethan	1.083.822.500	Merck, Darmstadt
Triton X-100	T9284-500ML	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20 Detergent	655205	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30 %)	9681.1	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	28.975.325	VWR Chemicals, Radnor, USA

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Geräte sowie Hersteller

Gerät	Hersteller
Cryotom CM 1950	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer mit Heizplatte RH basic 2	IKA, Staufen
Minizentrifuge Rotilabo	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand, Wertheim
Durchlichtmikroskop DM2000	Leica Microsystems, Wetzlar
Feinwaage BP 110 S	Sartorius, Göttingen
Abzug maXXima	WTR Laborbau, Stadtlohn
Fluoreszenzlampe	Leica, Wetzlar
Kamera Leica DFC 425c	Leica Microsystems, Wetzlar
Wärmeschrank Heraeus Function line	Thermo Scientific, Waltham, USA
pH Meter	WTW, inoLab, Weilheim

2.2 Probenherkunft

Die Gewinnung der Proben einschließlich Etablierung des Versuchsprotokolls, Behandlung und Operation der Versuchstiere sowie die Probenentnahme erfolgte durch Frau Dr. Jessica Isabel Selig im Rahmen ihrer Promotionsarbeit [114]. In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Aufarbeitung und die histologische Auswertung der Proben. Zur Vollständigkeit und Verständlichkeit der Arbeit werden im Folgenden aber auch die Herkunft der Proben sowie der vorangegangene Versuchsablauf kurz erläutert. Die Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2011.A404 durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt.

2.2.1 Biglykan-defiziente Mäuse

Die Tierexperimente wurden mit männlichen Mäusen eines C57BL/6-Stammes durchgeführt. Die Biglykan-defizienten Mäuse sowie ihre Wildtyp-Wurfgeschwister stammen aus der Zucht von Prof. Dr. Jens W. Fischer (Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf). Der Biglykan-Knockout beruht auf *Gene-Targetting* und homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen [82, 83]. Aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation des Biglykan-Gens haben die männlichen Knockout-Mäuse den Genotyp Bgn^{-0} .

2.2.2 Effekt von Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) ist ein zytotoxisches Glukose-Analogon, das von Bakterien der Art *streptomyces achromogenes* produziert wird und nach seiner Entdeckung zunächst als Zytostatikum zur Therapie des metastasierten Pankreaskarzinoms verwendet wurde [115]. Im Tierversuch findet es insbesondere aufgrund seiner Hyperglykämie-induzierenden Wirkung Beachtung [116].

STZ ist eine Verbindung aus einer Glukosestruktur und Methylnitroseharnstoff, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Glukose über den Glukosetransporter in die insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas aufgenommen wird [117].

Intrazellulär löst STZ den Einbau von Alkylgruppen in die DNA und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies aus. Zudem entsteht durch DNA-Schädigungen eine Überexpression der Poly-ADP-Ribose-Polymerase, die einen Mangel an ADP hervorruft und so am Untergang der Betazellen beteiligt ist [115]. Es kommt im Organismus in der Folge des absoluten Insulinmangels zu einer hyperglykämien, diabetischen Stoffwechsellage.

2.2.3 Versuchsprotokoll

Für die Untersuchung des Einflusses von Biglykan-Defizienz und Diabetes auf die Degeneration und Kalzifikation von Aortenklappenprothesenmaterial wurde ein etabliertes ektoptes Degenerationsmodell verwendet [93, 111, 112, 114].

Dazu wurde den Versuchstieren im Alter von sechs Wochen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine gewichtsadaptierte Dosis von 55 mg/kg STZ (gelöst in Citratpuffer) intraperitoneal injiziert. Die Vergleichsgruppen erhielten Injektionen mit einer äquivalenten Dosis Citratpuffer. Die Erreichung einer signifikant erhöhten Blutglukosekonzentration über 250 mg/dl wurde nach weiteren zwei Wochen mittels Blutentnahme aus der Schwanzvene überprüft (Abb. 3 A).

Am Folgetag wurden den Tieren im Bereich des Rückens unter Allgemeinanästhesie sowie Analgesie vier 5-mm-Stanzen aus glutaraldehyd-fixiertem Rinderperikard subkutan implantiert. Diese werden im Folgenden als Patches bezeichnet. Die Patches wurden mit drei Einzelknopfnähten eines nicht resorbierbaren Fadens an der darunter liegenden Muskelfaszie fixiert (Abb. 3 B). Das Material wurde von der Firma *Edwards Lifesciences* (Modell 4700, *Edwards Lifesciences*, Irvine, Kalifornien, USA) erworben, die dieses für die Herstellung von biologischen Aortenklappenprothesen verwendet [118]. Es besteht aus Glutaraldehyd-fixiertem sowie durch weitere Verfahren modifiziertem Rinderperikard.

Die Patches verblieben acht Wochen *in vivo* und wurden nach Tötung der Tiere im Alter von 16 Wochen entnommen, halbiert und für die verschiedenen Analysen aufbereitet (Abb. 3 A) [114].

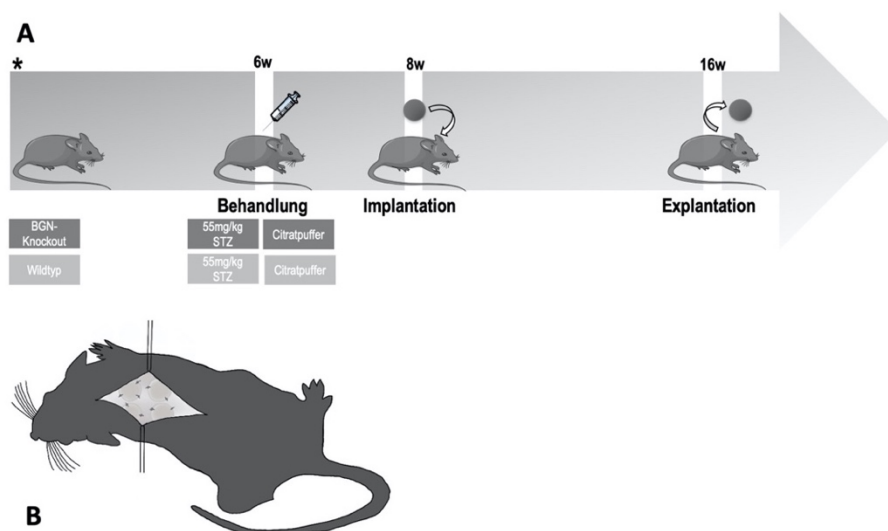


Abb. 3.: Schematisches Versuchsprotokoll und subkutane Implantation der Patches

A: Übersicht über das Versuchsprotokoll zur Probengewinnung. BGN = Biglykan, STZ = Streptozotocin, * = Geburt, w = Wochen.

B: Subkutane Implantation von vier Patches aus Glutaraldehyd-fixiertem Rinderperikard.

2.2.3 Aufbereitung und Lagerung der Proben

Die Patches für die histologischen Untersuchungen wurden nach der Entnahme halbiert, in Cryocompound eingebettet (Abb. 4) und in mit flüssigem Stickstoff vorgekühltem 2-Methylbutan eingefroren. Nach Aushärtung des Einbettmediums wurden die Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Herzen der Versuchstiere wurden für die Untersuchung der Aortenklappen entnommen, mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gespült und nach Entfernung der Herzspitze *in toto* in Cryocompound eingebettet und analog zu den Patches eingebettet und eingefroren. Das Aufsuchen der Aortenklappe erfolgte während des Schneideprozesses mit dem Kryostat unter mikroskopischer Kontrolle (Abb. 4).

Für die histologische Analyse wurden von den Proben in einem Kryostat Gefrierschnitte mit einer Schichtdicke von $5\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt (Abb. 4). Jeweils zwei Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Für spätere Versuche im Rahmen anderer Arbeiten wurden jeweils 20 Schnitte des Myokards auf Objektträger aufgezogen und bei -20 °C archiviert.

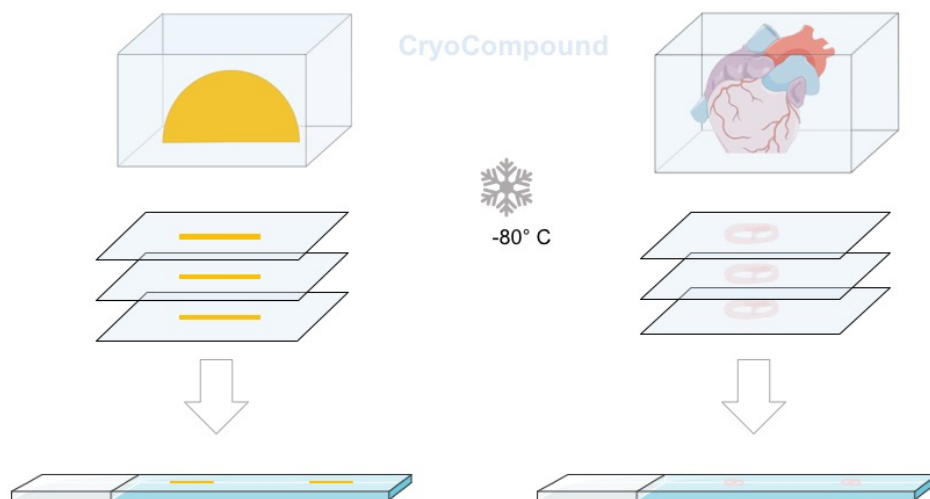


Abb. 4.: Schematische Darstellung der Anfertigung von Kryoschnitten

Die Patches aus glutaraldehydfixiertem Rinderperikard (links, gelb) wurden halbiert und mit der Schnittfläche nach unten eingebettet. Der Kryoblock wurde anschließend von unten angeschnitten, wobei jeweils zwei Kryoschnitte auf einen Objektträger aufgezogen wurden. Die Herzen der Mäuse wurden mit PBS gespült, die Herzspitze wurde entfernt und die Herzen ebenfalls mit der Schnittfläche nach unten eingebettet (rechts). Das Aufsuchen der Aortenklappe erfolgte während des Schneideprozesses unter mikroskopischer Kontrolle. Dazu wurden die Kryoblöcke von unten angeschnitten und die entstandenen Schnitte bis zum Erreichen der Klappenebene regelmäßig unter einem Durchlichtmikroskop betrachtet. Erstellt mit [27].

2 Material und Methoden

2.2.4 Stichprobe

Die Stichprobe umfasste für die Auswertung der explantierten Patches insgesamt $n = 33$ Proben in den vier Versuchsgruppen Biglykan-defiziente Mäuse ($Bgn^{-/0}$) mit STZ behandelt, $Bgn^{-/0}$ -Kontrolle, Wildtyp (WT) mit STZ behandelt und WT-Kontrolle. Die Verteilung der Proben über die einzelnen Versuchsgruppen ist in Tabelle 3 dargestellt. Für die Auswertung der nativen Aortenklappen wurde die Stichprobe auf insgesamt 16 Proben verkleinert, da die Herzen der ersten Versuchstiere nicht für die Auswertung konserviert worden waren.

Tabelle 3: Anzahl der Proben in den einzelnen Versuchsgruppen

	Streptozotocin		Kontrolle	
	Patches	Aortenklappen	Patches	Aortenklappen
Wildtyp	11	4	7	4
$Bgn^{-/0}$ (Biglykan-defiziente Mäuse)	6	4	9	4

2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Darstellung der Struktur der Patches wurden die Proben mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Basische Strukturen wie Plasmaproteine und Kollagen werden dabei durch Eosin rot angefärbt, saure Strukturen wie die DNA im Zellkern stellen sich durch Färbung mit Hämalaun bläulich dar.

Die Kryoschnitte wurden dafür 10 min bei Raumtemperatur aufgetaut und 1 min in Hämatoxylin gefärbt. Nach einem Waschschrift mit $Aqua_{dest}$ (1 min) wurden die Hämatoxylin-gefärbten Proben für jeweils 1 min mit 5 %iger Essigsäure oxidiert, in $Aqua_{dest}$ getaucht und 2 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Kryoschnitte in 70 %iges Ethanol getaucht, mit Eosin-Lösung (Tabelle 4) für 12 min gegengefärbt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (jeweils 1 min in 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Ethanol, Xylol, Xylol). Nach dem Lufttrocknen wurden die Schnitte mit *Roti Histokitt II* eingedeckt.

Tabelle 4: Herstellung von Eosin-Lösung für HE-Färbungen

5% Eosin-Lösung
1 g Eosin
100 ml $Aqua_{dest}$
100 ml Ethanol (100%)
200 μ l Essigsäure (100%)

2.4 Movat-Pentachrom-Färbung

Um verschiedene Komponenten der EZM darzustellen wurden die Kryoschnitte mittels Movat-Pentachrom-Färbung untersucht. Dazu wurden die Objektträger vor der Färbung über Nacht bei 37 °C inkubiert und das Gewebe nach Rehydratisierung in Aqua_{dest} mit 4 %iger Formaldehydlösung fixiert. Nach dem Waschen in Aqua_{dest} (1 min) wurden die Objektträger für 10 min in auf 50 °C erhitzte *Bouin'sche Lösung* (Tabelle 5) gestellt und 10 min unter fließendem, kaltem Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 10 min in 5 %iger Natriumthiosulfatlösung fixiert und dreimal für 2 min in Aqua_{dest} gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung in 1 %iger Alcianblaulösung und ein Waschschriff mit Leitungswasser (3,5 min) gefolgt von einer Inkubation für 10 min in erhitztem alkalischem Alkohol (Tabelle 5) und ein erneutes Waschen mit Leitungswasser (3,5 min). Die Proben wurden dann für 9 min mit Weigert's Arbeitslösung (Tabelle 6) und für 1 min mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsin- Arbeitslösung (Tabelle 7) gefärbt. Nach jedem dieser Schritte folgten mehrere Waschschriffe mit Leitungswasser (1 min) und Aqua_{dest} (2 min, 2 min, 1 min). Anschließend wurde die Differenzierung mittels 5 %iger Phosphorwolframsäure für 5 min durchgeführt. Die Schnitte wurden mit 1 %iger Essigsäure gespült, mit Aqua_{dest} gewaschen (2 min, 2 min, 1 min) und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96 % Ethanol, 100 % Ethanol, 100 % Ethanol) entwässert. Danach wurden die Proben mit alkoholischem Safran gefärbt (Tabelle 6, 8 min), mit 100 % Ethanol (2 min) gespült und dreimal für jeweils 5 min in Xylol entfettet. Die Schnitte wurden mit *Roti Histokitt II* eingedeckt.

Tabelle 5: Herstellung von Bouin'scher Lösung, Alkalischem Alkohol und Jodlösung für Movat- Pentachrom- Färbungen

Bouin'sche Lösung	Alkalischer Alkohol	Jodlösung
300 ml Pikrinsäure	360 ml Ethanol (96%)	10 g Jod
100 ml Formaldehyd (37 %)	40 ml Ammoniumhydroxid (30 %)	20 g Kaliumjodid
20 ml Eisessig		500 ml Aqua _{dest}

Tabelle 6: Herstellung von Eisenchloridlösung, Weigert's Arbeitslösung und alkoholischem Safran für Movat-Pentachrom-Färbungen

Eisenchloridlösung	Weigert's Arbeitslösung	Alkoholischer Safran
12,4 g Eisen-Chlorid-Hexahydrat	60 ml alkoholisches Hämatoxylin (2 %)	12 g Safran du Gatinais
5 ml Salzsäure (37 %)	40 ml Eisenchlorid	200 ml Ethanol (100 %)
500 ml Aqua _{dest}	20 ml Jodlösung	

2 Material und Methoden

Tabelle 7: Herstellung von Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Arbeitslösung für Movat-Pentachrom-Färbungen

Brilliant-Crocein Stocklösung	Säurefuchsin Stocklösung	Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Arbeitslösung
4 g Brilliant Crocein R	0,5 g Säurefuchsin	80 ml Brilliant Crocein Stocklösung
398 ml Aqua _{dest}	2,5 ml Essigsäure (100%)	20 ml Säurefuchsin Stocklösung
	497,5 ml Aqua _{dest}	

2.5 Nachweis von Kalkeinlagerungen mittels Von-Kossa-Färbung und Alizarin-Rot- Färbung

Zum Nachweis von Kalzifizierungen des Gewebes wurden Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbungen durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten für beide Färbungen Kryoschnitte von einer stark verkalkten Rattenaorta.

2.5.1 Von-Kossa Färbung

Die Von-Kossa-Färbung dient dem Nachweis von Phosphationen im Gewebe [119]. Dazu wurden die Kryoschnitte zunächst 8 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet. Nach kurzem Eintauchen in Aqua_{dest} wurden die Objektträger für 15 min in 5 %ige Silbernitratlösung (Tabelle 8) überführt. Die Silberionen reagieren dabei mit den Phosphationen des Kalks im Gewebe und verdrängen so die Kalziumionen. Da diese Reaktion lichtabhängig ist, wurde dieser Schritt unter einer Neonröhre durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua_{dest} für jeweils 3 min wurden die Silberphosphate für 2 min mit Natriumkarbonat-Formaldehydlösung (Tabelle 8) zu Silber reduziert. Dabei bildet sich ein schwarzer Niederschlag. Anschließend wurden die Präparate für 10 min mit kaltem Leitungswasser gewaschen und das überschüssige Silber durch 5 %ige Natriumthiosulfatlösung (Tabelle 8, 5 min) entfernt. Nach weiteren Waschschritten in Leitungswasser und Aqua_{dest} wurde eine Kernfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (10 min) durchgeführt. Die Schnitte wurden für 3 min mit Aqua_{dest} gewaschen, über eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min in 50 % Ethanol, 70 % Ethanol, 90 % Ethanol, 100 % Ethanol und zweimal 5 min Xylol) entwässert und nach dem Lufttrocknen mit *Roti Histokitt II* eingedeckt.

2 Material und Methoden

Tabelle 8: Zusammensetzung der Silbernitratlösung, Natriumthiosulfatlösung und Natriumkarbonat-Formaldehydlösung für Färbungen nach Von-Kossa

5% Silbernitratlösung	5% Natriumthiosulfat	Natriumkarbonat-Formaldehydlösung
10 g Silbernitrat	10 g Natriumthiosulfat	50 ml Formaldehyd (37 %)
200 ml Aqua _{dest}	200 ml Aqua _{dest}	10 g Natriumkarbonat
		150 ml Aqua _{dest}

2.5.2 Alizarin-Rot-Färbung

Die Alizarin-Rot-Färbung dient dem Nachweis von Kalziumeinlagerungen im Gewebe. Dafür wurden die Kryoschnitte für 5 min aufgetaut und anschließend kurz in Aqua_{dest} getaucht. Danach wurden die Objektträger für 2 min mit einer 2 %igen Alizarin-Rot-Lösung gefärbt (der pH-Wert der Färbelösung wurde zuvor mit 10 % Ammoniumhydroxid auf 4,2 eingestellt). Dabei bildet das Alizarin mit dem Kalzium des Gewebes ein Chelat und stellt sich intensiv rot dar [120]. Die Schnitte wurden zum Entfärben und Entwässern jeweils zwanzigmal in Aceton und anschließend in eine Aceton-Xylol-Lösung (1:1) eingetaucht. Nach dem Entfetten in Xylol für 2 min und anschließendem Lufttrocknen wurden die Schnitte mit *Roti Histokitt II* eingedeckt.

2.6 4',6-Diamidin-2-phenylindo (DAPI)-Zellkernfärbung

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluorochrom, das sich an die doppelsträngige DNA im Zellkern anlagert und bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau fluoresziert und somit die Identifikation von Zellkernen mittels Immunfluoreszenz ermöglicht. Für diese Färbung wurden die Kryoschnitte zunächst für 10 min in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen (jeweils 1 min). Die Präparate wurden im Folgenden für 10 min mit 0,25 %iger Triton-X-Lösung behandelt. Triton-X permeabilisiert die Zellmembran für große Proteine und Moleküle. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS-Lösung (jeweils 1 min) erfolgte die 10-minütige Inkubation mit DAPI-Lösung (1:1.000 in PBS). Dieser sowie alle weiteren Schritte erfolgten zur Schonung des Fluorochroms weitestgehend unter Vermeidung von direkter Lichteinstrahlung. Nach drei weiteren Waschschritten in PBS (jeweils 1 min) und kurzem Entwässern in 100 % Ethanol (1 min) wurden die Objektträger mit einem wässrigen Eindeckmedium (*Leica CV Mount*) eingedeckt und lichtgeschützt gelagert.

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Prinzip der indirekten Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht es, Proteine und andere Strukturen in einem Gewebe gezielt anzufärben und somit ihre Verteilung auf lichtmikroskopischer Ebene sichtbar zu machen. Sie beruht auf der Grundlage der Antigen-Antikörper-Reaktion, die einen festen Immunkomplex bilden. Bei der indirekten Immunhistochemie bindet ein spezifischer Antikörper mit seinem F_{ab} -Teil an ein Epitop. Der F_c -Teil dieses Erstantikörpers wird anschließend durch einen Zweitantikörper gebunden. Der Zweitantikörper kann dann auf verschiedene Arten detektiert werden.

2.7.2 Immunhistochemische Färbungen mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)

Für Färbungen mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ist der F_c -Teil des Zweitantikörpers mit einem Enzym, der Meerrettichperoxidase (*horse raddish peroxidase*, HRP), konjugiert. Diese katalysiert die Oxidation von Wasserstoffperoxid zu Wasser. Dabei entstehen Protonen, die zu einem braunschwarzen Farbumschlag des farblosen DAB führen (Abb. 5).

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Kryoschnitte zunächst mit einem Dako-Pen großzügig umrandet, für 10 min mit 4 %iger Formaldehydlösung fixiert und dreimal in PBS-Lösung gewaschen (1 min). Anschließend wurden die Präparate mit 0,25 %iger Triton-X-Lösung behandelt. Triton-X permeabilisiert die Zellmembran für größere Proteine wie Antikörper. Danach wurden die Präparate erneut dreimal mit PBS gewaschen und schließlich für eine Stunde in eine Blockierlösung aus PBS, bovinem Serumalbumin (BSA) und Tween20 (Tabelle 9) gestellt. Dabei werden unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert, sodass der Erstantikörper möglichst spezifisch an das gewünschte Antigen binden kann. Die Objektträger wurden nach dem Blockiervorgang kurz in PBS getaucht und für eine Stunde in einer Feuchtkammer mit der Erstantikörperlösung (in PBS, Tabelle 11) inkubiert. Danach wurde die gewebeigene Peroxidase, die vor allem in Hämoglobin, Myoglobin und Cytochromen vorkommt, mit einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung (in PBS) blockiert (10 min). Es folgte die Inkubation mit der Zweitantikörperlösung (in PBS, Tabelle 11) in einer Feuchtkammer für 45 min. Die Objektträger wurden dreimal mit PBS gewaschen (5 min) und dann für 10 min in eine Pufferlösung mit Tris-aminomethan (TB-Puffer, Tabelle 9) gestellt. Anschließend erfolgte die Detektion des Zweitantikörpers mit DAB. Dafür wurden die Präparate mit der Substrat-Chromogen-Lösung (1:20) inkubiert, bis sich ein deutlicher Farbumschlag zeigte. Die Inkubationszeit wurde für alle Präparate einer

2 Material und Methoden

Färbung exakt gleich gehalten, unterschied sich jedoch zwischen den einzelnen Färbungen (Tabelle 11). Die Objektträger wurden zum Beenden der DAB-Reaktion erneut für 5 min in einen TB-Puffer gestellt. Es folgte eine Kernfärbung mit Hämalaun. Dafür wurden die Objektträger in Aqua_{dest} getaucht, für 1 min in Mayers Hämalaunlösung gefärbt, in Leitungswasser gebläut, kurz in 1 %ige Salzsäure getaucht und für 5 min unter kaltem Leitungswasser gespült. Die Präparate wurden abschließend mit Ethanol (99 %) entwässert und nach dem Lufttrocknen mit *Roti Histokitt II* eingedeckt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Blockierlösung und des TB-Puffers für DAB-Färbungen

Blockierlösung	10x TB-Puffer
5g BSA	60,57 g Tris-aminomethan
100 µl Tween20	1 l Aqua _{dest}
99,5 ml PBS	pH mit HCl auf 7,6 einstellen
	vor Gebrauch mit Aqua _{dest} verdünnen (1:10)

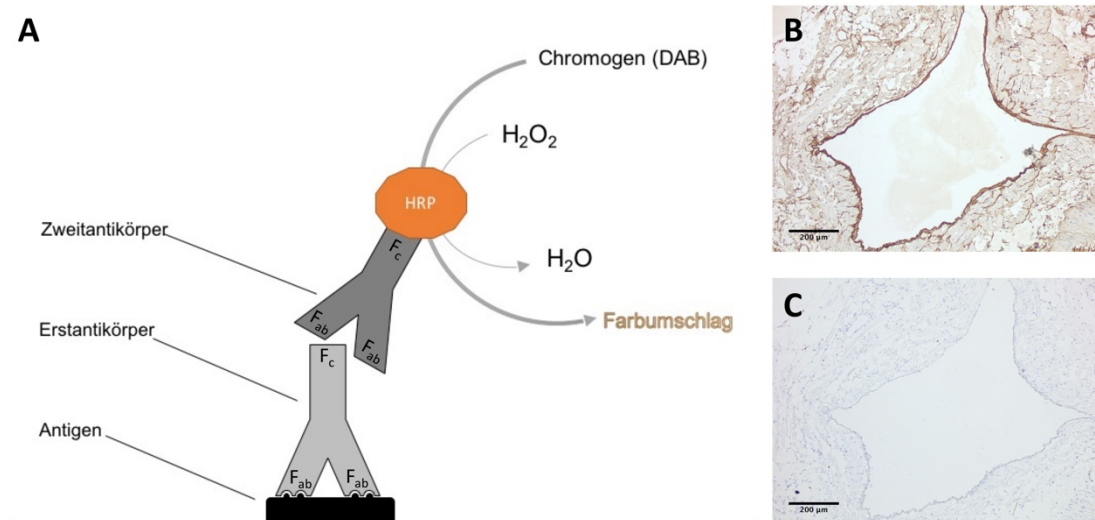


Abb. 5: Prinzip der Immunhistochemie mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)

A: Schematische Abbildung. Das Antigen wird vom F_{ab}-Teil des Erstantikörpers gebunden. Der Zweitantikörper bindet an den F_c-Teil des Erstantikörpers und ist mit einer Meerrettichperoxidase (*horse raddish peroxidase*, HRP) konjugiert. Diese wandelt Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Wasser (H₂O) um. Dabei werden Protonen frei, die einen Farbumschlag des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) bewirken.

B und C: Elastin-Färbung mit DAB. Hier wurde als Positivkontrolle (B) ein murines Herz verwendet. C: Die Negativkontrolle (C) wurde ohne Erstantikörper, aber mit Zweitantikörper inkubiert und dient als Vergleichsprobe, um unspezifische Bindungen zu detektieren. Lichtmikroskopische Aufnahme in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 200 µm.

2.7.3 Proteoglykanfärbungen mit DAB

Die Proteoglykane Biglykan und Decorin sind Bestandteile der EZM. Sie bestehen aus einem Kernprotein, das über n-glykosidische oder o-glykosidische Bindungen mit Seitenketten aus GAGs verbunden ist. Da die Antikörper für die DAB-Färbung mit dem Kernprotein interagieren, müssen die GAG-Seitenketten vor Inkubation mit dem Erstantikörper abgespalten werden. Dafür wurden die Kryoschnitte nach dem Auftauen bei Raumtemperatur (5 min) und einer Fixierung in 4 %igem Formaldehyd (10 min) in eine Feuchtkammer überführt und für eine Stunde bei 37° C mit Chondroitin-ABC-Lyase (2U/100µl, 1:100 in ABC-Puffer (Tabelle 10)) behandelt. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und für eine Stunde in eine Blockierlösung (Tabelle 10) gestellt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Tabelle 11) für eine Stunde in einer Feuchtkammer. Die Präparate wurden danach dreimal mit PBS gewaschen (jeweils 5 min) und für 5 min in eine 3 %ige Wasserstoffperoxidlösung (in PBS) gestellt, um die endogenen Peroxidasen des Gewebes zu blockieren. Dann erfolgte nach einem erneuten Waschen mit PBS die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 45 min in einer Feuchtkammer. Der anschließende Detektionsschritt sowie eine Kernfärbung mit Mayers Hämalaunlösung wurden analog der anderen DAB-Färbungen durchgeführt.

Tabelle 10: Lösungen für Proteoglykanfärbungen

Blockierlösung	ABC-Puffer
20 ml 10x TBS	0,6 g Tris Sigma 7-9
20 ml Fetales Kälberserum (FCS)	1,33 g Natriumacetat-Trihydrat
2g Bovines Serumalbumin (BSA)	0,3 g Natriumchlorid (NaCl)
200 ml Aquadest	100 mg BSA
	100 ml Aqua _{dest}

2 Material und Methoden

Alle Antikörperlösungen wurden mit PBS verdünnt. Die Erstantikörper der Proteoglykanfärbungen wurden mit PBS + 1% BSA verdünnt.

Tabelle 11: Erst- und Zweitantikörper für DAB-Färbungen

	Erstantikörper	Zweitantikörper	Inkubationszeit DAB
αSMA	rabbit anti human ab5694 Abcam (Cambridge UK) 1:300	goat anti rabbit 111-035-003 Dianova (Hamburg) 1:500	10 min
Mac2	rat anti human CL8942AP Cedarlane (Burlington, Canada) 1:600	goat anti rat NB7126 Novus Biologicals (Centennial, USA) 1:600	10 min
vWF	rabbit anti human A0082 Dako (Santa Clara, USA) 1:300	goat anti rabbit 111-035-003 Dianova (Hamburg) 1:500	10 min
Kollagen Typ I	goat anti human AB758 Millipore (Burlington USA) 1:20	rabbit anti goat 305-035-003 Dianova (Hamburg) 1:500	10 min
Elastin	rabbit anti mouse ab21610 Abcam (Cambridge UK) 1:50	goat anti rabbit 111-035-003 Dianova (Hamburg) 1:500	10 min
Decorin	rabbit anti rat LF113 Laboratory of Larry W. Fisher (US) 1:500	goat anti rabbit 111-035-003 Dianova (Hamburg) 1:500	3 min
Vimentin	rat anti human Ab115189 Abcam (Cambridge, UK) 1:25	goat anti rat NB7126 Novus Biologicals (Centennial, USA) 1:400	10 min
Biglykan	rabbit anti rat LF159 Laboratory of Larry W. Fisher (USA) 1:500	goat anti rabbit 111-035-003 Dianova (Hamburg) 1:500	10 min

Angegeben sind die Wirtspezies, die Bestellnummer, der Hersteller und die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Dilutionsfaktoren der Primär- und Sekundärantikörper der DAB-Färbungen sowie die Inkubationszeit mit dem Chromogen. min = Minuten, α SMA = Glattmuskelaktin, vWF = von-Willebrand-Faktor, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin.

2.7.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für α SMA und Vimentin

Die Immunfluoreszenz ist eine weitere Methode, ein bestimmtes Antigen und seine Verteilung in einem Gewebe nachzuweisen. Der dabei verwendete Sekundärantikörper ist an seinem F_c -Teil mit einem Fluorochrom konjugiert, welches bei Anregung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge fluoresziert (Abb 6).

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Kryoschnitte zunächst mit auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gekühltem Aceton fixiert (10 min) und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (jeweils 1 min). Danach wurden die Objektträger für 10 min in eine 0,25 %ige Triton X-Lösung gestellt, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Nach einem Waschschrift erfolgte ein 60-minütiger Proteinblock mit einer Blockierlösung (Tabelle 9), um unspezifische Bindungen der Primärantikörper zu verhindern. Die Präparate wurde dann dreimal mit einer 0,1%igen Tween20-Lösung (in PBS) gewaschen. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte in einer Feuchtkammer in einem Wärmeschrank bei $37\text{ }^\circ\text{C}$. Dazu wurden die beiden Primärantikörper mit einer 1 %-BSA-0,1 % Tween-PBS-Lösung verdünnt und auf die Proben pipettiert. Nach einer Stunde wurden die Kryoschnitte mit 0,1 %iger Tween20-Lösung gewaschen (dreimal 1 min). Danach erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern für 1 min in einer Feuchtkammer bei $37\text{ }^\circ\text{C}$. Die Zellkerne wurden anschließend zur besseren Orientierung im Präparat mit DAPI gefärbt (5 min bei Raumtemperatur). Die Präparate wurden abschließend dreimal mit PBS gewaschen (jeweils 5 min), für 1 min in Aqua_{dest} überführt und mit Ethanol (100 %) entwässert. Nach dem Lufttrocknen wurden die Kryoschnitte mit einem wässrigen Eindeckmedium (*Leica CV Mount*) eingedeckt und lichtgeschützt gelagert.

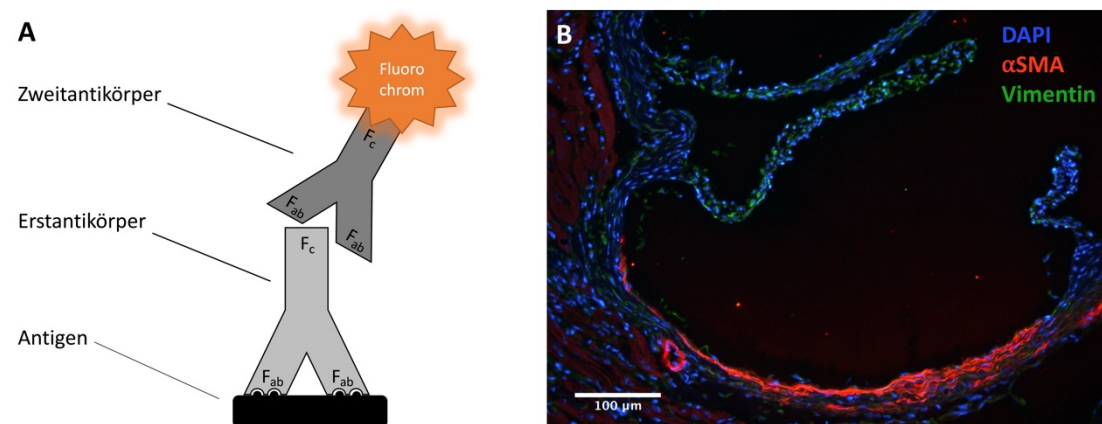


Abb. 6: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen

A: Schematische Abbildung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung. Der Erstantikörper bindet mit seinem F_{ab} -Teil an sein Antigen und wird am F_c -Teil von einem Zweitantikörper gebunden. Dieser ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Fluorochrom) konjugiert.

B: Fluoreszenzmikroskopische Overlay-Aufnahme einer murinen Aortenklappentasche 200-facher Vergrößerung. Glattmuskelaktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) wurden mit Antikörpern markiert. Die Kernfärbung erfolgte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau). Maßstab = $100\text{ }\mu\text{m}$.

2 Material und Methoden

Tabelle 12: Erst- und Zweitantikörper für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für Glattmuskelaktin und Vimentin

	Erstantikörper	Zweitantikörper
Glattmuskelaktin (αSMA)	rabbit anti human ab5694 Abcam (Cambridge, UK) 1:100	goat anti rabbit A11010 AlexaFluor [®] 546 Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) 1:100
Vimentin	guinea pig anti bovine GP53 Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg 1:100	goat anti guinea pig A11077 AlexaFluor [®] 488 Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) 1:100

Angegeben sind die Wirtspezies, die Bestellnummer, der Hersteller und die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Dilutionsfaktoren der Primär- und Sekundärantikörper.

2.7.5 Etablierung von Versuchsprotokollen

Im Rahmen dieser Arbeit mussten die Versuchsprotokolle für die immunhistochemischen Färbungen inklusive der Erst- und Zweitantikörper im Labor neu etabliert werden.

Grund dafür war zum einen die in der Fixierung des Gewebes mit Glutaraldehyd sowie die in der speziellen Konstellation mit zwei Wirten (Rinderperikard in Mausgewebe) begründete Singularität des untersuchten Gewebes. Zum anderen wurde die Produktion der zuvor im Labor etablierten polyklonalen Antikörper der Firma *Santa Cruz Biotechnology* im Jahr 2016 aus tierschutzrechtlichen Gründen eingestellt.

Zur Etablierung der Versuchsprotokolle wurden in Vorversuchen verschiedene Konzentrationen der Erst- und Zweitantikörper sowie unterschiedliche Fixierlösungen miteinander kombiniert, um das beste Verhältnis von deutlicher Signalqualität und wenig Grundrauschen durch unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu finden.

2.8 Bildverarbeitung und Analyse

Die Auswertung der HE-Färbung und der Movat-Pentachrom-Färbung erfolgte deskriptiv unter Betrachtung der Schnitte bei 50-, 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung. Zur Dokumentation und Auswertung der Färbungen wurden dabei Bilder mit einer Mikroskopkamera und der dazugehörigen Software (Leica Application Suite Version 3.8, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) aufgenommen und im jpg-Format gespeichert. Zur Erfassung des gesamten Patches wurden drei Bilder in 50-facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend virtuell zusammengesetzt. Die Aortenklappen konnten in 50-facher Vergrößerung in einem Bild vollständig erfasst werden.

Für die Bildverarbeitung (Zusammenfügen einzelner Probenausschnitte zum Gesamtbild, Integrieren des Maßstabsbalkens (*scale bar*), Erstellung von Bildausschnitten) sowie die Messung von relativen Flächenanteilen und der Einwanderungstiefe wurde die lizenzfrei verfügbare Software *Fiji* (Version 2.0.0-rc-65/1.523) verwendet [121].

In den DAB-Färbungen wurden die mit DAB markierten Flächen vermessen und ihr Anteil an der Gesamtfläche der Perikardstanze bzw. des Aortenringes in Prozent berechnet (*Area fraction*, AF). Die einzelnen Bilder in 50-facher Vergrößerung wurden zunächst mit der Funktion *Stitching* digital zu einem Gesamtbild der Probe zusammengefügt [122]. Die Auswahl des Bereiches von Interesse (*region of interest*, ROI) im Sinne der Bestimmung des äußeren Randes der Patches beziehungsweise des Aortenringes erfolgte manuell. Anschließend wurde durch Anwendung des Dekonvolutions-Filters für DAB-Färbungen (*color deconvolution*) die Trennung der einzelnen Farbkanäle durchgeführt. Nach Bestimmung eines für die einzelne Färbung geeigneten einheitlichen Schwellenwertes (*threshold*) konnte die AF bestimmt werden. Der geeignete Schwellenwert wurde für jede Färbung gesondert bestimmt und anschließend auf alle Bilder der Reihe angewendet. Zur Sicherstellung der Wirksamkeit des Dekonvolutions-Filters wurden einzelne Proben stichprobenartig manuell ausgewertet und mit den halbautomatisch generierten Ergebnissen verglichen.

Die Auswertung der Von-Kossa-Färbung erfolgte mit Hilfe eines fünfstufigen Scores bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Schnitte in 100-facher Vergrößerung.

Für die DAPI-Färbung der Patches wurden die in acht Einzelaufnahmen in 100-facher Vergrößerung aufgenommen Bilder zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Die Auswertung wurde mittels Vergleich der mittleren Migrationstiefe DAPI-positiver Zellkerne vorgenommen, die schematisch in Abbildung 9 A dargestellt ist.

2 Material und Methoden

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für α SMA und Vimentin der Aortenklappen erfolgte deskriptiv nach Erstellung von Overlayaufnahmen durch den Vergleich von Einzelaufnahmen in 100-facher Vergrößerung.

2.9 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden in Microsoft Excel gespeichert und schließlich mit der Software *GraphPad Prism* Version 7.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) grafisch dargestellt und statistisch ausgewertet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Zur statistischen Auswertung der ungepaarten nicht-parametrischen Daten wurde beim Vergleich aller vier Gruppen der *Kruskal-Wallis-test* mit anschließendem *Dunn's multiple comparison-test* angewendet. Bei einem direkten Vergleich zweier Gruppen untereinander wurden die Daten mit dem *Mann-Whitney-U-test* analysiert. Dabei wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ das Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Struktur der Explantate

Zur Übersicht und zur deskriptiven Auswertung der Proben wurden die Präparate zunächst mittels HE-Färbung und Movat-Pentachrom-Färbung untersucht (Abb. 7). Eosinophile Strukturen wie Plasmaproteine und Kollagen werden in der HE-Färbung rot bis rosa angefärbt, basophile Strukturen wie z.B. die DNA der Zellkerne erscheinen bläulich. In der HE-Färbung stellten sich die Patches als Verbund von locker nebeneinanderliegenden, blass rosanen bindegewebigen Strängen dar. Um diese herum zeigte sich eine zweischichtige Fremdkörperkapsel variabler Dicke mit einer zellreichen, bläulichen Schicht innen und einer zellärmeren, bindegewebsreichen Schicht außen (Abb. 7 A, C). Einige der Stenzen waren bereits mit der murinen Muskelfaszie verwachsen, sodass in den Proben neben subkutanem Fett- und Bindegewebe auch Anschnitte von Muskelgewebe zu sehen waren (Abb. 7 A). In etwa einem Drittel der Proben war zudem randständig das nicht resorbierbare Nahtmaterial angeschnitten (Abb. 7 C). Um den Faden herum zeigte sich eine zirkuläre Ansammlung besonders dicht gepackter, tief blau gefärbter Zellkerne (Abb. 7 E). Von den Rändern der Patches ausgehend fiel außerdem eine Migration von Zellen in das Innere des Prothesenmaterials auf.

Zur weiteren Charakterisierung der verschiedenen Komponenten der EZM der Explantate erfolgte eine Movat-Pentachrom-Färbung. In Abbildung 7 G ist ein Ausschnitt eines nicht implantierten nativen Patches dargestellt. Die glutaraldehydfixierten Perikardstanzen selbst bestanden zu einem großen Teil aus gelb gefärbten strangförmig angeordneten Kollagenfasern. Zudem wiesen sie ringförmige, rot gefärbte Strukturen auf, die das Korrelat von fixierten bovinen perikardialen Blutgefäßen darstellten. Diese Grundstruktur blieb auch in den Explantaten aus den Versuchstieren erhalten (Abb. 7 B, D). Die innere Schicht der aus der HE-Färbung bekannten Fremdkörperkapsel war aufgrund ihrer hohen Zelldichte in der Movat-Pentachrom-Färbung rosa bis lila gefärbt. In der bindegewebsreichen äußeren Kapselschicht zeigte sich neben gelb gefärbtem Kollagen auch ein Anteil von grün gefärbten Proteoglykanen. Während am inneren Übergang zur zellreichen Kapselschicht der Kollagenanteil überwog, zeigte sich am äußeren Rand ein Übergewicht der Proteoglykane (Abb. 7 F). Allein morphologisch ließen sich zwischen den Proben der verschiedenen Versuchsgruppen keine Unterschiede detektieren.

3 Ergebnisse

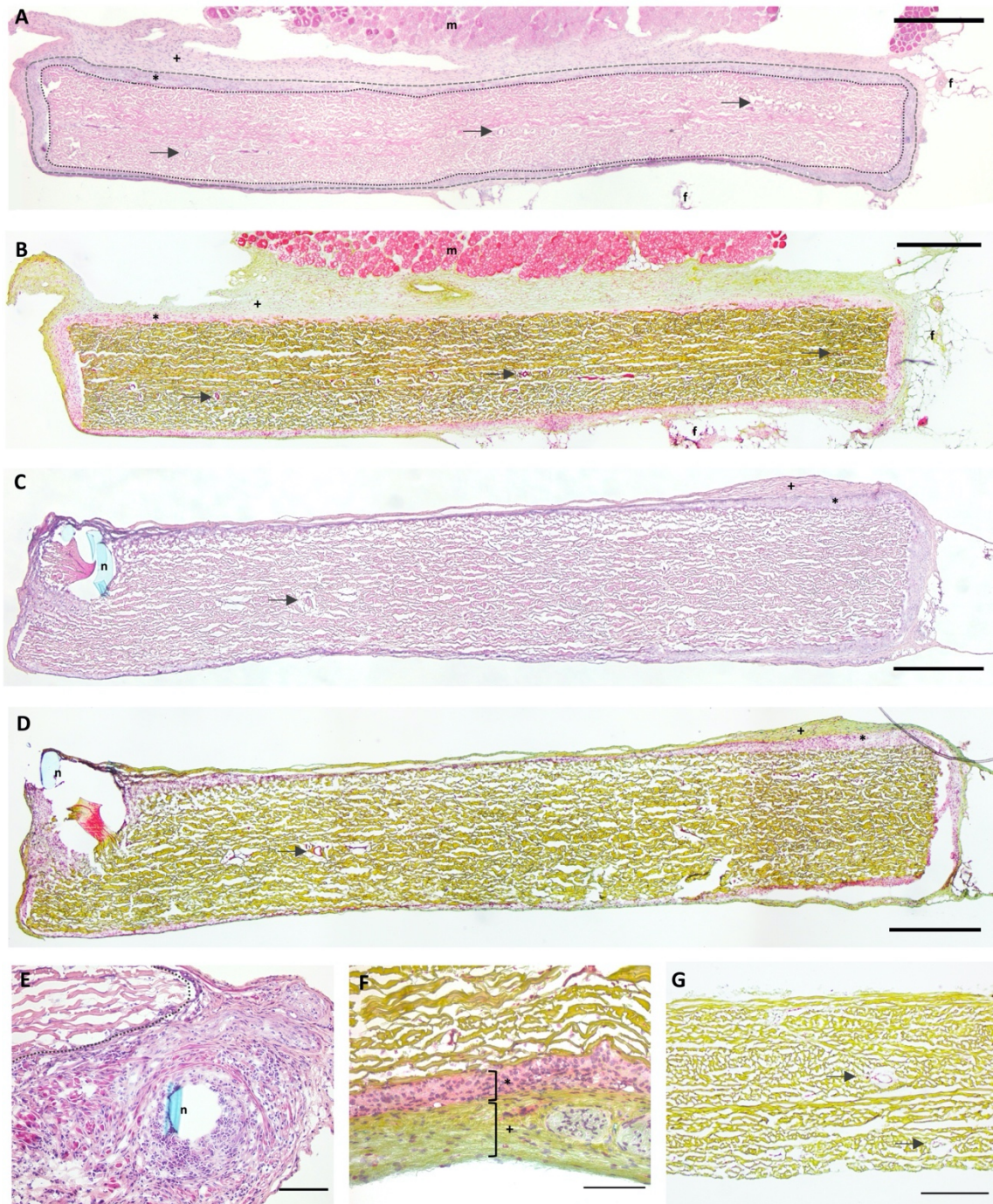


Abb. 7: Übersichtsaufnahmen in HE- und Movat-Pentachrom-Färbung

A: Lichtmikroskopische Aufnahme eines HE-gefärbten Patches in 50-facher Vergrößerung. Probe aus der WT-Kontrolle-Versuchsgruppe. Um das glutaraldehydfixierte Rinderperikard (gepunktete Linie) herum zeigt sich eine zweischichtige Fremdkörperkapsel mit zellreicher Schicht innen (*, gestrichelte Linie) und zellärmerer, bindegewebsreicher Schicht außen (+). Mit Pfeilen markiert sind glutaraldehydfixierte bovine Gefäße. f = murines subkutanes Fettgewebe, m = murines Muskelgewebe. Maßstab = 500 µm.

B: Lichtmikroskopische Aufnahme der auch in A gezeigten Probe in Movat-Pentachrom-Färbung in 50-facher Vergrößerung. * = zellreiche Kapselschicht, + = zellärmere, bindegewebsreiche Kapselschicht, f = murines subkutanes Fettgewebe, m = murines Muskelgewebe. Mit Pfeilen markiert sind glutaraldehydfixierte bovine Gefäße (rot). Maßstab = 500 µm.

C: HE-Färbung einer Probe aus der Bgn^{-/-}-Kontrolle-Versuchsgruppe in 50-facher Vergrößerung. Maßstab = 500 µm.

3 Ergebnisse

D: In B gezeigte Probe in Movat-Pentachrom-Färbung in 50-facher Vergrößerung. Maßstab = 500 µm.

E: Lichtmikroskopische Aufnahme eines HE-gefärbten Patches in 200-facher Vergrößerung. Die gepunktete Linie markiert die Grenze der Prothesentanze. Um die Nahtstellen herum ist eine erhöhte Zelldichte zu beobachten. Maßstab = 100 µm.

F: Lichtmikroskopische Aufnahme eines nach Movat-Pentachrom-Färbung gefärbten Patches in 200-facher Vergrößerung. Zweischichtige Fremdkörperkapsel mit innerer zellreicher Schicht (*, rosa bis lila) und äußerer zellärmerer, bindegewebsreicher Schicht (+) aus Kollagen (gelb, innen) und Proteoglykanen (grün, außen). Maßstab = 100 µm.

G: Lichtmikroskopische Aufnahme des nativen glutaraldehydfixierten Rinderperikards in 100-facher Vergrößerung. Das Gewebe besteht hauptsächlich aus Kollagensträngen (gelb), glutaraldehydfixierte bovine Gefäße stellen sich rot dar (mit Pfeilen markiert). Maßstab = 100 µm.

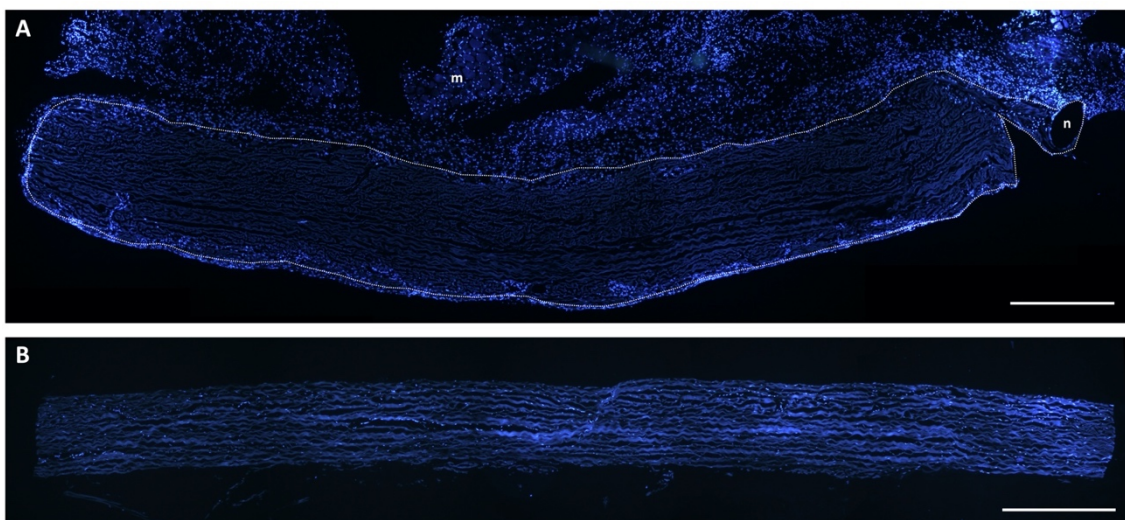
(HE=Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Bgn⁻⁰=Biglykan-defiziente Mäuse, WT=Wildtyp)

3.2 Quantifizierung und Charakterisierung der Zellmigration

Mittels DAPI-Zellkernfärbung sowie immunhistochemischer DAB-Färbungen wurden die migrierten murinen Zellen weiter untersucht.

3.2.1 Quantifizierung der Zellmigration

Zur Untersuchung der Migration von murinen Zellen in die Patches erfolgte eine Zellkernfärbung mit DAPI (Abb. 8). In den nativen Patches kamen dabei an den Kollagensträngen randständig anliegende spindelförmige Fibroblasten zur Darstellung (Abb. 8 B), bei denen es sich um die fixierten Zellen des bovines Perikards handelte. Diese konnten in den Explantaten aus den Versuchstieren zumeist nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 8 A). Stattdessen zeigten sich murine DAPI-positive Zellkerne, die von außen in die Patches migriert waren. Während der mittlere Bereich der Patches weitestgehend zellfrei war, konnte an den äußeren Rändern eine Zelleinwanderung beobachtet werden. Eine Ansammlung von Zellen fand sich zudem insbesondere in den Bereichen um die Nahtstellen herum.



3 Ergebnisse

Abb. 8: DAPI-Zellkernfärbung unter ultraviolettem Licht

A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer DAPI-Färbung eines Patches aus der WT-STZ-Versuchsgruppe in 100-facher Vergrößerung. Die gepunktete Linie markiert die Grenzen des Patches. m = Muskelgewebe, n = Nahtmaterial. Maßstab = 500µm.

B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer DAPI-Färbung einer nicht implantierten nativen Stanze aus glutaraldehydfixiertem Rinderperikard in 100-facher Vergrößerung. An den Kollagensträngen befinden sich randständig spindelförmige Fibroblasten bovinen Ursprungs. Maßstab = 500 µm.

(DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, WT = Wildtyp, STZ = Streptozotocin)

Zur Quantifizierung der zellulären Migration wurde die relative Einwanderungstiefe von DAPI-positiven Zellkernen im Vergleich zur Gesamtdicke des Patches bestimmt (Abb. 9). Die Bestimmung erfolgte gemäß dem in Abbildung 9 A abgebildeten Schema. Äquivalent zu vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe wurde die Messung an insgesamt neun Stellen des Patches durchgeführt und der Mittelwert aller Messungen gebildet. Es zeigte sich für die $Bgn^{-/0}$ -Gruppen eine signifikant erhöhte relative Einwanderungstiefe DAPI-positiver Zellkerne für die Proben der hyperglykämischen Tiere im Vergleich zu denen der normoglykämischen Mäuse. Zwischen den normo- und hyperglykämischen WT-Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 9 B).

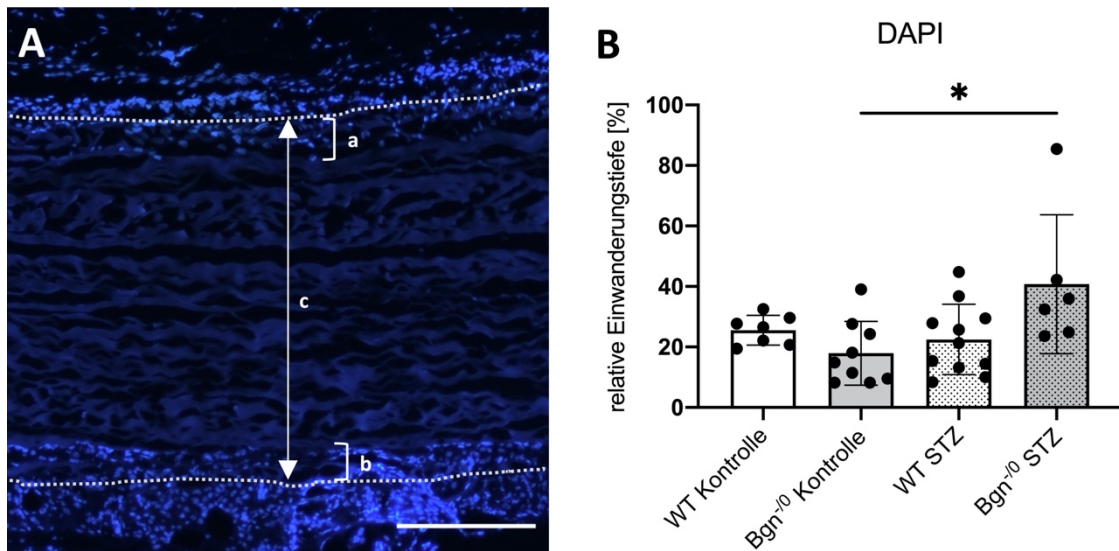


Abb. 9: Relative Einwanderungstiefe DAPI-positiver Zellkerne

A: Schema zur Berechnung der relativen Einwanderungstiefe. Die gepunkteten Linien markieren die obere und untere Grenze des Patches. Relative Einwanderungstiefe = $(a+b)/c \cdot 100$. Insgesamt wurden neun Messungen an verschiedenen Stellen der Stanze durchgeführt und der Mittelwert gebildet. a = obere Einwanderungstiefe (in µm), b = untere Einwanderungstiefe (in µm), c = Gesamtdicke der Patches (in µm). Fluoreszenzmikroskopisches Bild in 100-facher Vergrößerung. Maßstab = 200 µm.

B: Relative Einwanderungstiefe DAPI-positiver Zellen in den vier Versuchsgruppen. Für die $Bgn^{-/0}$ -Gruppen zeigt sich eine signifikant höhere relative Einwanderungstiefe von DAPI-positiven Zellen für STZ-Tiere im Vergleich zu Knockout-Tieren. $p_{\text{gesamt}}=0,0425$. $Bgn^{-/0}$ Kontrolle vs. $Bgn^{-/0}$ STZ: $p=0,0337$. (WT = Wildtyp, $Bgn^{-/0}$ =Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, * = $p < 0,05$)

3 Ergebnisse

3.2.2 Migration inflammatorischer Zellen

Zur Detektion von inflammatorischen Prozessen in den Perikardstanzen und zur weiteren Charakterisierung der migrierenden Zellen wurde eine immunhistochemische DAB-Färbung auf Mac2 (Galectin-3) durchgeführt (Abb. 10). Dieser Rezeptor wird von Makrophagen exprimiert. Als Positivkontrolle wurde eine Milz der Versuchstiere verwendet. Makrophagen zeigten sich in den Proben insbesondere in der zellreichen Schicht der Fremdkörperkapsel um die Patches herum (Abb. 10 A) sowie in den an das Nahtmaterial angrenzenden Bereichen (Abb. 10 C). Auch ein Teil der in die Patches migrierten Zellen konnte mittels dieser Färbung als Makrophagen identifiziert werden. Neben Mac2-positiven Zellen befanden sich auch Mac2-negative Zellen in den Patches (Abb. 10 B).

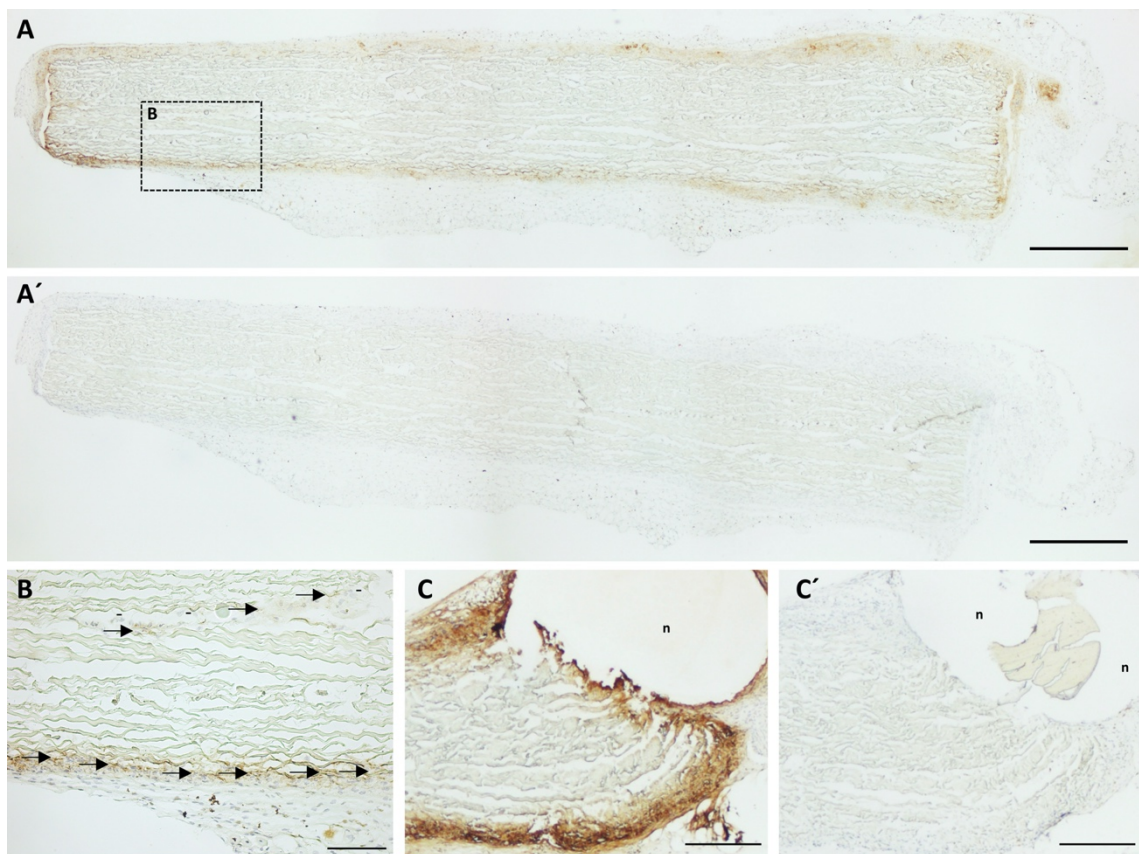


Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis von Makrophagen mittels Mac2-DAB-Färbung

A: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches der WT-STZ-Gruppe nach immunhistochemischer DAB-Färbung auf Mac2 in 50-facher Vergrößerung. Mac2-positive Zellen werden durch einen braunschwarzen Niederschlag detektiert. Maßstab = 500 μ m. **A':** Negativkontrolle zu A. Maßstab = 500 μ m.
B: Vergrößerter Ausschnitt aus A. Neben Mac2-positiven Zellen (Pfeile) zeigt sich auch eine Migration von Mac2-negativen Zellen (-). 200-fache Vergrößerung. Maßstab = 100 μ m.
C: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches der WT-Kontrolle-Gruppe in 100-facher Vergrößerung. n = Nahtstelle. Um die Naht zeigt sich ein besonders ausgeprägtes Signal für Mac2. Maßstab = 200 μ m. **C':** Negativkontrolle zu C.

(DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, WT = Wildtyp, STZ = Streptozotocin)

3 Ergebnisse

Eine Quantifizierung der inflammatorischen Reaktion erfolgte durch die Messung der AF (Abb. 11). Dabei zeigte sich bei der Betrachtung aller Versuchsgruppen untereinander kein signifikanter Unterschied der Mac2-positiven AF (Abb. 11 A). Im isolierten Vergleich der normoglykämischen Gruppen untereinander ergab sich eine signifikant erhöhte Einwanderung von Mac2-positiven Zellen in die Patches aus den $Bgn^{-/0}$ -Tieren im Vergleich zu denen der WT-Tiere (Abb. 11 B). In der visuellen Betrachtung der Ergebnisse scheinen zwar auch die Proben der hyperglykämischen $Bgn^{-/0}$ -Gruppe eine höhere Mac2-Infiltration im Vergleich zur WT-Gruppe aufzuweisen, die statistische Untersuchung zeigte hier jedoch keine Signifikanz. Auffällig war in der hyperglykämischen $Bgn^{-/0}$ -Gruppe die starke Streuung der Einwanderung von Mac2-positiven Zellen mit drei stark betroffenen Proben und drei wenig betroffenen Proben.

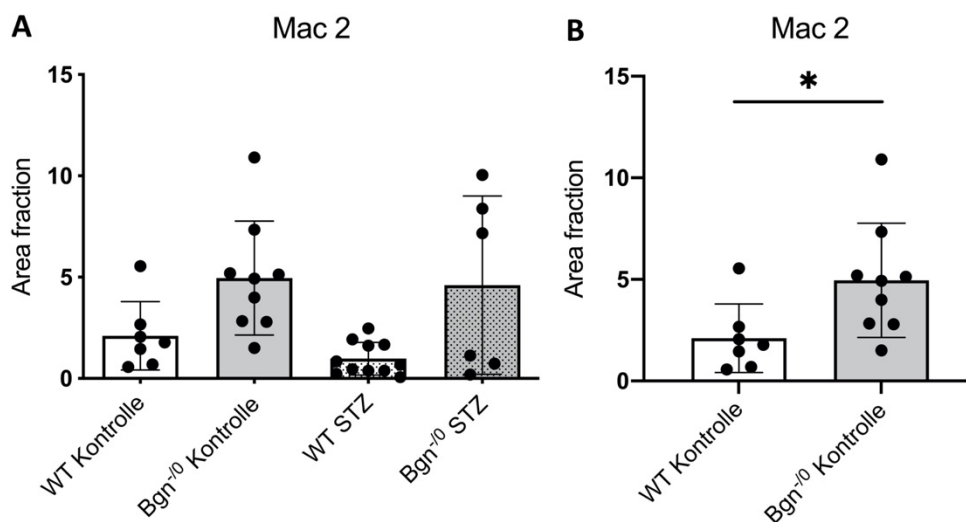


Abb. 11: Quantitative Auswertung der Mac2-DAB-Färbung

A: Vergleich der AF der Mac2-positiven Zellen in den Patches der vier Versuchsgruppen. $p=0,0056$, statistischer Unterschied hier aber nur für $Bgn^{-/0}$ Kontrolle vs. WT STZ.

B: Isolierter Vergleich der Kontrollgruppen. Bei direktem Vergleich der Kontrollgruppen zeigt sich für die Proben $Bgn^{-/0}$ -Gruppe eine signifikant erhöhte ($p=0,0229$) Besiedlung mit Mac2-positiven Zellen im Vergleich zur WT-Gruppe.

(WT = Wildtyp, $Bgn^{-/0}$ =Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, * = $p<0,05$)

3 Ergebnisse

3.2.3 Nachweis myofibroblastischer Aktivierung

Zur weiteren Charakterisierung der migrierenden Zellen und zum Nachweis myofibroblastischer Aktivierung und Fibrosierung wurde eine immunhistochemische DAB-Färbung mit einem Primärantikörper gegen Glattmuskelaktin (*alpha smooth muscle actin*, α SMA) durchgeführt (Abb. 12). Als Positivkontrollen wurden Schnitte eines murinen Herzens verwendet, in dem sich α SMA in den glatten Muskelzellen der myokardialen Blutgefäße befindet (Abb. 12 A).

In den Proben aus den Versuchstieren fanden sich vereinzelt Ansammlungen von α SMA-positiven Zellen. Diese lagen insbesondere in der die Patches umgebenden Kapsel und wiesen meist eine zirkuläre Konfiguration auf, sodass sie wahrscheinlich den glatten Muskelzellen der Wirtsgefäße entsprachen (Abb. 12 B, C). Eine Migration von α SMA-positiven Zellen in die Patches ließ sich nicht in relevantem Ausmaß darstellen, sodass auf eine Quantifizierung verzichtet wurde. Unter den einzelnen Versuchsgruppen fanden sich in Hinblick auf α SMA-positive Zellen in den Proben keine Unterschiede.

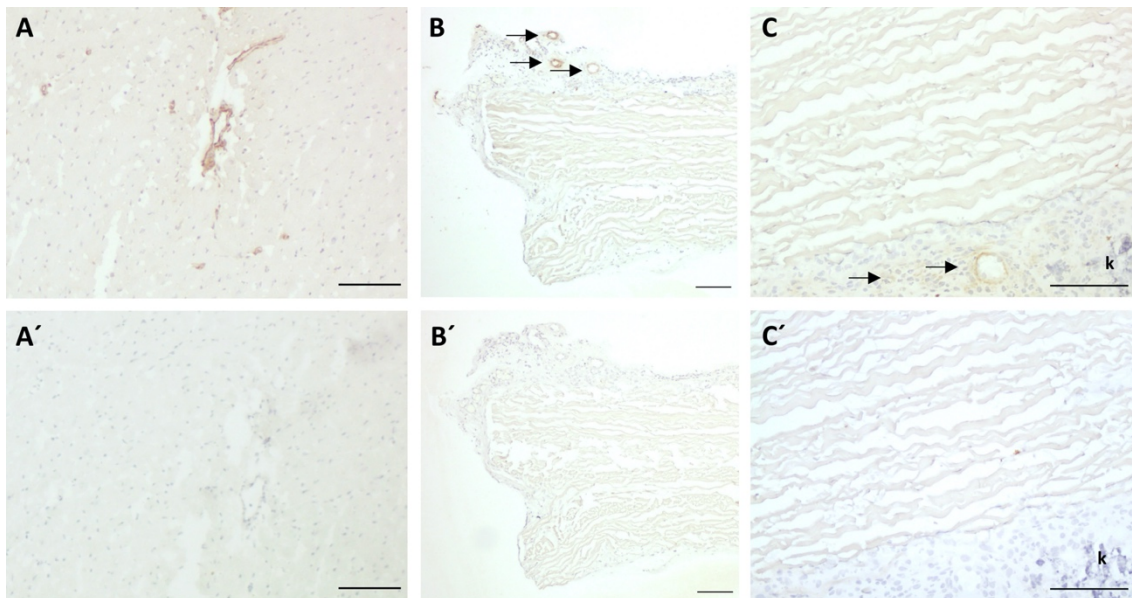


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis von α SMA mittels DAB-Färbung

A: Lichtmikroskopische Aufnahme von murinem Myokard (Positivkontrolle) nach immunhistochemischer DAB-Färbung auf α SMA in 200-facher Vergrößerung. Nachweis von α SMA in einem kleinen Gefäß. Maßstab = 500 μ m. **A':** Negativkontrolle zu A.

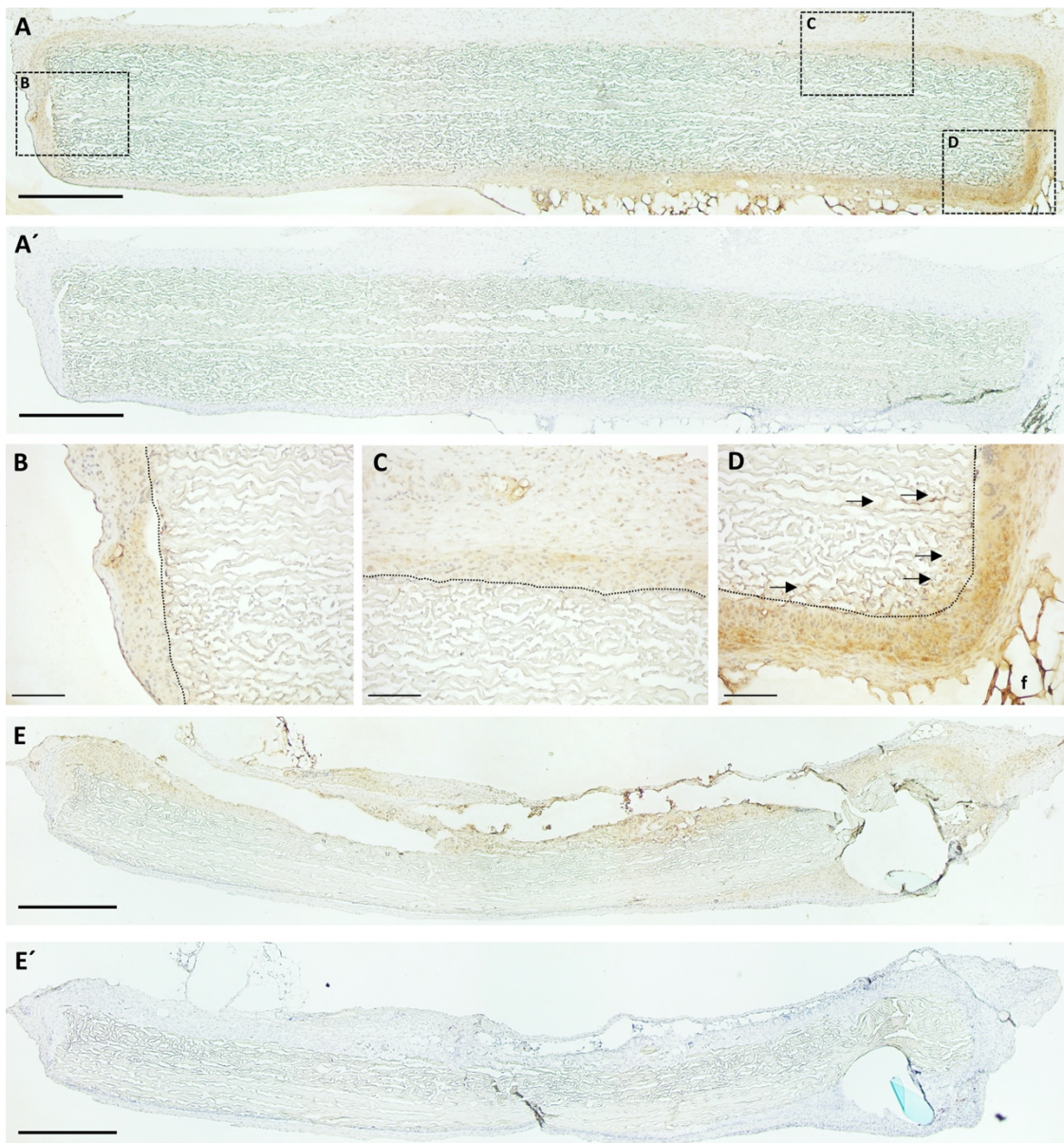
B: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches aus der WT-STZ-Gruppe nach immunhistochemischer DAB-Färbung auf α SMA in 100-facher Vergrößerung. Ansammlungen α SMA-positiver Zellen sind mit Pfeilen markiert und befinden sich in der Fremdkörperkapsel. Maßstab = 500 μ m. **B':** Negativkontrolle zu B.

C: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches der Bgn⁻⁰-STZ-Gruppe in 200-facher Vergrößerung. Gefäß in der Fremdkörperkapsel in der Umgebung einer Kalkablagerung (k). Maßstab = 500 μ m. **C':** Negativkontrolle zu C.

(WT = Wildtyp, Bgn⁻⁰=Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, α SMA = Glattmuskelaktin)

3.2.4 Migration mesenchymaler Zellen

Zum Nachweis von mesenchymalen Zellen erfolgte eine DAB-Färbung mit einem Primärantikörper gegen Vimentin (Abb. 13). Vimentin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und kommt zum Beispiel in Fibroblasten, Endothelzellen, Chondrozyten und glatten Muskelzellen vor. In den untersuchten Proben ließ sich Vimentin regelhaft in der zellreichen sowie auch in der zellärmeren Schicht der Fremdkörperkapsel um die Patches herum nachweisen (Abb. 13 A, E). Hier zeigte sich zum Teil ein lamellenförmiges Signal (Abb. 13 C). Zudem ließ sich an den äußeren Rändern der Patches auch die Migration von Vimentin-positiven Zellen in das Innere der Patches detektieren (Abb. 13 B, D). In den mittleren Bereichen des Patches kam es kaum zur Migration von Vimentin-positiven Zellen (Abb. 13 C). Ein starkes Signal für Vimentin zeigte sich im murinen subkutanen Fettgewebe, das die Patches umgibt.



3 Ergebnisse

Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin-positiven Zellen mittels DAB-Färbung

A: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches aus der WT-Kontrolle-Gruppe nach immunhistochemischer DAB-Färbung gegen Vimentin in 50-facher Vergrößerung. Mit den Rechtecken sind die in B-D vergrößert dargestellten Ausschnitte gekennzeichnet. Maßstab = 500 µm. **A'**: Negativkontrolle zu A.

B bis D: Vergrößerte Ausschnitte aus A in 200-facher Vergrößerung. Die gestrichelte Linie markierte die Grenze des Patches. Die in das Patch migrierten Vimentin-positiven Zellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Im subkutanen murinen Fettgewebe (f) zeigte sich ein besonders starkes Signal für Vimentin. Maßstab = 100 µm.

E: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches der Bgn⁻⁰-Kontrolle-Gruppe in 50-facher Vergrößerung. Am rechten Rand ist Nahtmaterial angeschnitten (blau). Maßstab = 500 µm. **E'**: Negativkontrolle zu E.

(WT = Wildtyp, Bgn⁻⁰=Biglykan-defiziente Mäuse, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin)

Zur Quantifizierung der Besiedlung der Patches mit Vimentin-positiven Zellen wurde die AF des mit DAB-markierten Anteils an der Gesamtfläche der Patches gemessen. Es ergaben sich zwischen den vier Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14).

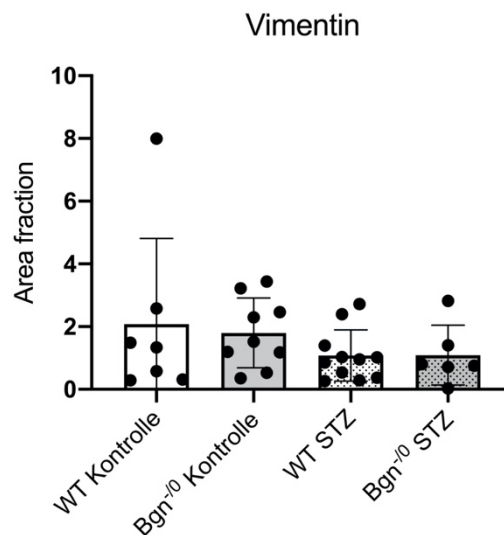


Abb. 14: Quantitative Auswertung der Vimentin-DAB-Färbung

Vergleich der *Area fraction* der Vimentin-positiven Zellen in den vier Versuchsgruppen. Zwischen den verschiedenen Gruppen ergaben sich in der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede. $p=0,4487$. WT = Wildtyp, Bgn⁻⁰=Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin

3.2.5 Migration von Endothelzellen und Angiogenese

Zum Nachweis von Gefäßneubildung in den Proben wurde eine DAB-Färbung mit einem Antikörper gegen Von-Willebrand-Faktor (vWF) durchgeführt (Abb. 15). vWF kommt in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen vor und zeigt sich bei immunhistochemischer Färbung mit DAB als feinkörniger brauner Niederschlag.

In den Patches (Abb. 15 A) sowie der Fremdkörperkapsel (Abb. 15 A, B) konnten randständig vereinzelt kleinste Ansammlungen von vWF in insgesamt sechs von 34 Proben detektiert werden, die gleichmäßig über alle Gruppen verteilt waren.

Die glutaraldehydfixierten bovinen Gefäße im Inneren der Patches zeigten sich mittels Movat-Pentachrom-Färbung als rundliche rote Strukturen (Abb. 15 C), jedoch ließ sich vWF immunhistochemisch in diesen Strukturen nicht nachweisen.

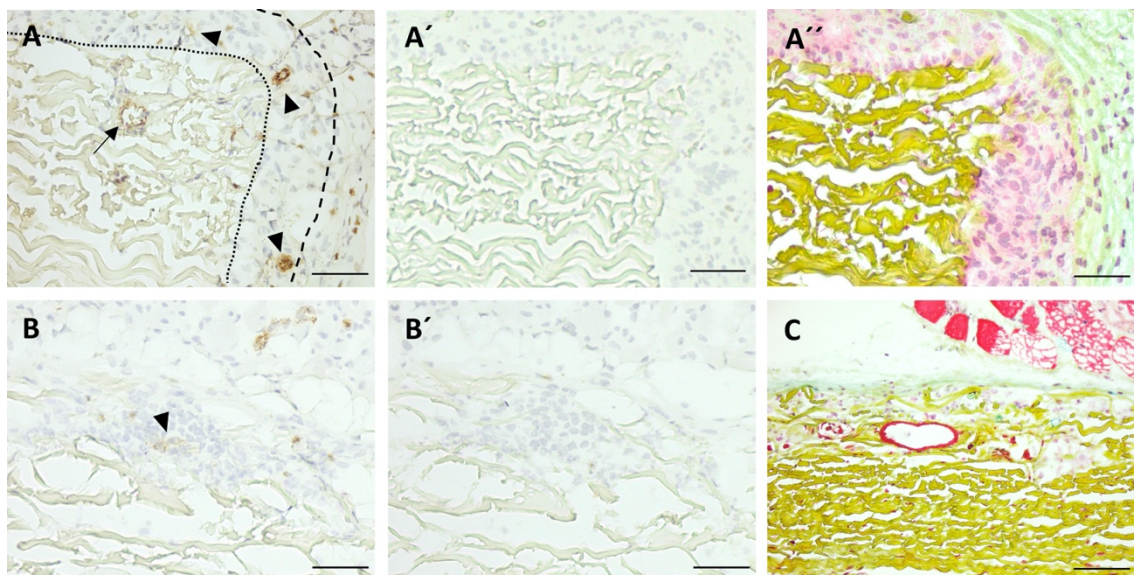


Abb. 15: Nachweis von Endothelzellen mittels DAB-Färbung auf von-Willebrand-Faktor (vWF)
A: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches der WT-Kontrollgruppe nach immunhistochemischer DAB-Färbung auf vWF in 400-facher Vergrößerung. Es zeigt sich ein brauner Niederschlag als Hinweis auf Endothelzellen im Patch (Pfeil) sowie in der zellreichen Fremdkörperkapsel (Pfeilspitzen). Gepunktete Linie entspricht der Grenze des Patches, die gestrichelte Linie entspricht der Grenze der zellreichen Fremdkörperkapselschicht. Maßstab = 50 μm . **A'**: Negativkontrolle zu A. Maßstab = 50 μm . **A''**: Lichtmikroskopische Aufnahme des gleichen Patches wie A und A' in Movat-Pentachrom-Färbung in 400-facher Vergrößerung. Maßstab = 50 μm .
B: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches der WT-STZ-Gruppe nach immunhistochemischer DAB-Färbung auf vWF in 400-facher Vergrößerung. Maßstab = 50 μm . **B'**: Negativkontrolle zu B. Maßstab = 50 μm .
C: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches in Movat-Pentachrom-Färbung in 200-facher Vergrößerung. Die runde Struktur entspricht einem glutaraldehydfixierten bovinen Blutgefäß. Immunhistochemisch lässt sich in diesem kein Signal für vWF nachweisen. Maßstab = 100 μm .
(WT = Wildtyp, Bgn⁻⁰=Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, vWF = von-Willebrand-Faktor)

3.3 Umbau der EZM

Neben zellulären Strukturen wurden mittels DAB-Färbungen auch Umbauprozesse der EZM untersucht. Dabei erfolgten immunhistochemische DAB-Färbungen gegen Kollagen Typ I, Elastin, Biglykan und Decorin. Ein Vergleich von Übersichtsaufnahmen der vier Färbungen für eine Probe der hyperglykämischen Bgn⁻⁰-Gruppe ist in Abbildung 16 dargestellt.

Dabei zeigte sich für alle untersuchten Komponenten ein Signal im Bereich der Kapsel um die Patches herum sowie eine von außen beginnende Anreicherung im Bioprothesenmaterial. Für Elastin wurde eine diffuse Verteilung über das ganze Patch sowie ein vermehrtes Signal in den verkalkten Bereichen nachgewiesen (vgl. Abb. 16 B und Abb. 20 A, B). In den Bgn⁻⁰-Gruppen fehlte das Signal für Biglykan als Zeichen des suffizienten Knockouts (Abb. 16 C). Die glutaraldehydfixierten bovinen Kollagenstränge wiesen kein positives Signal für Kollagen Typ I auf (Abb. 16 A).

3 Ergebnisse

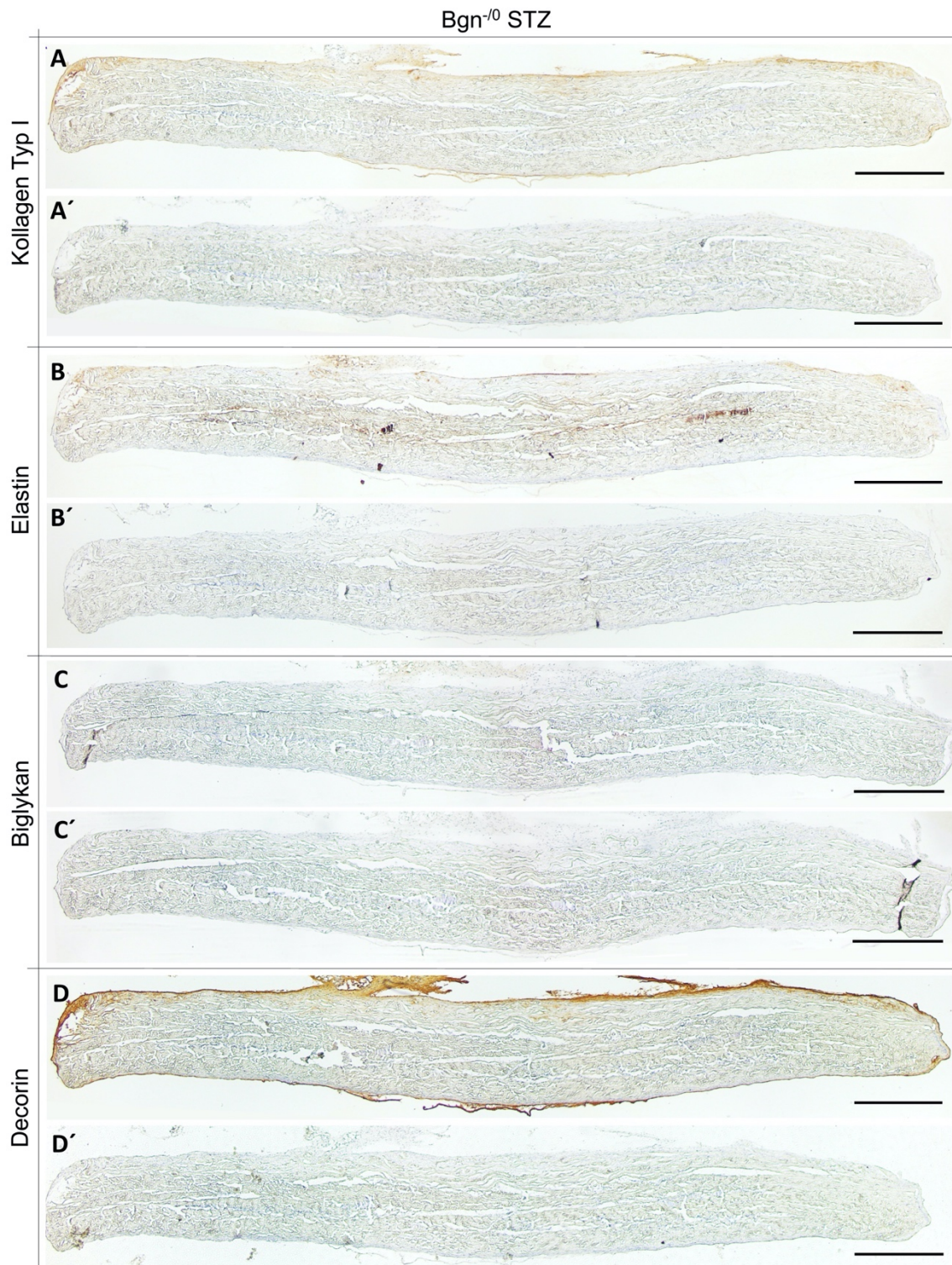


Abb. 16: Nachweis von Kollagen Typ I, Elastin, Biglykan und Decorin mittels DAB-Färbung

A bis D: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines Patches der Bgn⁻⁰-STZ- Gruppe nach immunohistochemischer DAB-Färbung gegen Kollagen Typ I (A), Elastin (B), Biglykan (C) und Decorin (D) in 50-facher Vergrößerung. Es zeigt sich vor allem randständig ein brauner Niederschlag als Nachweis der untersuchten Komponenten. In C kein Signal aufgrund des Genotyps Bgn⁻⁰. Maßstab = 500 μm. **A' bis D':** Negativkontrollen zu A bis D. Maßstab = 500 μm.

(Bgn⁻⁰=Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin)

3 Ergebnisse

Die Färbungen wurden zudem in höherer Vergrößerung ausgewertet. Dabei zeigten sich einige Unterschiede in der Struktur der Signale: während die Proteglykane Biglykan und Decorin ein flächiges Signal bildeten (Abb. 17 C, D), kamen Kollagen Typ I und Elastin als faserige Strukturen zur Darstellung. Dabei bildete Kollagen Typ I ein diffuses Muster mit Ausrichtung der Fasern in alle Richtungen (Abb. 17 A). Für Elastin hingegen ließ sich randständig oftmals eine parallele Organisation der Fasern im Sinne einer Ausrichtung orthogonal zur Anordnung der bovinen glutaraldehydfixierten Kollagenstränge erkennen (Abb. 17 B).

Für alle dargestellten EZM-Komponenten bestand eine räumliche Assoziation zu den blau gefärbten Zellkernen der murinen eingewanderten Zellen.

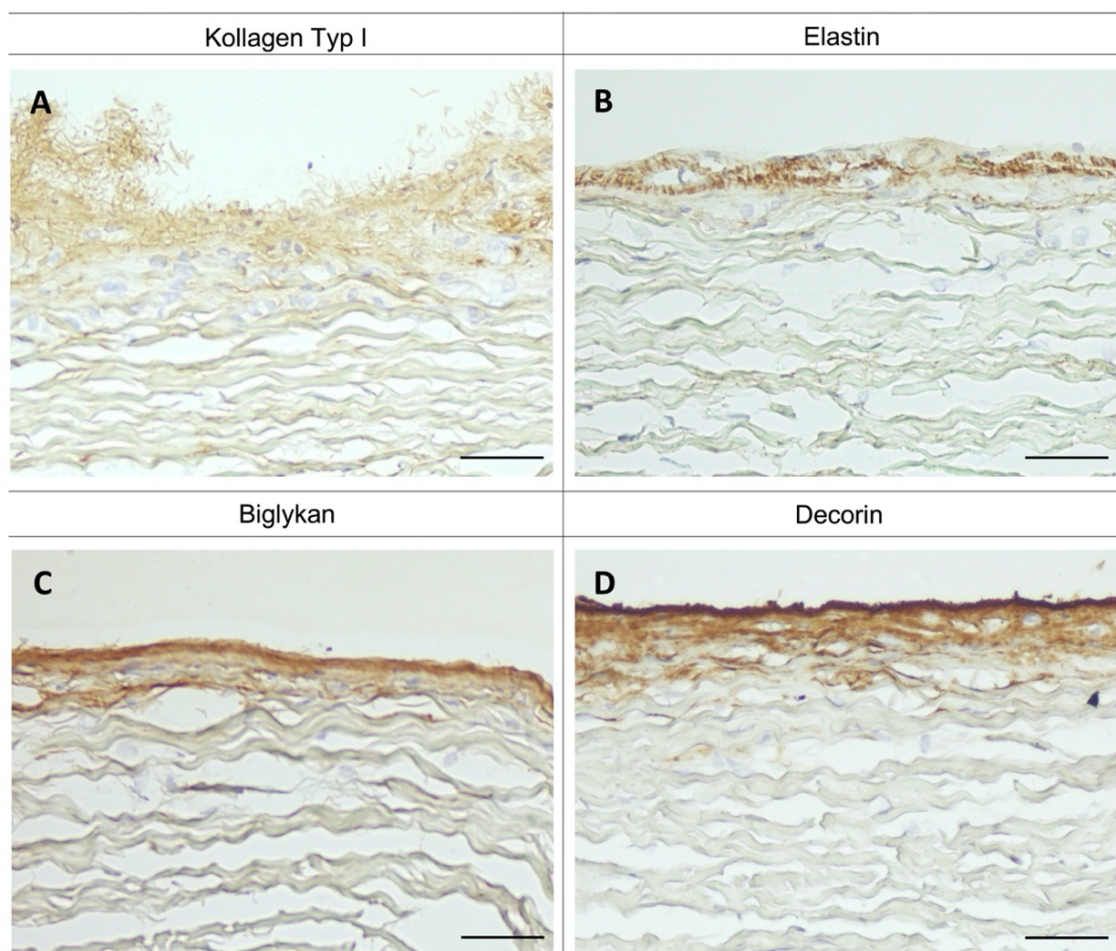


Abb. 17: Struktur von Kollagen Typ I, Elastin, Biglykan und Decorin in DAB-Färbung

A bis D: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines Patches der WT-STZ-Gruppe nach immunhistochemischer DAB-Färbung gegen Kollagen Typ I (A), Elastin (B), Biglykan (C) und Decorin (D) in 400-facher Vergrößerung. Es zeigt sich ein faserartig organisiertes Signal für Kollagen und Elastin. Dabei scheinen die Elastin-Fasern parallel ausgerichtet. Für Biglykan und Decorin liegt ein flächiges Signal vor. Maßstab = 50 µm.

(WT = Wildtyp, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin)

3 Ergebnisse

Weiterhin fiel bei Betrachtung der Proben der WT-Gruppen in höherer Vergrößerung auf, dass sich die Lokalisation der Signale für Kollagen Typ I, Biglykan und Decorin stets stark ähnelte (Abb. 18).

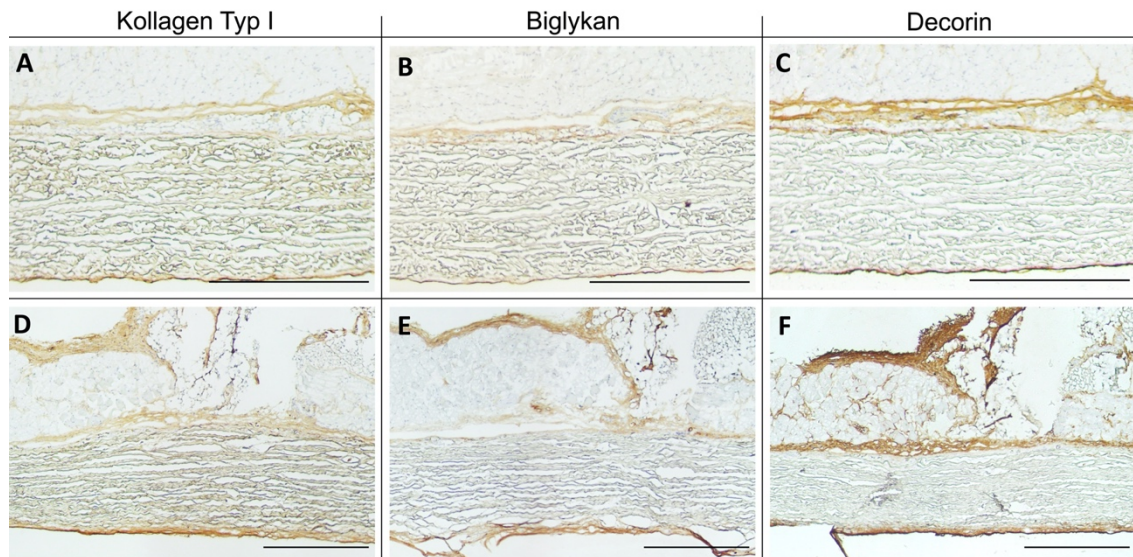


Abb. 18: Räumliche Assoziation von Kollagen Typ I, Biglykan und Decorin

Lichtmikroskopische Detailaufnahmen eines Patches der WT-STZ-Gruppe nach immunhistochemischer DAB-Färbung gegen Kollagen Typ I (A, D), Biglykan (B, E) und Decorin (C, F) in 100-facher Vergrößerung. A bis C sowie D bis F stellen jeweils den gleichen Abschnitt der Probe dar. Es zeigt sich eine räumliche Assoziation von Kollagen Typ I, Biglykan und Decorin. Maßstab = 500 μ m. (WT = Wildtyp, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin)

Neben der deskriptiven Analyse erfolgte zum Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen untereinander eine Quantifizierung der Signale mittels Bestimmung der AF (Abb. 19).

Dabei ergaben sich für die untersuchten Moleküle zwischen den vier Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Für Kollagen Typ I schien im isolierten Vergleich der WT-Gruppen unter Hyperglykämie ein tendenziell erhöhtes Signal für Kollagen Typ I vorzuliegen, wenngleich die einzelnen Werte eine starke Streuung aufwiesen und die statistische Untersuchung eine Signifikanz knapp verfehlte ($p=0,0556$, Abb. 19 C).

Für Decorin zeigte sich im isolierten Vergleich der normoglykämien Tiere eine signifikant erhöhte Akkumulation von Decorin in den Bgn⁻⁰-Tieren im Vergleich zur WT-Gruppe ($p=0,0311$, Abb. 19 F).

3 Ergebnisse

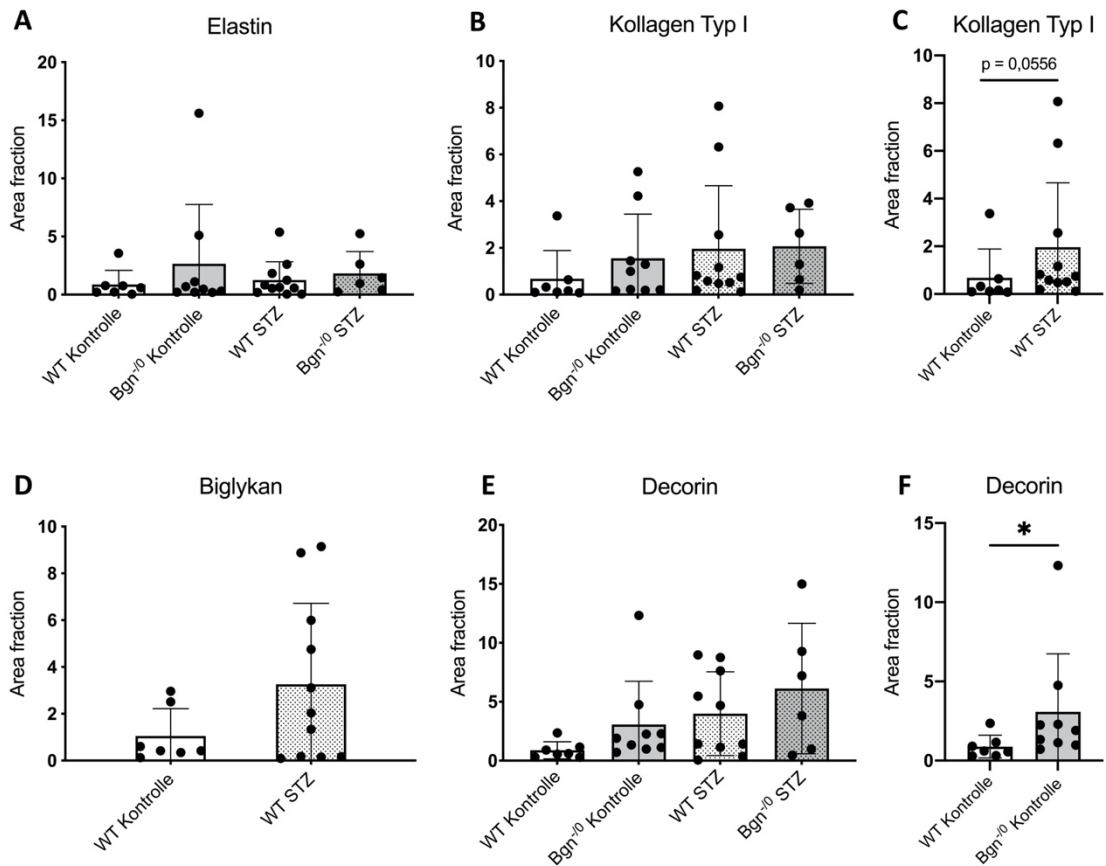


Abb. 19: Quantitative Auswertung der DAB-Färbungen von EZM-Molekülen

Dargestellt ist die *Area fraction* des von DAB-markierten Bereiches bei Färbung mit Primärantikörper gegen Elastin (A), Kollagen Typ I (B, C), Biglykan (D) und Decorin (E, F) in Bezug auf die Gesamtfläche des Patches.

A, B, D, E: Beim Vergleich aller Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. A: $p=0,6350$. B: $p=0,1110$. D: $p=0,4252$. E: $p=0,0933$.

C: Für Kollagen Typ I zeigt sich im direkten Vergleich der WT-Gruppen tendenziell ein erhöhtes Signal für Kollagen in der STZ-Gruppe. $p=0,0556$.

F: Für Decorin zeigt sich im direkten Vergleich der Kontrollgruppen eine signifikant höhere Einlagerung bei den $Bgn^{-/0}$ -Mäusen im Vergleich zur WT-Gruppe. $p=0,0311$.

(WT = Wildtyp, $Bgn^{-/0}$ =Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, EZM = extrazelluläre Matrix, * = $p<0,05$)

3.4 Mineralisierung und Kalzifizierung

Zum Nachweis von Mineralisierungs- und Kalzifizierungsvorgängen in den Patches wurden die Proben nach Von-Kossa gefärbt (Abb. 20). Phosphatablagerungen als Hinweis auf Kalkablagerungen im Gewebe zeigen sich in der Von-Kossa-Färbung durch einen schwarzbraunen Niederschlag mit rostbrauner Umgebungsreaktion. Als Positivkontrolle dienten Schnitte einer stark verkalkten Rattenaorta (Abb. 20 G).

Die bovinen Kollagenstränge der Patches stellten sich in der Von-Kossa-Färbung blassrosa dar, während Zellkerne dunkelrot bis lila zur Darstellung kamen (Abb. 20 A, E). In einigen Proben ließen sich flächige schwarzbraune Ablagerungen nachweisen, die bereits makroskopisch bei Betrachtung des Objektträgers sichtbar waren (Abb. 20 A). In anderen Proben fanden sich keine oder kleine punktförmige Ablagerungen, die lediglich mikroskopisch nachweisbar waren. Die Signale zeigten sich in den Perikardpatches selbst (Abb. 20 A) sowie in der umgebenden Fremdkörperkapsel (Abb. 20 E). Dabei lagen die kleineren Ablagerungen meist randständig an den bovinen Kollagensträngen der Patches.

Zur weiteren Differenzierung der Mineralisierung erfolgte eine Alizarin-Rot-Färbung, die Kalziumeinlagerungen im Gewebe mit einem roten Niederschlag nachweist. Auch hier wurde als Positivkontrolle ein Schnitt einer stark verkalkten Rattenaorta verwendet (Abb. 20 H).

In dieser Färbung stellten sich die Kollagenstränge der Patches sowie das umgebende Bindegewebe gelb dar (Abb. 20 B, F). Zellkerne kamen aufgrund der fehlenden Kernfärbung nicht zur Darstellung. Größere Kalziumablagerungen im Sinne eines roten Niederschlags zeigten sich an den zu den Phosphatablagerungen der Von-Kossa-Färbung äquivalenten Stellen (Abb. 20 B, F). Kleinere Ablagerungen zeigten sich über alle Gewebe verteilt. Insgesamt ergab sich in der Alizarin-Rot-Färbung eine hohe unspezifische Hintergrundfärbung, sodass auf eine quantitative Auswertung aufgrund der fehlenden Differenzierbarkeit von Signal und Rückständen der Färbelösung verzichtet wurde.

Die in der Von-Kossa-Färbung und Alizarin-Rot-Färbung detektierten Kalkschollen waren auch in den histologischen Übersichtsfärbungen sichtbar. In der Movat-Pentachrom-Färbung stellten sich die mineralisierten Schollen türkisblau dar (Abb. 20 C), in der HE-Färbung waren sie als lilafarbene körnige Ablagerungen sichtbar (Abb. 20 D).

3 Ergebnisse

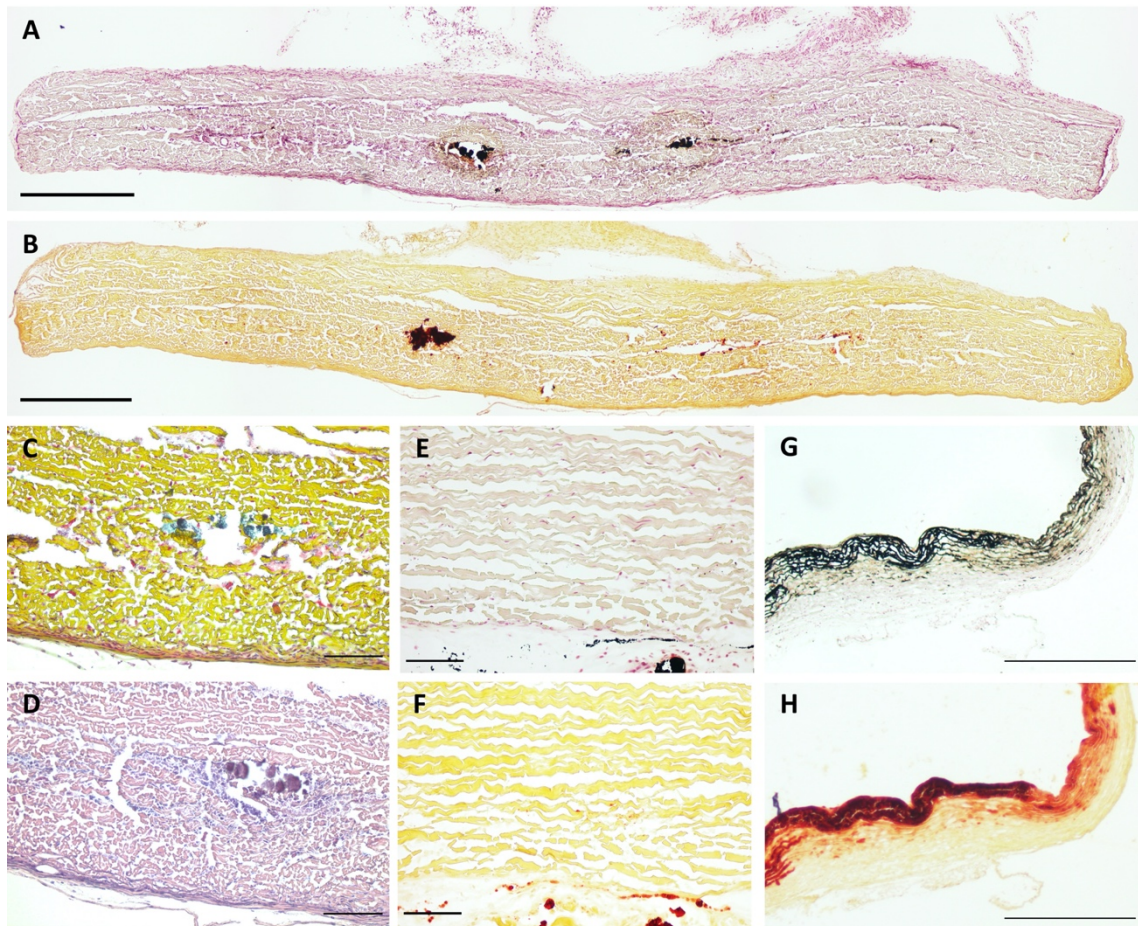


Abb. 20: Nachweis von Kalzifizierung mittels Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbung

A: Lichtmikroskopische Aufnahme eines nach Von-Kossa gefärbten Patches aus der Bgn⁻⁰-STZ-Gruppe in 50-facher Vergrößerung. Der schwarzbraune Niederschlag entspricht den Phosphatablagerungen. Maßstab = 500 µm.

B: Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit Alizarin-Rot gefärbten Patches aus der Bgn⁻⁰-STZ-Gruppe in 50-facher Vergrößerung. An den zu A äquivalenten Stellen Detektion von Kalzium in Form des roten Niederschlags. Maßstab = 500 µm

C: Movat-Pentachrom-Färbung der gleichen Probe wie A und B in 200-facher Vergrößerung. Die mineralisierte Ablagerung stellt sich türkisblau dar. Maßstab = 100 µm.

D: HE-Färbung eines Schnittes aus der gleichen Probe wie A bis C in 200-facher Vergrößerung. Die mineralisierte Ablagerung stellt sich lila dar. Maßstab = 100 µm.

E: Lichtmikroskopische Aufnahme eines anderen nach Von-Kossa gefärbten Patches aus der Bgn⁻⁰-STZ-Gruppe in 200-facher Vergrößerung. Maßstab = 100 µm.

F: Lichtmikroskopische Aufnahme eines anderen mit Alizarin gefärbten Patches aus der Bgn⁻⁰-STZ-Gruppe in 50-facher Vergrößerung. An den zu E äquivalenten Stellen Detektion von Kalzium in Form des roten Niederschlags. Maßstab = 100 µm.

G: Positivkontrolle: Lichtmikroskopische Aufnahme einer nach Von-Kossa gefärbten stark verkalkten Rattenaorta in 50-facher Vergrößerung. Schwarze Ablagerungen als Nachweis von Kalzifizierung. Maßstab = 500 µm.

H: Positivkontrolle: Lichtmikroskopische Aufnahme einer mit Alizarin-Rot gefärbten stark verkalkten Rattenaorta in 50-facher Vergrößerung. Rote Ablagerung als Nachweis von Kalzifizierung. Maßstab = 500 µm.

(WT = Wildtyp, Bgn⁻⁰=Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, HE = Hämatoxylin-Eosin)

3 Ergebnisse

Die quantitative Auswertung der Von-Kossa-Färbung erfolgte unter Verwendung eines fünfstufigen Scores von 0 (keine Phosphatablagerungen) bis 4 (bereits makroskopisch sichtbare Phosphatablagerungen) (Abb. 21). Beispielbilder für die den Veränderungen zugeordneten Zahlenwerte sind in Abbildung 21 A bis D dargestellt. Im Vergleich der Versuchsgruppen zeigte sich zwischen den $Bgn^{-/0}$ -Gruppen eine signifikant erhöhte Phosphateinlagerung in den Patches der mit STZ behandelten Tiere im Vergleich zu den normoglykämischen Tieren (Abb. 21 E, $p=0,0127$).

Der Vergleich der WT-Gruppen verfehlte mit $p=0,0503$ knapp die Signifikanz. Ein deutlicher Trend zu einer vermehrten Phosphateinlagerung in den Proben unter Hyperglykämie im Vergleich zur normoglykämischen Gruppe zeichnete sich aber auch hier ab.

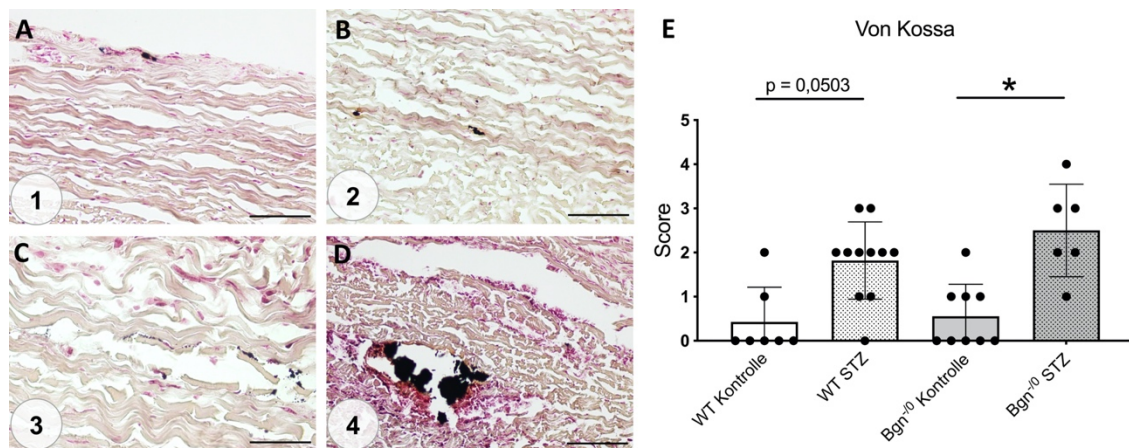


Abb. 21: Quantitative Auswertung der Von-Kossa- -Färbung

A bis D: Beispielbilder zum in E verwendeten Score. A = 1, B = 2, C = 3, D = 4. Lichtmikroskopische Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung. Maßstab = 100 μ m.

E: Auswertung der Von-Kossa-Färbung mittels eines fünfstufigen Scores von null bis vier. $p_{\text{gesamt}}=0,0009$. Bei den $Bgn^{-/0}$ -Mäusen zeigt sich eine signifikant höhere Einlagerung von Phosphat in die Patches der mit STZ behandelten Versuchstiere in Relation zu den Proben der Kontrollgruppe ($p=0,0127$). Unter den WT-Gruppen zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Trend zu einer höheren Einlagerung von Phosphat in die Patches der mit STZ-behandelten Tieren verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe ($p=0,0503$).

(WT = Wildtyp, $Bgn^{-/0}$ =Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, HE = Hämatoxylin-Eosin, * = $p<0,05$)

3.5 Untersuchung der nativen murinen Aortenklappen

Ergänzend zu den Untersuchungen der Patches aus dem ektopen Degenerationsmodell erfolgte die histologische und immunhistologische Untersuchung der nativen Aortenklappen der Versuchstiere.

3.5.1 Histologische Struktur der Aortenklappen

Als Übersichtsfärbung für die Untersuchung der Aortenklappen wurden die Proben mittels HE-Färbung sowie Movat-Pentachrom-Färbung gefärbt (Abb. 22). In der HE-Färbung stellten sich die Aortenklappen als ringförmige Struktur mit Anschnitten der drei Aortenklappentaschen dar (Abb. 22 A, B). Der äußere Ring der Aortenklappe bestand dabei aus strangförmig angeordneten eosinophilen, blass rosanen glatten Muskelzellen mit spindelförmigen basophilen, tief blauen Zellkernen. An den Verbindungsstellen zwischen Aortenring und den einzelnen Taschen der Aortenklappen war die Struktur durch bindegewebige Anteile mit runden basophilen Zellkernen aufgelockert. Je nach Schnittrichtung und -ebene waren die drei Taschen der Klappen im Lumen des Aortenringes vollständig oder nur teilweise erkennbar. Bikuspidale Aortenklappen kamen in den 16 untersuchten Herzen nicht vor. Die Taschen waren an der aortalen sowie der ventrikulären Seite von einem glatt begrenzten Endothel ausgekleidet (Abb. 22 C, F). Zur Mitte der Tasche hin zeigte sich eine zunehmende Dicke der einzelnen Tasche. Hier war zum Teil auch eine Dreischichtung aus aortaler Fibrosa, aufgelockerter Spongiosa und Ventrikularis erkennbar (Abb. 22 C). Neben eosinophilen rosa bis roten zytoplasmatischen oder faserigen Strukturen und basophilen Zellkernen waren in den Taschenklappen in der HE-Färbung schwarze Pigmente zu erkennen. Diese traten bei 14 der 16 untersuchten Proben auf und lagen zumeist an der ventrikulären Seite der Klappentaschen. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ließen sich nicht ausmachen.

Zur Differenzierung der verschiedenen Bestandteile der EZM erfolgte eine Movat-Pentachrom-Färbung, die exemplarisch in Abbildung 22 D bis F dargestellt ist. Darin zeigte sich der Aortenring als Mischbild aus einem gelben und somit hauptsächlich kollagenhaltigen Halteapparat, der in einigen Bereichen neben den deutlich abzugrenzenden gelben Kollagensträngen durch rot-lila gefärbte Muskelzellen unterbrochen war (Abb. 22 F). Dieses Muster zeigte sich auch in der Wand der angeschnittenen Koronararterien (Abb. 22 E). An der zum Lumen des Aortenringes liegenden Seite ließen sich zudem grün gefärbte Proteoglykane abbilden. Die einzelnen Taschen der Aortenklappen stellten sich neben den dicht lila gefärbten Zellkernen aufgrund der hohen Dichte an Proteoglykanen ebenfalls grün bis blau dar. Vereinzelt

3 Ergebnisse

fanden sich auch hier randständig gelbe Kollagenstränge. Das die Klappen umgebende Myokard kam in der Movat-Pentachrom-Färbung tief rot zur Darstellung.

Mittels deskriptiver histologischer Auswertung ließen sich in der HE-Färbung sowie in der Movat-Pentachrom-Färbung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine Unterschiede ausmachen.

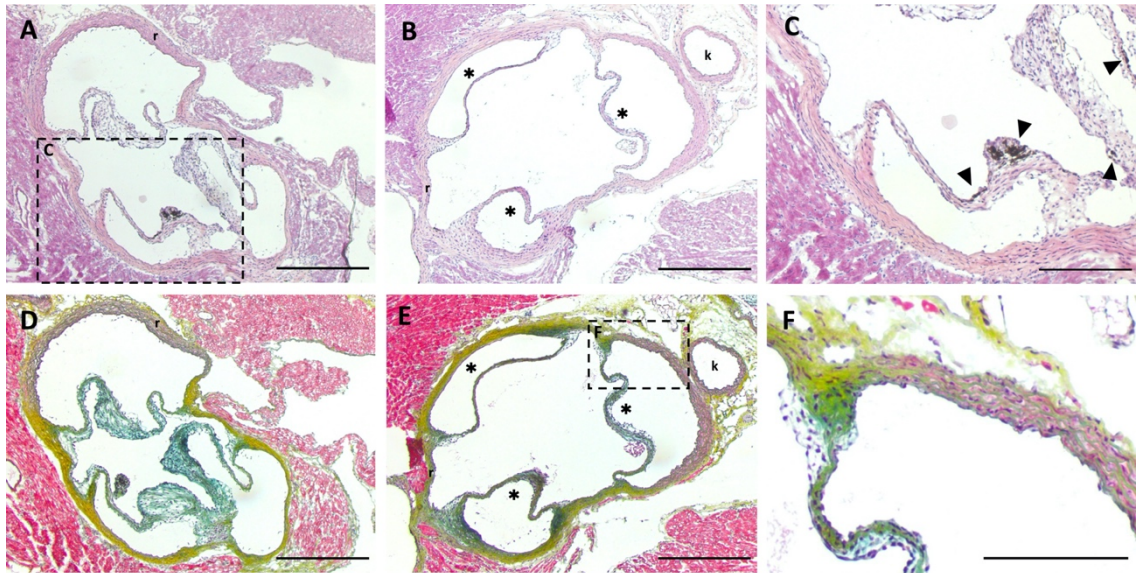


Abb. 22: Färbung der Aortenklappen mittels HE-Färbung und Movat-Pentachrom-Färbung

A: Lichtmikroskopische Aufnahme einer HE-gefärbten Aortenklappe der WT-STZ-Versuchsgruppe in 50-facher Vergrößerung. Zu erkennen sind die drei Taschen der Aortenklappe sowie das umgebende Myokard. r = Aortenring. Maßstab = 400 μ m

B: Lichtmikroskopische Aufnahme einer HE-gefärbten Aortenklappe der WT-Kontrolle-Versuchsgruppe in 50-facher Vergrößerung. Die drei Taschen der Klappe sind mit * markiert. Neben dem Myokard ist zudem eine der Koronararterien angeschnitten (k). r = Aortenring. Maßstab = 400 μ m.

C: Vergrößerter Ausschnitt aus A. Mit den Pfeilspitzen markiert sind die schwarz pigmentierten Bereiche der Aortenklappentaschen. Maßstab = 200 μ m.

D: Lichtmikroskopische Aufnahme einer nach Movat-Pentachrom-gefärbten Aortenklappe der WT-Kontrolle-Versuchsgruppe in 50-facher Vergrößerung. r = Aortenring. Zu erkennen sind die drei Taschen der Aortenklappe sowie das umgebende Myokard. Maßstab = 400 μ m.

E: Lichtmikroskopische Aufnahme einer nach Movat-Pentachrom-gefärbten Aortenklappe der WT-STZ-Versuchsgruppe in 50-facher Vergrößerung. r = Aortenring. Zu erkennen sind die drei Taschen der Aortenklappe sowie das umgebende Myokard. Maßstab = 400 μ m

F: Vergrößerter Ausschnitt aus E. Maßstab = 150 μ m.

(WT = Wildtyp, STZ = Streptozotocin, HE = Hämatoxylin-Eosin)

3.5.1 Inflammatorische Vorgänge in den Aortenklappen

Zum Nachweis von inflammatorischen Prozessen erfolgte äquivalent zur Untersuchung der Patches eine immunhistochemische DAB-Färbung mit einem Primärantikörper gegen Mac2. Als Positivkontrolle für die Färbung diente ein Schnitt eines Patches, in dem regelhaft ein Signal für Makrophagen nachweisbar war (Abb. 23 C).

In den Aortenklappen der Versuchstiere konnte über alle vier Versuchsgruppen und alle Proben hinweg weder im Aortenring, noch in den Taschen der Klappen ein Signal für Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 23 A, B). Gelegentlich fand sich im umgebenden Gewebe, insbesondere im Bereich des perikardialen Fettgewebes, ein Signal für Makrophagen.

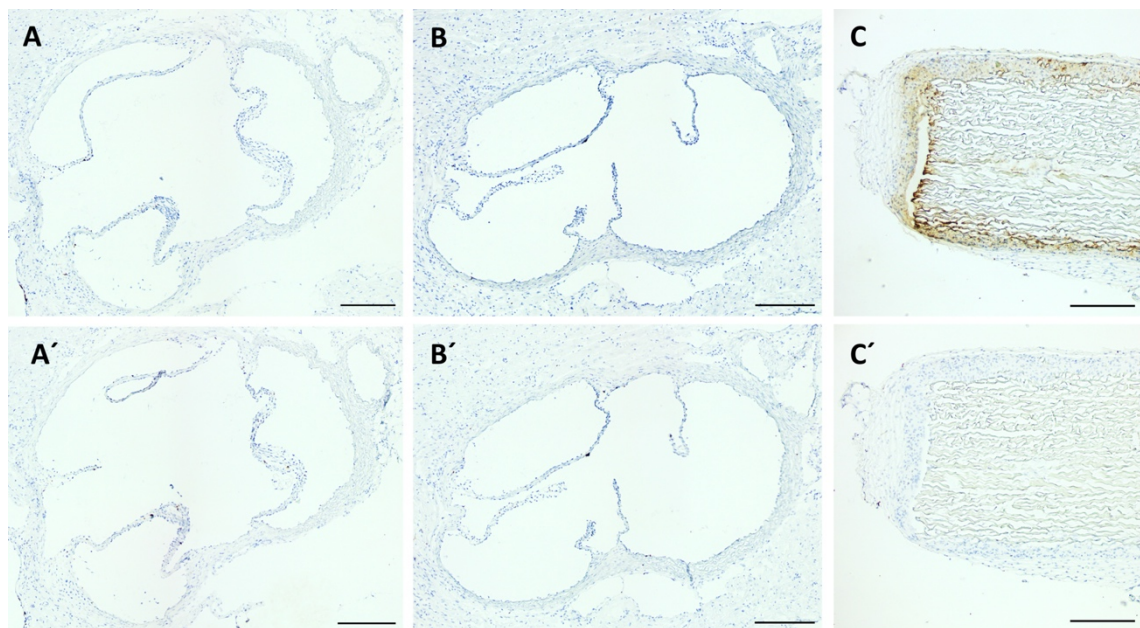


Abb. 23: Nachweis von Makrophagen mittels DAB-Färbung auf Mac2 in den Aortenklappen

A und B: Lichtmikroskopische Aufnahme einer murinen Aortenklappe der WT-Kontroll-Versuchsgruppe (A) und Bgn^{-0} -STZ- Gruppe (B) nach immunhistochemischer DAB-Färbung auf Mac2 in 50-facher Vergrößerung. Es kommt kein Signal zur Darstellung. Maßstab = 200 μ m. **A'** und **B'**: Negativkontrollen zu A und B.

C: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Patches nach immunhistochemischer DAB-Färbung auf Mac2 in 50-facher Vergrößerung. Mac2-positive Zellen stellen sich durch einen braun-schwarzen Niederschlag dar. Positivkontrolle. Maßstab = 200 μ m. **C'**: Negativkontrolle zu C.

(WT = Wildtyp, Bgn^{-0} =Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin)

3.5.3 Immunfluoreszenzfärbung gegen α SMA und Vimentin

Die Verteilung von α SMA und Vimentin innerhalb der Aortenklappen wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung untersucht (Abb. 24). Eine Untersuchung mittels DAB-Färbung wie bei der Untersuchung der Patches war aufgrund der schwarzen Pigmente in den Aortenklappen nicht sinnvoll.

In Abbildung 24 sind exemplarisch Aufnahmen einer Aortenklappe der normoglykämischen WT-Gruppe abgebildet. Das Signal für Vimentin kommt dabei grün zur Darstellung (Abb. 24 D-G und D''-G''), α SMA-positive Zellen kommen unter der Fluoreszenzlampe rot zur Darstellung (Abb. 24 D-G und D'''-G'''). Die blauen Anteile entsprechen der Zellkernfärbung mit DAPI.

α SMA kam in den Aortenklappen der Versuchstiere ausschließlich im Bereich des Aortenringes vor. Die Tasche der Klappen wiesen kein rotes Signal auf. α SMA-haltige Zellen fanden sich im Aortenring insbesondere in den in der Movat-Pentachrom-Färbung lila dargestellten Bereichen (Abb. 24 B, D, G, mit + markiert), die der glatten Muskulatur der Aorta entsprachen. In den hauptsächlich kollagenhaltigen Bereichen des Aortenringes (Abb. 24 B und F, mit * markiert) kam α SMA lediglich in Form einer sehr dünnen Schicht im Bereich des Endothels des Aortenringes vor. Gelegentlich kamen zudem kleine ringförmige Strukturen aus α SMA-positiven Zellen zur Darstellung, die den glatten Muskelzellen der *Vasa vasorum* der Aorta entsprachen (Abb. 24 E, mit Pfeil markiert).

Vimentin-positive Zellen zeigten sich in den Aortenklappen der Versuchstiere im Aortenring sowie in den drei Taschen der Klappe. Besonders ausgeprägt kam das grüne Signal für Vimentin im Bereich der Taschen sowie im Endothel des Aortenringes zur Darstellung.

Insgesamt zeigte sich in nahezu allen Bereichen der Aortenklappe ein positives Signal für Vimentin oder α SMA. Lediglich an den Ansatzpunkten der Klappentaschen am Aortenring fanden sich weder α SMA- noch Vimentin-positive Zellen (Abb. 24 B, D, G, mit Pfeilspitze markiert).

Zwischen den vier Versuchsgruppen ließen sich mittels deskriptiver Auswertung keine Unterschiede eruieren. Eine Quantifizierung der Signale erfolgte nicht, da eine Aufnahme der Aortenklappen *in toto* aufgrund der zu schwachen Signalausprägung bei Betrachtung in 50-facher Vergrößerung nicht möglich war.

3 Ergebnisse

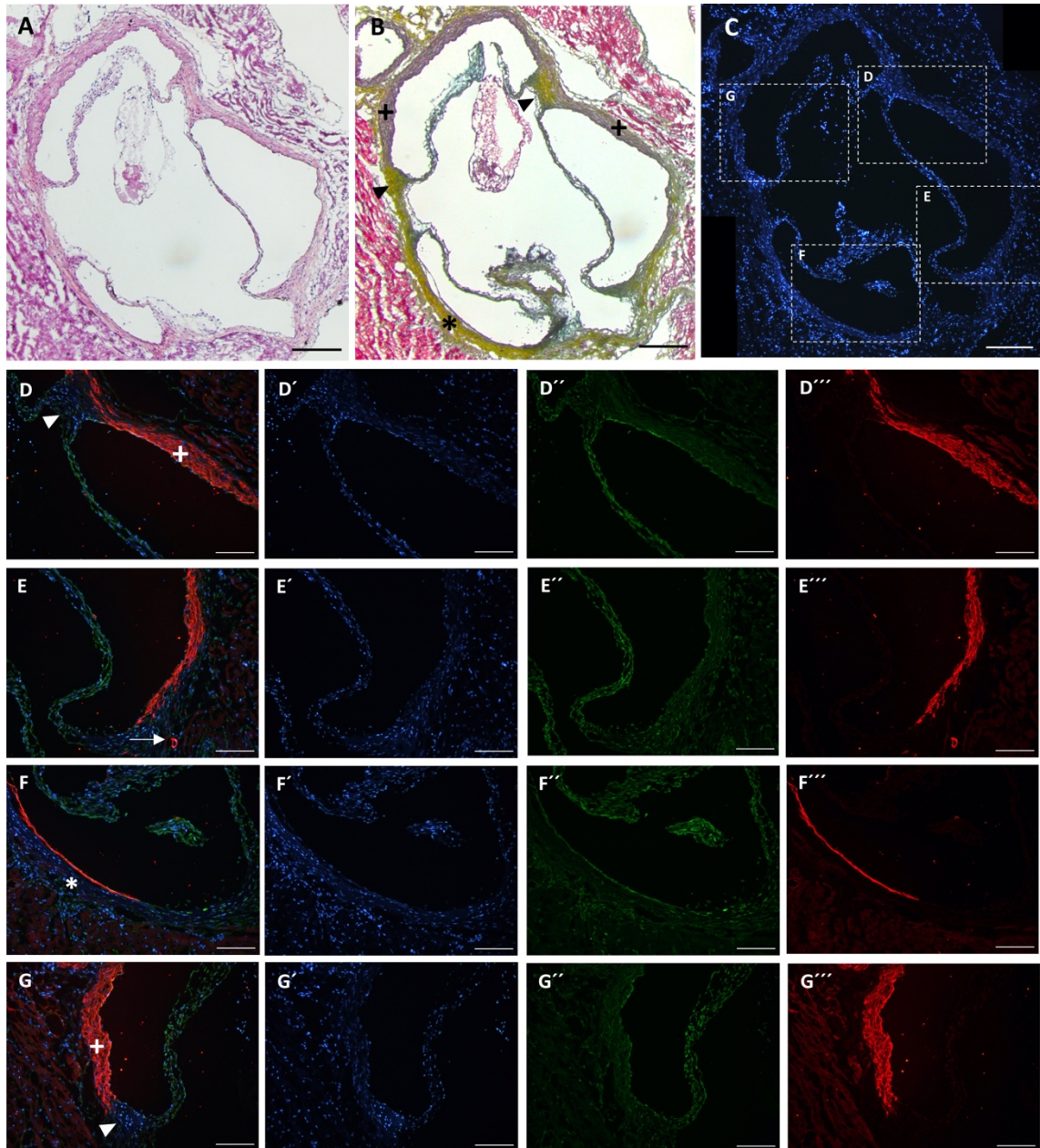


Abb. 24: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen α SMA und Vimentin

A und B: Lichtmikroskopische Aufnahme einer murinen Aortenklappe der WT-Kontroll-Versuchsgruppe in HE-Färbung (A) und Movat-Pentachrom-Färbung (B) in 50-facher Vergrößerung. + = glatte Muskelzellen, * = kollagenhaltige Bereiche, Pfeilspitze = Ansatzstellen der Klappentaschen am Aortenring. Maßstab = 200 μ m.

C: Fluoreszenzmikroskopische Gesamtaufnahme der Aortenklappe aus A und B in der DAPI- Sequenz in 50-facher Vergrößerung. Mit den Rechtecken ist zur besseren Orientierung die Lage der unter D bis G abgebildeten Ausschnitte markiert. Maßstab = 200 μ m

D bis G: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Doppelfärbung gegen α SMA (rot) und Vimentin (grün) mit DAPI-Zellkernfärbung (blau) in 200-facher Vergrößerung. Pfeil = aortale *Vasa vasorum*. Maßstab = 200 μ m.

D,E,F,G: *Overlay*-Aufnahmen aller Komponenten. Maßstab = 200 μ m.

D',E',F',G': DAPI-Zellkernfärbung unter ultraviolettem Licht. Maßstab = 200 μ m.

D'',E'',F'',G'': Vimentin-Färbung, grün, Aufnahme bei $\lambda=488$ nm. Maßstab = 200 μ m.

D''',E''',F''',G''': α SMA-Färbung, rot, Aufnahme bei $\lambda=546$ nm. Maßstab = 200 μ m.

(WT = Wildtyp, α SMA = Glattmuskelaktin, HE = Hämatoxylin-Eosin, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol)

3.5.4 Umbau der EZM in den Aortenklappen

Zur genaueren Charakterisierung der einzelnen Bestandteile der EZM und zur Evaluation von Umbauprozessen erfolgten äquivalent zu den Untersuchungen der Patches immunhistologische DAB-Färbungen mit Primärantikörpern gegen Kollagen Typ I, Elastin, Decorin und Biglykan. Ein tabellarischer Vergleich ist in Abbildung 25 dargestellt.

Insgesamt zeigte sich dabei für jede der vier Komponenten ein braunes Signal im Bereich des Aortenringes sowie in den Taschen der Aortenklappe. Dabei fiel insbesondere auf, dass sich, ähnlich wie bei den untersuchten Patches, die Lokalisation der Signale für Kollagen Typ I, Biglykan und Decorin in den WT stark ähnelten (Abb. 25 A, E, G bzw. B, F). Zudem zeigte sich die Signalverteilung für Kollagen Typ I passend zu den in der Movat-Pentachrom-Färbung gelb gefärbten Anteilen (vgl. Abb. 25 A und Abb. 22 D). In den Aortenklappen der Bgn⁻⁰-Gruppen fehlte das Signal für Biglykan entsprechend der Biglykandefizienz vollständig (Abb. 25 H). Elastin lag insbesondere in den in der Movat-Pentachrom-Färbung rot-lila-gefärbten Bereichen des Aortenringes vor. Dabei zeigte sich eine deutliche strangförmige Verteilung (Abb. 25 C, D). Auch in den anderen Bereichen des Aortenringes ließ sich randständig ein Signal für Elastin detektieren. Einzig die als Ansatzpunkt für die Klappentaschen dienenden Bereiche waren frei von Elastin.

3 Ergebnisse

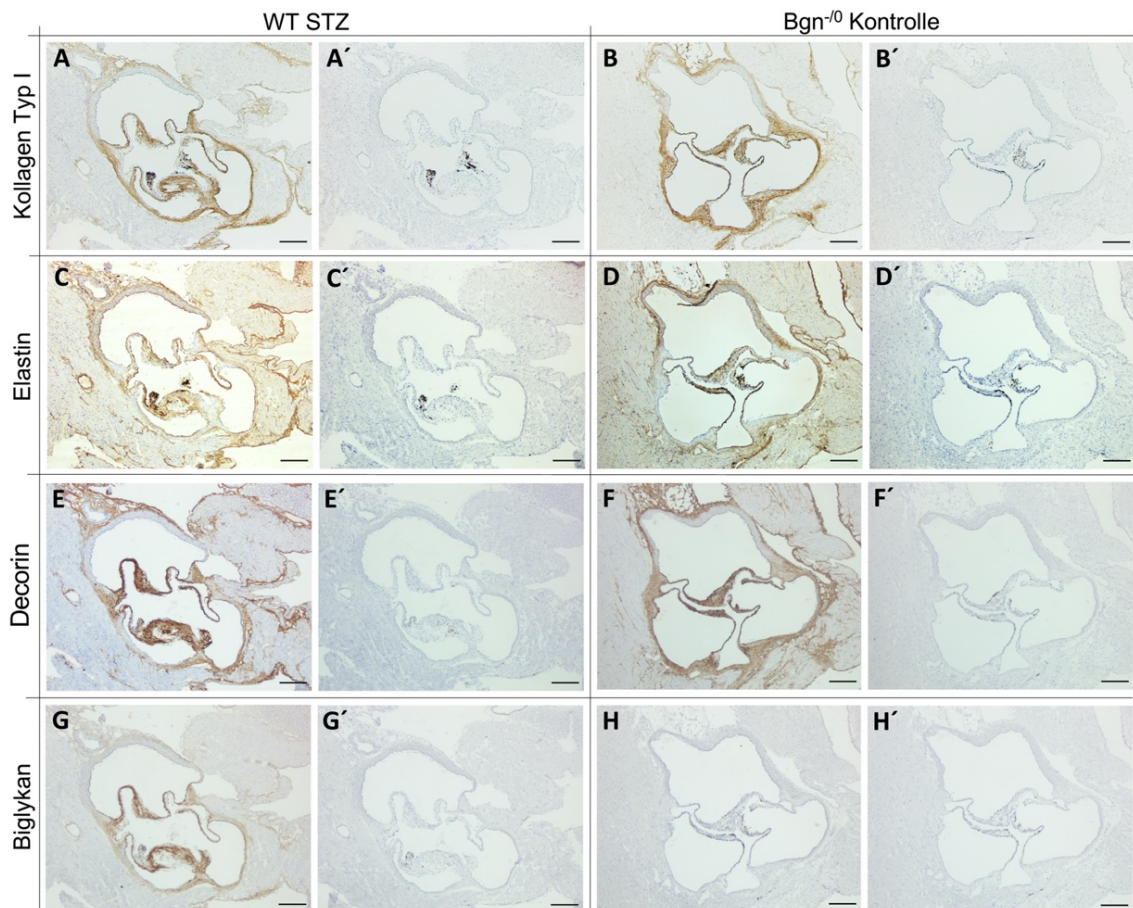


Abb. 25: DAB-Färbungen zum Nachweis von Kollagen Typ I, Elastin, Decorin und Biglykan
Lichtmikroskopische Aufnahmen einer murinen Aortenklappe der WT-STZ-Versuchsgruppe (A, C, E, G) und Bgn⁰-Kontrolle-Gruppe (B, D, F, H) in 50-facher Vergrößerung. Maßstab = 200 µm.
A und **B**: DAB-Färbung mit Primärantikörper gegen Kollagen Typ I. **A'** und **B'**: Negativkontrollen zu A und B.
C und **D**: DAB-Färbung mit Primärantikörper gegen Elastin. **C'** und **D'**: Negativkontrollen zu C und D.
E und **F**: DAB-Färbung mit Primärantikörper gegen Decorin. **E'** und **F'**: Negativkontrollen zu E und F.
G und **H**: DAB-Färbung mit Primärantikörper gegen Biglykan. **G'** und **H'**: Negativkontrollen zu G und H.
(WT = Wildtyp, Bgn⁰=Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin)

Aufgrund der verschiedenen Schnittwinkel zur Klappenebene sowie der schwarzen Pigmente in den einzelnen Taschen der Klappen war eine Quantifizierung der Bestandteile der EZM der Aortenklappen unter Einbeziehung der Aortenklappentaschen nicht möglich. Die Quantifizierung von Kollagen Typ I, Elastin, Decorin und Biglykan in den Aortenklappen erfolgte daher über die Bestimmung der AF des Signals in Bezug zur Gesamtfläche des Aortenrings. Dabei konnten für keine der betrachteten Komponenten der EZM zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen ein signifikanter Unterschied eruiert werden (Abb. 26).

3 Ergebnisse

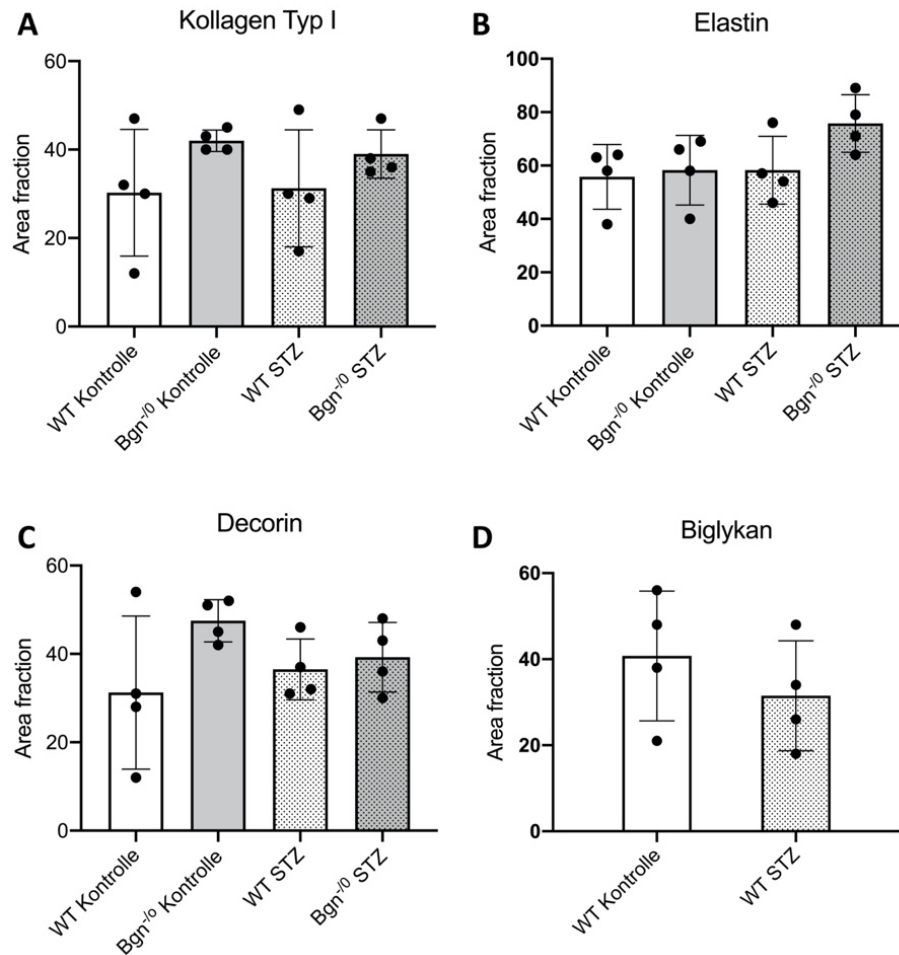


Abb.26: Quantitative Auswertung der DAB-Färbungen gegen Kollagen Typ I, Elastin, Decorin und Biglykan

Dargestellt ist die *Area fraction* des von Kollagen Typ I (A), Elastin (B), Decorin (C) und Biglykan (D) markierten Bereiches in Bezug auf die Gesamtfläche des Aortenrings. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. A: $p=0,3657$. B: $p=0,1107$. C: $p=0,2941$. D: $p=0,4000$.

(WT = Wildtyp, Bgn^{-/-}=Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin)

3.5.5 Kalzifizierung der Aortenklappen

Zur Untersuchung auf Kalkablagerungen wurden die Aortenklappen mittels Alizarin-Rot-Färbung und Von-Kossa-Färbung gefärbt (Abb. 27). Als Positivkontrolle wurde ein Schnitt einer stark verkalkten Rattenaorta verwendet (Abb. 20 G, H). In den 16 untersuchten Aortenklappen ließen sich weder in den Taschen der Aortenklappe selbst, noch im Aortenring Kalkablagerungen nachweisen (Abb. 27 A, B, D, E). Vereinzelt konnten kleine Kalkablagerungen im angeschnittenen Myokard nachgewiesen werden (Abb. 27 C und F).

In der Von-Kossa-Färbung sowie in der Alizarin-Rot-Färbung waren die bereits unter 3.6.1 beschriebenen schwarzen Pigmente der Aortenklappentaschen sichtbar, sodass eine Auswertung der Kalzifizierung mittels Von-Kossa-Färbung allein nicht möglich war.

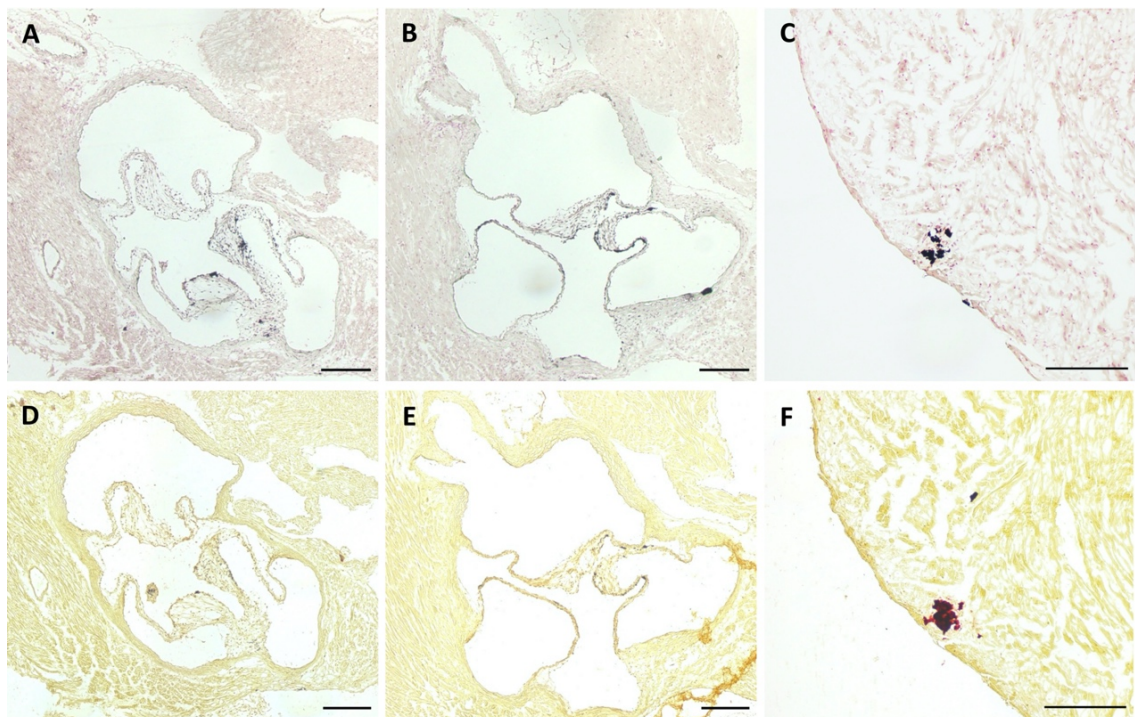


Abb. 27: Nachweis von Kalzifizierungen in den Aortenklappen mittels Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbung

A und B: Lichtmikroskopische Aufnahme einer nach Von-Kossa gefärbten Aortenklappe aus der WT-STZ-Gruppe (A) bzw. der Bgn⁻⁰-Kontrollgruppe (B) in 50-facher Vergrößerung. Kein Nachweis von Kalkablagerungen. Maßstab = 200 µm.

C: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Verkalkung im angeschnittenen Myokard aus der Bgn⁻⁰-STZ-Gruppe in 100-facher Vergrößerung in Von-Kossa-Färbung. Maßstab = 200 µm.

D und E: Lichtmikroskopische Aufnahme einer mit Alizarin-Rot gefärbten Aortenklappe aus der WT-STZ-Gruppe (D) bzw. der Bgn⁻⁰-Kontrollgruppe (E) in 50-facher Vergrößerung. Kein Nachweis von Kalkablagerungen. Maßstab = 200 µm.

F: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Kalkablagerung im angeschnittenen Myokard aus der Bgn⁻⁰-STZ-Gruppe in 100-facher Vergrößerung in Alizarin-Rot-Färbung. Maßstab = 200 µm.

(WT = Wildtyp, Bgn⁻⁰=Biglykan-defiziente Mäuse, STZ = Streptozotocin)

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Degeneration von biologischen Aortenklappenprothesen ist als komplexes Zusammenspiel aus chemischen und mechanischen Veränderungen des Prothesenmaterials sowie inflammatorischen und immunologischen Prozessen unter dem Einfluss patientenbezogener Risikofaktoren und Stoffwechselfvorgänge zu verstehen. Die Haltbarkeit von Bioprothesen konnte in den letzten Jahrzehnten durch verschiedene Modifikationen bereits verlängert werden, ohne dass dabei das Ziel der idealen Bioprothese mit unbegrenzter Haltbarkeit erreicht werden konnte [123, 124]. Unter dem Einfluss von Diabetes mellitus kommt es zu einer Beschleunigung der ablaufenden Prozesse, die in einer verminderten Haltbarkeit der Bioprothese resultiert. Um künftig verbesserte Aortenklappenbioprothesen entwickeln zu können, ist es essentiell, die an der Degeneration beteiligten Mechanismen genau zu verstehen. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit die ablaufenden Mechanismen sowie der Einfluss einer diabetischen Stoffwechsellage und einer Biglykandefizienz auf histologischer Ebene untersucht und nachvollzogen werden.

4.1.1 Probenmorphologie und Zellmigration unter dem Einfluss von Hyperglykämie und Biglykandefizienz

In den Übersichtsfärbungen zeigten die Explantate der hyperglykämien und normoglykämien Versuchstiere beider Genotypen um die Patches herum eine Fremdkörperkapsel, die aus einer zellreichen Schicht innen sowie einer bindegewebigen Schicht außen bestand. Die Kapselbildung ist ein erster Hinweis auf eine immunologische Reaktion des Empfängerorganismus auf das eingebrachte Fremdmaterial. Diese Form der Reaktion des Empfängerorganismus ist bereits seit Etablierung des ektopen Degenerationsmodelles beschrieben [113].

Neben der Ansammlung von Zellen um die Patches herum, war auch die Migration von murinen Zellen in das Innere des Patches zu beobachten. Eine zelluläre Rebesiedlung der Aortenklappenbioprothese gilt insgesamt als Voraussetzung für ihren langfristigen Erhalt. Jede Zelleinwanderung bringt jedoch immer auch das Risiko von prodegenerativen, beispielsweise inflammatorischen, Prozessen mit sich. Zur Quantifizierung der Zellmigration erfolgte in dieser Arbeit die Ermittlung der mittleren relativen Migrationstiefe DAPI-positiver Zellkerne. Hier zeigte sich in der isolierten Betrachtung der Bgn⁻⁰-Gruppen für die hyperglykämien Tiere eine signifikant erhöhte Einwanderungstiefe von DAPI-positiven Zellkernen im Vergleich zur

4 Diskussion

normoglykämischen Versuchsgruppe. In der Literatur wird im Rahmen von hyperglykämischen Bedingungen *in vivo* und *in vitro* insgesamt eine Verringerung des Migrationspotentials verschiedener Zellen beschrieben [125-129], wenngleich Daten zur Migration von Zellen in Aortenklappenbioprothesenmaterial bisher fehlen. Im Vergleich der WT-Gruppen ließ sich bezüglich der relativen Migrationstiefe zwischen der normoglykämischen Gruppe und der hyperglykämischen Gruppe kein Unterschied eruieren, sodass hier möglicherweise ein Einfluss der Biglykandefizienz zu diskutieren ist. Jedoch wird auch Biglykan in der Literatur eher ein promigratorischer Effekt zugeschrieben [130]. Warum in dieser Arbeit ein promigratorischer Effekt für Hyperglykämie unter Biglykandefizienz vorzuliegen scheint, oder ob dieser möglicherweise nur der starken Streuung der einzelnen Werte geschuldet ist, kann anhand der aktuell vorliegenden Daten nicht eruiert werden.

Barth et al. verglichen in vorangegangenen Untersuchungen die relative Migrationstiefe von Zellen im ektopen Degenerationsmodell bei WT-Mäusen und Bgn⁻⁰-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten. Hier zeigte sich nach acht Wochen Implantationsdauer eine signifikant verringerte relative Migrationstiefe in den Explantaten der Bgn⁻⁰-Gruppe, welcher sich nach 16 Wochen verlor [93]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich hingegen zwischen der normoglykämischen WT-Gruppe und der Bgn⁻⁰-Gruppe nach acht Wochen *in vivo* kein signifikanter Unterschied bezüglich der relativen Migrationstiefe. Dabei waren in beiden Untersuchungen sowohl das Alter der Mäuse als auch der Mausstamm identisch. Ein möglicher Erklärungsansatz für den scheinbaren Widerspruch der Ergebnisse könnte sich im implantierten Bioprothesenmaterial finden: Während in der genannten Untersuchung Ethylendiamintetraacetat (EDTA)- und Isopropanol-fixiertes bovines Perikard der Firma Neovasc untersucht wurde, bestand das implantierte Gewebe in der vorliegenden Arbeit aus glutaraldehydfixiertem bovinem Perikard der Firma Edwards Lifescience. Vergleicht man die in dieser Arbeit erhobene relative Migrationstiefe von DAPI-positiven Zellkernen mit den Daten von Barth et al., so fällt auf, dass die relative Migrationstiefe in dieser Arbeit insgesamt deutlich niedriger ausfiel. Denkbar wäre daher, dass die Fixierung des Bioprothesenmaterials in Glutaraldehyd durch seine antigenmaskierende Wirkung [131] zu einer insgesamt verminderten Migration von Zellen führt, sodass der von Barth et al. beobachtete migrationshemmende Effekt der Biglykandefizienz in der vorliegenden Arbeit nicht mehr abgebildet wird.

4.1.2 Migration inflammatorischer Zellen im ektopen Degenerationsmodell

Mittels immunhistochemischer DAB-Färbungen gelang es, einige der migrierten Zellen weiter zu charakterisieren. Dabei konnte ein Teil der migrierten Zellen sowie ein Teil der

4 Diskussion

Zellen der Fremdkörperkapsel mittels DAB-Färbung gegen Mac2 (Galectin-3) als Makrophagen identifiziert werden. Auch Giachelli et al. wiesen im ektopen Degenerationsmodell Makrophagen und Riesenzellen als Bestandteile der Fremdkörperkapsel nach [111, 113]. Im direkten Vergleich der normoglykämischen Gruppen zeigte sich in der quantitativen Auswertung für die biglykandefiziente Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe eine signifikant erhöhte Besiedlung des Patches mit Makrophagen. Es ist bekannt, dass eine inflammatorische Reaktion durch Makrophagen mit der Degeneration der Aortenklappe [20, 57, 132] sowie biologischer Aortenklappenprothesen [56-58, 133, 134] assoziiert ist. In der Literatur wird Biglykan im Zusammenhang mit der DAVD und Prothesendegeneration zumeist ein proinflammatorischer Effekt zugeschrieben [92, 95], sodass die vermehrte Besiedlung mit Makrophagen in der biglykandefizienten Gruppe zunächst irritiert. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte die Annahme sein, dass eine Infiltration mit Makrophagen im Sinne einer inflammatorischen Reaktion insbesondere in den frühen Phasen der Degeneration eine Rolle spielt, während im späteren Verlauf andere Vorgänge im Vordergrund stehen [19]. Ein stadienabhängiger Einfluss der Biglykandefizienz auf die Bioprothesendegeneration wurde in der Literatur bereits beschrieben [93]. Die Tiere der Bgn^{-0} -Gruppe könnten sich also im Vergleich zur WT-Gruppe insgesamt in einem früheren Stadium der Degeneration befunden haben. Dazu passt auch die Tatsache, dass zwischen den diabetischen Gruppen, in denen aufgrund der diabetischen Stoffwechsellage eine beschleunigte Degeneration zu erwarten war, bezüglich der Besiedlung des Patches mit Mac2-positiven Zellen kein Unterschied bestand. Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass wir bezüglich der Mac2-positiven Zellen von Makrophagen ausgingen, Mac2 jedoch keinesfalls für Makrophagen spezifisch ist. Es kommt beispielsweise auch auf aktivierten Fibroblasten vor. In Bezug auf die DAVD ist *in vivo* sowie *in vitro* ein prodegenerativer Effekt von Mac2 auf die Aortenklappe sowie VICs beschrieben [135]. Die Mac2-positiven Zellen in den Patches zeigten sich jedoch in der DAB-Färbung negativ in Bezug auf α SMA, was gegen das Vorliegen von aktivierten Fibroblasten spricht.

4.1.3 Migration von Fibroblasten und myofibroblastische Aktivierung

Neben Makrophagen zeigten sich in den Patches und in der umgebenden Fremdkörperkapsel auch Vimentin-positive Zellen. Vimentin ist ein Intermediärfilament des Zytoskeletts von Fibroblasten, Endothelzellen und Muskelzellen. Da die eingewanderten Zellen weder ein positives Signal für α SMA, noch für vWF aufwiesen, stellten die eingewanderten Zellen am ehesten Fibroblasten dar. Im Vergleich der vier verschiedenen Versuchsgruppen ergaben sich in der quantitativen Auswertung

4 Diskussion

bezüglich der Einwanderung von Vimentin-positiven Zellen keine signifikanten Unterschiede. α SMA-positive Zellen konnten lediglich punktuell im Bereich muriner Gefäße der Fremdkörperkapsel nachgewiesen werden. Hinweise auf eine myofibroblastische Aktivierung der eingewanderten Zellen, wie im Rahmen der Pathophysiologie der DAVD typisch, ergaben sich dementsprechend auf histologischer Ebene nicht. In unserem Modell scheint also zusammenfassend weder die hyperglykämie Stoffwechsellage, noch die Biglykandefizienz einen Einfluss auf die Migration Vimentin- und α SMA-positiver Zellen zu haben.

4.1.3 Migration von Endothelzellen und Angiogenese

Zur Untersuchung von Angiogenese erfolgte eine DAB-Färbung gegen vWF. vWF ist ein Glykoprotein, das in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen vorkommt und die Bindung von Thrombozyten im Falle eines Gefäßschadens vermittelt [136]. vWF wird daher als Marker für Endothelzellen verwendet. In den untersuchten Proben ließ sich mittels DAB-Färbung nur sehr vereinzelt die Migration von Endothelzellen in die radständigen Bereiche der Patches darstellen. Eine relevante Angiogenese, die als kompensatorischer Vorgang für die zunehmende Dicke der Klappentaschen im Rahmen der fortgeschrittenen DAVD beschrieben wird [18, 57], ließ sich auf histologischer Ebene nicht nachweisen.

4.1.4 Migration weiterer Zellen

Die Vielzahl der in die Patches migrierten Zellen lässt vermuten, dass neben den bereits diskutierten Zelltypen in unserem Modell weitere Zelltypen an den abgelaufenen Umbauprozessen und am Erhalt des Bioprothesenmaterials beteiligt waren. Welche Zelltypen dies waren, lässt sich auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit nicht beantworten und müsste durch weitere Versuche untersucht werden. Eine Färbung mit einem Primärantikörper gegen Ki-67 zur Untersuchung von proliferierenden Zellen gelang im Rahmen dieser Arbeit unter Anwendung der DAB-Färbung sowie Immunfluoreszenz nicht. Aufgrund ihrer Beteiligung an der Pathophysiologie der Bioprothesendegeneration wäre in weitergehenden Projekten auch die Untersuchung auf Schaumzellen, B- und T-Lymphozyten interessant.

4.1.5 Umbau der EZM unter dem Einfluss von Hyperglykämie und Biglykandefizienz

Neben zellulären Prozessen kommt es im Verlauf der DAVD sowie der Degeneration von Bioprothesen auch zum Umbau der EZM. Aus diesem Grund erfolgten im Rahmen dieser Arbeit auch immunhistologische Färbungen gegen Kollagen Typ I, Elastin,

4 Diskussion

Biglykan und Decorin. Dabei konnte die Bildung von murinen Kollagenfasern und Elastinfasern sowie von Biglykan und Decorin in der Fremdkörperkapsel sowie auch innerhalb des Bioprothesenmaterials dargestellt werden. Auffällig war dabei eine enge räumliche Assoziation von Kollagen, Biglykan und Decorin, während Elastinfasern häufig an anderer Stelle lokalisiert waren. Es gibt zahlreiche *in vivo*- sowie *in vitro*-Untersuchungen, die zeigen, dass Decorin und Biglykan für die Ausbildung von funktionsfähigen Kollagenfibrillen essentiell sind [84, 86, 137]. Zhang et al. wiesen bei Biglykan-Decorin-Knockout-Mäusen elektronenmikroskopisch irregulär gefaltete und verdickte Kollagenfibrillen nach [138]. Die räumliche Assoziation der drei EZM-Komponenten kann also als Hinweis der Beteiligung von Decorin und Biglykan an der Kollagensynthese gewertet werden.

Neben der deskriptiven Auswertung der EZM-Komponenten erfolgte auch eine quantitative Auswertung über den Vergleich der AF. Darin ergab sich für Kollagen Typ I und Elastin im Vergleich aller Gruppen untereinander kein signifikanter Unterschied. Ebenso ließ der Vergleich der WT-Gruppen keinen Einfluss der Stoffwechsellage auf die Bildung von Biglykan innerhalb der Patches erkennen. Tendenziell schien im direkten Vergleich der WT-Gruppen jedoch eine höhere Einlagerung von Kollagen Typ I in den Patches der hyperglykämischen Gruppen vorzuliegen, wenngleich der Unterschied in der statistischen Untersuchung eine Signifikanz knapp verfehlte ($p=0,0556$). Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass eine diabetische Stoffwechsellage in verschiedenen Organen zu einer vermehrten Einlagerung von Kollagen führt [73, 139-141]. *In vitro* führten Hyperglykämie und Hyperinsulinämie in VIC zu einer erhöhten mRNA-Expression für Kollagen [142]. Es ist also denkbar, dass auch in unserem Modell die diabetische Stoffwechsellage zu einer vermehrten Einlagerung von Kollagen in den Patches geführt hat. Im Kontext der DAVD ist bekannt, dass es im Rahmen der Fibrose zu einer Verdickung der Klappentaschen durch eine vermehrte Einlagerung von Kollagenfasern kommt [22, 143]. Auch für die Degeneration von Aortenklappenbioprothesen sind fibrotische Vorgänge auf histologischer Ebene beschrieben [58]. Die vermehrte Einlagerung von Kollagen in den Patches der diabetischen WT-Tiere könnte also ein Hinweis darauf sein, dass Einlagerung und Umbau von Kollagen an der beschleunigten Degeneration von Aortenklappenbioprothesen im Zusammenhang mit einer hyperglykämischen Stoffwechsellage beteiligt sind. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen bedürfen dabei weiterer Untersuchungen.

Decorin ist ein weiteres Proteoglykan der Gruppe der SLRP, das dem Biglykan in Struktur und Funktion sehr ähnlich ist [81]. In der isolierten Betrachtung der normoglykämischen Gruppen zeigte sich in den Explantaten der Bgn⁻⁰-Tiere eine im

Vergleich zu denen der WT-Mäuse signifikant erhöhte Einwanderung von Decorin in die Patches. Im Kontext der DAVD ist bekannt, dass Biglykan und Decorin gleichermaßen mit einer LDL-Retention in den Klappensegeln assoziiert sind [98]. Zudem konnten Biglykan und Decorin histologisch in der direkten Umgebung von Kalkablagerungen in degenerierten Aortenklappen insbesondere im Bereich der Frühläsionen nachgewiesen werden [94]. Untersuchungen mit biglykan- und decorindefizienten Mäusen aus dem Bereich der Bindegewebsforschung postulieren nicht nur redundante und synergistische [86, 144], sondern zum Teil auch kompensatorische Effekte im Falle des Fehlens von Biglykan oder Decorin [138]. Der erhöhte Nachweis von Decorin in den Patches der normoglykämischen Bgn⁻⁰-Tiere könnte daher als Hinweis auf einen kompensatorischen Mechanismus auf die Biglykandefizienz interpretiert werden.

Um die Umbauprozesse im Rahmen der DAVD und Prothesendegeneration vollständig zu verstehen, ist neben der Untersuchung der EZM-Bestandteile selbst auch die Beschreibung des enzymatischen Ab- und Umbaus der kollagenen Grundstruktur durch MMPs essentiell. Die Bedeutung der Proteasen konnte für die DAVD [145, 146], sowie auch für Degeneration von Aortenklappenbioprothesen [58, 147] vielfach nachgewiesen werden. Leider gelang es in diesem Projekt, auch unter Einsatz eines Laserscanning-Mikroskops (Laser Scanning Mikroskop 710, Carl Zeiss AG, Oberkochen), nicht, ein geeignetes Protokoll für den histologischen Nachweis von MMP2 zu etablieren. Schwierigkeiten bereitete dabei insbesondere die hohe Eigenfluoreszenz des glutaraldehydfixierten, hauptsächlich aus Kollagen bestehenden Bioprothesengewebes, die eine Detektion des spezifischen Signals für MMP2 erschwerte.

4.1.6 Hyperglykämie verstärkt Mineralisierung und Kalzifizierung im ektopen Degenerationsmodell

Im fortgeschrittenen Stadium der DAVD und der Bioprothesendegeneration kommt es zur Mineralisierung der EZM bis hin zur Einlagerung von makroskopisch sichtbaren und die Klappenfunktion einschränkenden Verkalkungen. Zur Untersuchung dieser Vorgänge wurden die Patches mittels Von-Kossa-Färbung und Alizarin-Rot-Färbung untersucht. Es gelang im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung der genannten Färbungen, eine ektope Kalzifizierung im Sinne von Kalkablagerungen im Inneren des Bioprothesenmaterials auf histologischer Ebene darzustellen. Dies deckt sich mit den Versuchen von Ohri und Rajachar, die in Explantaten aus Osteopontin-defizienten sowie Carboanhydrase-2-defizienten Mäusen ebenfalls auf histologischer Ebene eine ektope Kalzifizierung von subkutan implantiertem bovinem glutaraldehydfixiertem Perikard zeigten [112, 148]. Dabei weist die Von-Kossa-Färbung den Phosphatanteil der Kristalle nach [119], während die Alizarin-Rot-Färbung Einlagerungen von Kalzium anzeigt [120].

4 Diskussion

Da beide Färbungen ein Signal an zueinander äquivalenten Stellen der Proben aufwiesen, ist hier zweifelsfrei von einem Kalzifizierungsvorgang auszugehen. In der semiquantitativen Auswertung mit Hilfe eines fünfstufigen Scores zeigte sich für die Bgn⁻⁰-Gruppen eine signifikant höhere Akkumulation von Kalkeinlagerungen in den Explantaten der hyperglykämischen Tiere verglichen mit denen der normoglykämischen Versuchsgruppe. Auch für die WT-Gruppe zeigten die Daten tendenziell einen prokalzifizierenden Effekt der Hyperglykämie auf das Bioprothesenmaterial, wenngleich die statistische Untersuchung eine Signifikanz knapp verfehlte. Die in multiplen retrospektiven Studien beschriebene prodegenerative Wirkung des Diabetes mellitus auf Aortenklappenbioprothesen [45, 47, 75, 76] kann somit durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstrichen werden. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen. Da sich sowohl für die Bgn⁻⁰-Gruppen, als auch tendenziell für die WT-Gruppen, ein durch die systemische Hyperglykämie induzierter prokalzifizierender Effekt auf das Bioprothesenmaterial zeigte, lässt sich die in der Literatur postulierte prodegenerative Wirkung von Biglykan in unseren Daten nicht abbilden. Ob die Biglykandefizienz im verwendeten Modell tatsächlich entgegen der vorangegangenen Untersuchungen keinen Einfluss auf die Degeneration von Bioprothesenmaterial hatte, oder der Effekt nur durch die Hyperglykämie verschleiert wird, lässt sich dabei nicht mit Sicherheit sagen.

4.1.7 Degeneration der nativen murinen Aortenklappen

Ergänzend zu den Untersuchungen der Proben aus dem subkutanen ektopen Degenerationsmodell erfolgte im Rahmen dieser Arbeit auch die Untersuchung der nativen Aortenklappe der Versuchstiere. Zusammenfassend ergaben sich dabei keine Hinweise auf eine relevante und histologisch nachweisbare Degeneration der Aortenklappe. So zeigte sich weder eine Migration von Makrophagen als Hinweis auf inflammatorische Vorgänge, noch ein Signal in der Von-Kossa- oder Alizarin-Rot-Färbung im Sinne kalzifizierender Vorgänge. Dennoch lassen sich hinsichtlich der Methodik aus den Ergebnissen einige Erkenntnisse ableiten, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

Bereits in der HE-Färbung zeigte sich in 14 von 16 Tieren eine schwarze Pigmentierung der Aortenklappentaschen. Dies deckt sich mit einer Veröffentlichung von Sanchez-Pina, der 2019 in seiner Untersuchung der Herzklappen von C57BL/6J bei 87,2 % der untersuchten Tiere eine Pigmentierung der Aortenklappe nachwies [149]. Ein histologischer Nachweis von Kalzifizierungsvorgängen kann, wie oben erläutert, prinzipiell mittels Von-Kossa-Färbung sowie Alizarin-Rot-Färbung gleichermaßen erfolgen. Für den Nachweis von Kalk in den murinen Aortenklappen scheint die von

4 Diskussion

Kossa-Färbung aufgrund der regelhaft in den Klappentaschen enthaltenen schwarzen Pigmente jedoch nicht sinnvoll, sodass aufgrund der fehlenden Differenzierungsmöglichkeit hier besser auf eine Alizarin-Rot-Färbung zurückgegriffen werden sollte.

Tandon et al. beschreiben in ihrer Arbeit ebendiese Problematik [150]. Sie wiesen in WT-Mäusen unter Verwendung einer prokalzifizierenden Diät mittels Alizarin-Rot-Färbung Kalkdepots in der murinen Aortenklappe nach. Neben Kalzifizierungsvorgängen konnten in dieser Arbeit auch eine Lipidakkumulation, eine inflammatorische Reaktion sowie Umbauvorgänge der EZM in den Aortenklappen nachgewiesen werden. Vergleicht man das dort verwendete Modell mit unserem Modell, so fällt an diskriminierenden Faktoren insbesondere das Alter der von der Versuchsgruppe um Tandon untersuchten Mäuse auf. Die Versuchstiere in diesem Modell wurden erst im Alter von 20 Wochen in den Versuch eingeschlossen, während die Mäuse in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell im Alter von 16 Wochen bereits den Endpunkt des Versuches erreicht hatten. Zahlreiche Kohortenstudien belegen, dass das Alter für der Entwicklung der DAVD einen unabhängigen Risikofaktor darstellt [1, 13, 15]. Auch die Arbeitsgruppe um Drolet et al. konnte in WT-Mäusen sowie in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen unter fett- und kohlenhydratreicher Diät Kalzifizierungsvorgänge, Lipidakkumulation und Migration inflammatorischer Zellen sowie eine Verdickung der Klappentaschen in den murinen Aortenklappen nachweisen [151].

Um in zukünftigen Versuchen auch Veränderungen an den murinen Aortenklappen im Sinne pathobiologischen Prozessen einer DAVD untersuchen zu können, könnten für das in dieser Arbeit verwendete Modell die Erhöhung des Alters der Versuchstiere sowie der Einsatz einer fett- und kohlenhydratreichen Diät vielversprechende Ansatzpunkte sein.

Die quantitative Auswertung der EZM-Komponenten Kollagen Typ I, Elastin, Decorin und Biglykan im Aortenring ergab, abgesehen vom Fehlen von Biglykan in den Bgn⁻⁰-Tieren, keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Dabei erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Schnittrichtungen der Aortenklappen sowie aufgrund der Pigmentierung der Aortenklappentaschen die Quantifizierung der DAB-Färbung durch Vermessung des Aortenringes. Die Klappentaschen selbst konnten nicht analysiert werden. Einerseits fehlt hierdurch in der Auswertung ein relevanter Anteil der Aortenklappe. Andererseits konnten verschiedene Untersuchungen zeigen, dass degenerative Vorgänge an der Aortenklappe zumeist am Aortenring beziehungsweise an den Kommissuren als Ansatzpunkt der Klappentaschen beginnen [150, 152]. Somit kann die Auswertung in dieser Form zumindest einen ersten Hinweis auf ablaufende Prozesse und bestehende Unterschiede liefern. Für zukünftige Untersuchungen wären

4 Diskussion

eine höhere Standardisierung des Schneidevorganges sowie eine Veränderung der immunhistologischen Untersuchungstechnik, beispielweise durch den Einsatz einer Immunfluoreszenzfärbung, denkbar, um in der Auswertung auch die Aortenklappentaschen einbeziehen zu können.

4.2 Limitierungen

4.2.1 Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dem Tiermodell

Aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden im Genom, der Anatomie und des Stoffwechsels ist die Translation von in Tierversuchen gewonnenen Erkenntnissen auf humane Prozesse nicht immer uneingeschränkt möglich. Dennoch wird die Maus seit Jahrzehnten als anerkanntes, wenngleich nicht unumstrittenes, Modell für die Untersuchung von kardiovaskulären pathobiologischen Prozessen verwendet [153, 154]. Dabei kommen verschiedene Arbeiten zu dem Schluss, dass die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Mausversuchen unter der Beachtung von einigen Standards insgesamt gut ist [155, 156]. Zudem bietet allein der Tierversuch gegenüber anderen Untersuchungsmethoden die Möglichkeit, einen Prozess *in vivo* zu modulieren und zu untersuchen, sodass Tierversuche auch weiterhin ein wichtiger und unverzichtbarer Bestandteil der Forschung sind.

4.2.2 Ektopes Degenerationsmodell

Das ektopes Degenerationsmodell stellt seit Jahrzehnten ein etabliertes Modell für die Analyse der Bioprothesendegeneration *in vivo* dar [93, 111-113, 148] dar. Dennoch liegt in diesem Modell aufgrund der Implantation an atypischer Stelle auch eine der wichtigsten Limitationen dieser Arbeit. Die Patches wurden den Versuchstieren subkutan implantiert, sodass sich die umgebenden Zellen im Milieu des subkutanen Fettgewebes von denen am Aortenursprung unterscheiden. Zudem ist die Aortenklappe in ihrer typischen Lokalisation und Funktion aufgrund des ständigen systolisch-diastolischen Druckgradienten sowie der Lage im direkten Blutstrom starken Scherkräften und mechanischem Stress ausgesetzt. *In vivo*- sowie *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass diese physikalischen Einflüsse in der Entstehung der DAVD sowie der Bioprothesendegeneration pathobiologische Veränderungen auf verschiedenen Wegen beschleunigen und induzieren [51, 157-159]. Diese Einflussgrößen können aufgrund der ektopen subkutanen Lage des Bioprothesenmaterials im verwendeten Modell nicht abgebildet werden. Trotz der dargestellten Limitationen bietet das Modell der ektopen Degeneration die herausragende Möglichkeit, einen komplexen Vorgang *in vivo* zu

4 Diskussion

untersuchen. Eine nomotope Implantation von Bioprothesenmaterial wäre einerseits aufgrund der anatomischen Verhältnisse in Mäusen kaum durchführbar und würde andererseits im Vergleich zur ektopen Implantation nur zur Gewinnung winziger Proben führen, was eine umfassende Auswertung unmöglich machen würde.

4.2.3 Induktion einer Hyperglykämie durch STZ

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die intraperitoneale Applikation von STZ eine hyperglykämie Stoffwechsellage in einigen Versuchstieren ausgelöst. STZ induziert den Untergang der insulinproduzierenden Betazellen im Pankreas, sodass es im Organismus zu einem absoluten Insulinmangel und in Folge dessen zu einer Hyperglykämie kommt. Der Diabetes mellitus Typ 2, der als unabhängiger Risikofaktor für eine beschleunigte Bioprothesendegeneration gilt [45] und die häufigste Ursache einer hyperglykämie Stoffwechsellage in der Allgemeinbevölkerung darstellt, ist hingegen in erster Linie von einer peripheren Insulinresistenz geprägt, die eine Hyperglykämie im Organismus auslöst. Unser Modell ist daher genau genommen nur geeignet, um den Einfluss der Hyperglykämie zu untersuchen, nicht jedoch den spezifischen Einfluss des Diabetes mellitus Typ 2 im engeren Sinne. Ob die Insulinresistenz selbst einen Einfluss auf die Prothesendegeneration hat, müsste in weiterführenden Versuchen eruiert werden. Unabhängig davon ist der im Rahmen dieser Arbeit angewendete Versuchszeitraum von acht Wochen natürlich nur eingeschränkt geeignet, um das klinische Bild eines Langzeit-Diabetikers abzubilden.

4.2.4 Quantifizierung histologischer Ergebnisse

Darüber hinaus sollte die Interpretation einer quantitativen Auswertung von histologischen Bildern jederzeit unter besonderer Sorgfalt erfolgen. Das histologische Bild kann nur eine Aussage über die abgebildete, im Falle dieser Arbeit lediglich 5 µm messende, Schicht machen, nicht jedoch über die Gesamtheit einer Struktur. Zur Begegnung dieses Problems werden in anderen Arbeiten mehrere Schichten aus verschiedenen Höhen vermessen, jedoch muss in diesem Fall aufgrund des begrenzten Materials die Auswahl der zu untersuchenden Faktoren stark eingegrenzt werden.

Zudem wurde die Quantifizierung der immunhistochemischen Signale in dieser Arbeit über die Messung der AF vorgenommen, die die relative Fläche des Signales im Vergleich zur Gesamtfläche erfasst. Bei der Interpretation sollte also berücksichtigt werden, dass eine Aussage über die absolute Menge eines Markers nicht möglich ist, da die Dichte der angefärbten Strukturen in der Auswertung auf diese Weise nicht berücksichtigt werden kann.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das verwendete Modell dazu in der Lage ist, auf histologischer Ebene nachweisbare degenerative Veränderungen in den ektop implantierten Patches aus Aortenklappenbioprothesenmaterial, nicht jedoch in den nativen murinen Aortenklappen, zu induzieren. Dabei waren von frühen Veränderungen wie der Migration von Makrophagen in das Fremdgewebe über einen Umbau der EZM bis hin zur Kalzifizierung als Endstrecke der Prothesendegeneration multiple Veränderungen aus allen Stadien der Erkrankung nachweisbar. Neben der Invasion von Makrophagen zeigte sich auch die Beteiligung von Fibroblasten an Erhalt und Degeneration des Materials. Ferner konnte eine Einwanderung von Endothelzellen in geringem Maße nachgewiesen werden. Die Daten unterstrichen zudem, insbesondere in Bezug auf die Kalzifizierung, den prodegenerativen Effekt einer hyperglykämischen Stoffwechsellage auf Aortenklappenbioprothesenmaterial. Punktuell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Organismus der Biglykan-defizienten Tiere auf das eingebrachte Fremdmaterial sowie auf eine hyperglykämische Stoffwechsellage anders reagierte, als jener der WT-Tiere. Dies unterstreicht die Beteiligung von Biglykan an den zugrundeliegenden pathobiologischen Vorgängen. Ungeachtet dessen, dass die Frage nach den genauen Mechanismen weiterer Forschung bedarf, können die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse einige Hinweise in Bezug auf die der Erkrankung zugrundeliegenden Veränderungen und eine Verbesserung der Methodik in der nachfolgenden Forschung liefern. Ein tiefergehendes Verständnis der Pathophysiologie könnte in der Zukunft zur Entwicklung von Aortenklappenbioprothesen mit verbesserten Eigenschaften und einer verlängerten Haltbarkeit beitragen.

5 Literaturverzeichnis

1. Lindroos, M., et al., *Factors associated with calcific aortic valve degeneration in the elderly*. Eur Heart J, 1994. 15(7): p. 865-70.
2. Otto, C.M., et al., *Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly*. N Engl J Med, 1999. 341(3): p. 142-7.
3. Iung, B., et al., *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease*. Eur Heart J, 2003. 24(13): p. 1231-43.
4. Ferreira-Gonzalez, I., et al., *Prevalence of calcific aortic valve disease in the elderly and associated risk factors: a population-based study in a Mediterranean area*. Eur J Prev Cardiol, 2013. 20(6): p. 1022-30.
5. Vahanian, A., et al., *Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2007. 28(2): p. 230-68.
6. Mollmann, H., et al., *Lower mortality in an all-comers aortic stenosis population treated with TAVI in comparison to SAVR*. Clin Res Cardiol, 2020. 109(5): p. 611-615.
7. Daniel, W.G., et al., *Leitlinie Klappenvitien im Erwachsenenalter*. Clin Res Cardiol, 2006. 95(11): p. 620-41.
8. Nishimura, R.A., et al., *2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014. 148(1): p. e1-e132.
9. Baumgartner, H., et al., *2017 ESC/EACTS Guidelines for the Management of Valvular Heart Disease*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2018. 71(2): p. 110.
10. O'Brien, K.D., *Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(8): p. 1721-8.
11. Novaro, G.M., et al., *Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease*. Circulation, 2003. 108(15): p. 1804-8.
12. Roberts, W.C. and J.M. Ko, *Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation*. Circulation, 2005. 111(7): p. 920-5.
13. Beppu, S., et al., *Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves*. Am J Cardiol, 1993. 71(4): p. 322-7.
14. Sathyanurthy, I. and S. Alex, *Calcific aortic valve disease: is it another face of atherosclerosis?* Indian Heart J, 2015. 67(5): p. 503-6.
15. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol, 1997. 29(3): p. 630-4.
16. Dudzinski, D.M. and P.T. O'Gara, *Association of Cigarette Smoking With Degenerative Aortic Valve Disease*. Circ Cardiovasc Imaging, 2019. 12(8): p. e009441.
17. Rajamannan, N.M., et al., *Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update*. Circulation, 2011. 124(16): p. 1783-91.
18. Butcher, J.T., G.J. Mahler, and L.A. Hockaday, *Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. 63(4-5): p. 242-68.
19. Peeters, F., et al., *Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment*. Eur Heart J, 2018. 39(28): p. 2618-2624.

5 Literaturverzeichnis

20. Otto, C.M., et al., *Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies.* Circulation, 1994. 90(2): p. 844-53.
21. Lerman, D.A., S. Prasad, and N. Alotti, *Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches.* Eur Cardiol, 2015. 10(2): p. 108-112.
22. Chen, J.H. and C.A. Simmons, *Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues.* Circ Res, 2011. 108(12): p. 1510-24.
23. Colli, A., et al., *Degeneration of native and tissue prosthetic valve in aortic position: do statins play an effective role in prevention?* Int J Cardiol, 2007. 116(2): p. 144-52.
24. Freeman, R.V. and C.M. Otto, *Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies.* Circulation, 2005. 111(24): p. 3316-26.
25. Hulin, A., et al., *Advances in Pathophysiology of Calcific Aortic Valve Disease Propose Novel Molecular Therapeutic Targets.* Front Cardiovasc Med, 2018. 5: p. 21.
26. Dweck, M.R., N.A. Boon, and D.E. Newby, *Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium.* J Am Coll Cardiol, 2012. 60(19): p. 1854-63.
27. SERVIER, L.L. *Servier Medical Art.* Available from: <https://smart.servier.com>.
28. Rossebo, A.B., et al., *Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis.* N Engl J Med, 2008. 359(13): p. 1343-56.
29. Aronow, W.S., *Treatment of Mild Aortic Stenosis With Statins.* Am J Cardiol, 2020. 125(5): p. 832-833.
30. Cribier, A., et al., *Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description.* Circulation, 2002. 106(24): p. 3006-8.
31. Osnabrugge, R.L., et al., *Performance of EuroSCORE II in a large US database: implications for transcatheter aortic valve implantation.* Eur J Cardiothorac Surg, 2014. 46(3): p. 400-8; discussion 408.
32. Moss, S., et al., *A systematic review and meta-analysis of the clinical outcomes of TAVI versus SAVR in the octogenarian population.* Indian J Thorac Cardiovasc Surg, 2020. 36(4): p. 356-364.
33. Pibarot, P. and J.G. Dumesnil, *Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management.* Circulation, 2009. 119(7): p. 1034-48.
34. Khan, S.S., et al., *Twenty-year comparison of tissue and mechanical valve replacement.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2001. 122(2): p. 257-69.
35. Ruel, M., et al., *Late incidence and determinants of reoperation in patients with prosthetic heart valves.* Eur J Cardiothorac Surg, 2004. 25(3): p. 364-70.
36. Ruel, M., et al., *Long-term outcomes of valve replacement with modern prostheses in young adults.* Eur J Cardiothorac Surg, 2005. 27(3): p. 425-33; discussion 433.
37. Cannegieter, S.C., F.R. Rosendaal, and E. Briet, *Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses.* Circulation, 1994. 89(2): p. 635-41.
38. Hammermeister, K., et al., *Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial.* J Am Coll Cardiol, 2000. 36(4): p. 1152-8.
39. Casselman, F.P., et al., *Repeated thromboembolic and bleeding events after mechanical aortic valve replacement.* Ann Thorac Surg, 2001. 71(4): p. 1172-80.
40. Chikwe, J., F. Filsoufi, and A.F. Carpentier, *Prosthetic valve selection for middle-aged patients with aortic stenosis.* Nat Rev Cardiol, 2010. 7(12): p. 711-9.
41. Golczyk, K., et al., *Heart valve sound of various mechanical composite grafts, and the impact on patients' quality of life.* J Heart Valve Dis, 2010. 19(2): p. 228-32.

5 Literaturverzeichnis

42. Ciubotaru, A., et al., *Biological heart valves*. Biomed Tech (Berl), 2013. 58(5): p. 389-97.
43. Stassano, P., et al., *Aortic valve replacement: a prospective randomized evaluation of mechanical versus biological valves in patients ages 55 to 70 years*. J Am Coll Cardiol, 2009. 54(20): p. 1862-8.
44. Johnston, D.R., et al., *Long-term durability of bioprosthetic aortic valves: implications from 12,569 implants*. Ann Thorac Surg, 2015. 99(4): p. 1239-47.
45. Lorusso, R., et al., *Type 2 diabetes mellitus is associated with faster degeneration of bioprosthetic valve: results from a propensity score-matched Italian multicenter study*. Circulation, 2012. 125(4): p. 604-14.
46. Ochi, A., et al., *Patient Risk Factors for Bioprosthetic Aortic Valve Degeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Heart Lung Circ, 2020. 29(5): p. 668-678.
47. Nitsche, C., et al., *Determinants of Bioprosthetic Aortic Valve Degeneration*. JACC Cardiovasc Imaging, 2020. 13(2 Pt 1): p. 345-353.
48. Yeghiazaryan, K., et al., *Degenerative valve disease and bioprostheses: risk assessment, predictive diagnosis, personalised treatments*. EPMA J, 2011. 2(1): p. 91-105.
49. Jawad, K., et al., *Midterm results after St Jude Medical Epic porcine xenograft for aortic, mitral, and double valve replacement*. J Card Surg, 2020. 35(8): p. 1769-1777.
50. Schoen, F.J., *Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves*. Annu Rev Pathol, 2012. 7: p. 161-83.
51. Vyavahare, N., et al., *Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss*. J Biomed Mater Res, 1999. 46(1): p. 44-50.
52. Sacks, M.S. and F.J. Schoen, *Collagen fiber disruption occurs independent of calcification in clinically explanted bioprosthetic heart valves*. J Biomed Mater Res, 2002. 62(3): p. 359-71.
53. Cote, N., P. Pibarot, and M.A. Clavel, *Incidence, risk factors, clinical impact, and management of bioprosthesis structural valve degeneration*. Curr Opin Cardiol, 2017. 32(2): p. 123-129.
54. Schussler, O., et al., *Effect of human immunoglobulins on the immunogenicity of porcine bioprostheses*. Ann Thorac Surg, 2001. 71(5 Suppl): p. S396-400.
55. Manji, R.A., et al., *Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection*. Circulation, 2006. 114(4): p. 318-27.
56. Shetty, R., et al., *Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves*. Eur J Clin Invest, 2009. 39(6): p. 471-80.
57. Kostyunin, A., et al., *Ultrastructural Pathology of Atherosclerosis, Calcific Aortic Valve Disease, and Bioprosthetic Heart Valve Degeneration: Commonalities and Differences*. Int J Mol Sci, 2020. 21(20).
58. Sellers, S.L., et al., *Transcatheter Aortic Heart Valves: Histological Analysis Providing Insight to Leaflet Thickening and Structural Valve Degeneration*. JACC Cardiovasc Imaging, 2019. 12(1): p. 135-145.
59. Kostyunin, A.E., et al., *Degeneration of Bioprosthetic Heart Valves: Update 2020*. J Am Heart Assoc, 2020. 9(19): p. e018506.
60. Sun, H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045*. Diabetes Res Clin Pract, 2022. 183: p. 109119.
61. *IDF DIABETES ATLAS. Ninth edition 2019*. 2019, International Diabetes Federation: Brussels.
62. American Diabetes, A., *2. Classification and Diagnosis of Diabetes*. Diabetes Care, 2017. 40(Suppl 1): p. S11-S24.

63. Nauck M, G.C., Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Freckmann G, Heinemann L, Schleicher E, Landgraf R, *Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus: Update 2020*. 2020.
64. Bunn, H.F., et al., *The biosynthesis of human hemoglobin A1c. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo*. J Clin Invest, 1976. 57(6): p. 1652-9.
65. Choi, S.H., et al., *Hemoglobin A1c as a diagnostic tool for diabetes screening and new-onset diabetes prediction: a 6-year community-based prospective study*. Diabetes Care, 2011. 34(4): p. 944-9.
66. Harding, J.L., et al., *Global trends in diabetes complications: a review of current evidence*. Diabetologia, 2019. 62(1): p. 3-16.
67. Einarson, T.R., et al., *Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017*. Cardiovasc Diabetol, 2018. 17(1): p. 83.
68. Schutt, K., D. Müller-Wieland, and N. Marx, *Diabetes Mellitus and the Heart*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2019. 127(S 01): p. S102-S104.
69. Larsson, S.C., et al., *Type 1 and type 2 diabetes mellitus and incidence of seven cardiovascular diseases*. Int J Cardiol, 2018. 262: p. 66-70.
70. Kamalesh, M., et al., *Does diabetes accelerate progression of calcific aortic stenosis?* Eur J Echocardiogr, 2009. 10(6): p. 723-5.
71. Chadha, D.S., et al., *Risk factors for degenerative aortic valve disease in India: A case control study*. Med J Armed Forces India, 2018. 74(1): p. 33-37.
72. Yan, A.T., et al., *Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study*. J Am Coll Cardiol, 2017. 69(12): p. 1523-1532.
73. Bondarenko, L., *Diabetes and Collagen: Interrelations*. Avicenna Journal of Medical Biochemistry, 2019. 7: p. 64-71.
74. Testuz, A., et al., *Influence of metabolic syndrome and diabetes on progression of calcific aortic valve stenosis*. Int J Cardiol, 2017. 244: p. 248-253.
75. Briand, M., et al., *Metabolic syndrome is associated with faster degeneration of bioprosthetic valves*. Circulation, 2006. 114(1 Suppl): p. I512-7.
76. Nollert, G., et al., *Risk factors for atherosclerosis and the degeneration of pericardial valves after aortic valve replacement*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. 126(4): p. 965-8.
77. Lassnigg, A., et al., *Long-term absolute and relative survival after aortic valve replacement: a prospective cohort study*. Eur J Anaesthesiol, 2013. 30(11): p. 695-703.
78. Kopytek, M., et al., *Accumulation of advanced glycation end products (AGEs) is associated with the severity of aortic stenosis in patients with concomitant type 2 diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2020. 19(1): p. 92.
79. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative stress and diabetic complications*. Circ Res, 2010. 107(9): p. 1058-70.
80. Natorska, J., *Diabetes mellitus as a risk factor for aortic stenosis: from new mechanisms to clinical implications*. Kardiol Pol, 2021. 79(10): p. 1060-1067.
81. McBride, O.W., L.W. Fisher, and M.F. Young, *Localization of PGI (biglycan, BGN) and PGII (decorin, DCN, PG-40) genes on human chromosomes Xq13-qter and 12q, respectively*. Genomics, 1990. 6(2): p. 219-25.
82. Xu, T., et al., *Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice*. Nat Genet, 1998. 20(1): p. 78-82.
83. Young, M.F., et al., *Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases*. Glycoconj J, 2002. 19(4-5): p. 257-62.
84. Kalamajski, S. and A. Oldberg, *The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis*. Matrix Biol, 2010. 29(4): p. 248-53.
85. Chen, S. and D.E. Birk, *The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly*. FEBS J, 2013. 280(10): p. 2120-37.

5 Literaturverzeichnis

86. Robinson, K.A., et al., *Decorin and biglycan are necessary for maintaining collagen fibril structure, fiber realignment, and mechanical properties of mature tendons*. *Matrix Biol*, 2017. 64: p. 81-93.
87. Bereczki, E. and M. Santha, *The role of biglycan in the heart*. *Connect Tissue Res*, 2008. 49(3): p. 129-32.
88. Latif, N., et al., *Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves*. *J Heart Valve Dis*, 2005. 14(2): p. 218-27.
89. Nastase, M.V., M.F. Young, and L. Schaefer, *Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals*. *J Histochem Cytochem*, 2012. 60(12): p. 963-75.
90. Scuruchi, M., et al., *Biglycan and atherosclerosis: Lessons from high cardiovascular risk conditions*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020. 1865(2): p. 158545.
91. Mandraffino, G., et al., *Biglycan expression, earlier vascular damage and pro-atherogenic profile improvement after smoke cessation in young people*. *Atherosclerosis*, 2017. 257: p. 109-115.
92. Roedig, H., et al., *Breaking down chronic inflammatory diseases: the role of biglycan in promoting a switch between inflammation and autophagy*. *FEBS J*, 2019. 286(15): p. 2965-2979.
93. Barth, M., et al., *Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve*. *Diab Vasc Dis Res*, 2019. 16(3): p. 254-269.
94. Stephens, E.H., et al., *Differential proteoglycan and hyaluronan distribution in calcified aortic valves*. *Cardiovasc Pathol*, 2011. 20(6): p. 334-42.
95. Derbali, H., et al., *Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2*. *Am J Pathol*, 2010. 176(6): p. 2638-45.
96. Hultgardh-Nilsson, A., J. Boren, and S. Chakravarti, *The small leucine-rich repeat proteoglycans in tissue repair and atherosclerosis*. *J Intern Med*, 2015. 278(5): p. 447-61.
97. Thompson, J.C., et al., *Increased atherosclerosis in mice with increased vascular biglycan content*. *Atherosclerosis*, 2014. 235(1): p. 71-5.
98. Neufeld, E.B., et al., *Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix*. *Atherosclerosis*, 2014. 233(1): p. 113-21.
99. Meng, X., et al., *Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 294(1): p. C29-35.
100. Grande-Allen, K.J., et al., *Loss of chondroitin 6-sulfate and hyaluronan from failed porcine bioprosthetic valves*. *J Biomed Mater Res A*, 2003. 65(2): p. 251-9.
101. Hiebert, L.M., *Proteoglycans and Diabetes*. *Curr Pharm Des*, 2017. 23(10): p. 1500-1509.
102. Thompson, J., et al., *Renal accumulation of biglycan and lipid retention accelerates diabetic nephropathy*. *Am J Pathol*, 2011. 179(3): p. 1179-87.
103. Bolton, K., D. Segal, and K. Walder, *The small leucine-rich proteoglycan, biglycan, is highly expressed in adipose tissue of *Psammomys obesus* and is associated with obesity and type 2 diabetes*. *Biologics*, 2012. 6: p. 67-72.
104. Mangat, R., et al., *Arterial retention of remnant lipoproteins ex vivo is increased in insulin resistance because of increased arterial biglycan and production of cholesterol-rich atherogenic particles that can be improved by ezetimibe in the JCR:LA-cp rat*. *J Am Heart Assoc*, 2012. 1(5): p. e003434.
105. Hiukka, A., et al., *ApoCIII-enriched LDL in type 2 diabetes displays altered lipid composition, increased susceptibility for sphingomyelinase, and increased binding to biglycan*. *Diabetes*, 2009. 58(9): p. 2018-26.

5 Literaturverzeichnis

106. Gowd, V., A. Gurukar, and N.D. Chilkunda, *Glycosaminoglycan remodeling during diabetes and the role of dietary factors in their modulation*. World J Diabetes, 2016. 7(4): p. 67-73.
107. Hiebert, L.M., J. Han, and A.K. Mandal, *Glycosaminoglycans, hyperglycemia, and disease*. Antioxid Redox Signal, 2014. 21(7): p. 1032-43.
108. Selig, J.I., et al., *Interactive contribution of hyperinsulinemia, hyperglycemia, and mammalian target of rapamycin signaling to valvular interstitial cell differentiation and matrix remodeling*. Front Cardiovasc Med, 2022. 9: p. 942430.
109. Dasu, M.R., et al., *Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects*. Diabetes Care, 2010. 33(4): p. 861-8.
110. Chung, I., et al., *Biglycan reduces body weight by regulating food intake in mice and improves glucose metabolism through AMPK/AKT dual pathways in skeletal muscle*. FASEB J, 2021. 35(8): p. e21794.
111. Giachelli, C.M., *Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation*. Z Kardiol, 2001. 90 Suppl 3: p. 31-7.
112. Ohri, R., et al., *Mitigation of ectopic calcification in osteopontin-deficient mice by exogenous osteopontin*. Calcif Tissue Int, 2005. 76(4): p. 307-15.
113. Steitz, S.A., et al., *Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification*. Am J Pathol, 2002. 161(6): p. 2035-46.
114. Selig, J.I., *Die Rolle der extrazellulären Matrix in der degenerativen Aortenklappenerkrankung unter dem Einfluss von Diabetes*. 2018: Düsseldorf.
115. Eleazu, C.O., et al., *Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans*. J Diabetes Metab Disord, 2013. 12(1): p. 60.
116. Rakieten, N., M.L. Rakieten, and M.V. Nadkarni, *Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)*. Cancer Chemother Rep, 1963. 29: p. 91-8.
117. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. 51(2): p. 216-26.
118. Lee, C., et al., *High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: in vitro material assessment and in vivo anticalcification effect*. Eur J Cardiothorac Surg, 2011. 39(3): p. 381-7.
119. Rungby, J., et al., *The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background*. Histochem J, 1993. 25(6): p. 446-51.
120. Lievreumont, M., J. Potus, and B. Guillou, *Use of alizarin red S for histochemical staining of Ca²⁺ in the mouse; some parameters of the chemical reaction in vitro*. Acta Anat (Basel), 1982. 114(3): p. 268-80.
121. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 2012. 9(7): p. 676-682.
122. Preibisch, S., S. Saalfeld, and P. Tomancak, *Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions*. Bioinformatics, 2009. 25(11): p. 1463-1465.
123. Velho, T.R., et al., *Bioprosthetic Aortic Valve Degeneration: a Review from a Basic Science Perspective*. Braz J Cardiovasc Surg, 2021.
124. Williams, D.F., et al., *Long-Term Stability and Biocompatibility of Pericardial Bioprosthetic Heart Valves*. Front Cardiovasc Med, 2021. 8: p. 728577.
125. Pahwa, H., M.T. Khan, and K. Sharan, *Hyperglycemia impairs osteoblast cell migration and chemotaxis due to a decrease in mitochondrial biogenesis*. Mol Cell Biochem, 2020. 469(1-2): p. 109-118.
126. Jiang, Q.W., et al., *Diabetes inhibits corneal epithelial cell migration and tight junction formation in mice and human via increasing ROS and impairing Akt signaling*. Acta Pharmacol Sin, 2019. 40(9): p. 1205-1211.

5 Literaturverzeichnis

127. Xuan, Y.H., et al., *High-glucose inhibits human fibroblast cell migration in wound healing via repression of bFGF-regulating JNK phosphorylation*. PLoS One, 2014. 9(9): p. e108182.
128. Campbell, M., P. Anderson, and E.R. Trimble, *Glucose lowers the threshold for human aortic vascular smooth muscle cell migration: inhibition by protein phosphatase-2A*. Diabetologia, 2008. 51(6): p. 1068-80.
129. Hamed, S., et al., *Hyperglycemia and oxidized-LDL exert a deleterious effect on endothelial progenitor cell migration in type 2 diabetes mellitus*. Thromb Res, 2010. 126(3): p. 166-74.
130. Shimizu-Hirota, R., et al., *Extracellular matrix glycoprotein biglycan enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Circ Res, 2004. 94(8): p. 1067-74.
131. Okamura, K., et al., *Antigen depressant effect of glutaraldehyde for aortic heterografts with a valve, with special reference to a concentration right fit for the preservation of grafts*. Surgery, 1980. 87(2): p. 170-6.
132. O'Brien, K.D., et al., *Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. 16(4): p. 523-32.
133. Mosch, J., et al., *Histopathological assessment of calcification and inflammation of calcific aortic valves from patients with and without diabetes mellitus*. Histol Histopathol, 2017. 32(3): p. 293-306.
134. Dahm, M., et al., *Relevance of immunologic reactions for tissue failure of bioprosthetic heart valves*. Ann Thorac Surg, 1995. 60(2 Suppl): p. S348-52.
135. Sadaba, J.R., et al., *Role for Galectin-3 in Calcific Aortic Valve Stenosis*. J Am Heart Assoc, 2016. 5(11).
136. Sadler, J.E., *Biochemistry and genetics of von Willebrand factor*. Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 395-424.
137. Schonherr, E., et al., *Interaction of biglycan with type I collagen*. J Biol Chem, 1995. 270(6): p. 2776-83.
138. Zhang, G., et al., *Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan*. J Biol Chem, 2009. 284(13): p. 8888-97.
139. Ziyadeh, F.N., *Renal tubular basement membrane and collagen type IV in diabetes mellitus*. Kidney Int, 1993. 43(1): p. 114-20.
140. Song, W. and A. Ergul, *Type-2 diabetes-induced changes in vascular extracellular matrix gene expression: relation to vessel size*. Cardiovasc Diabetol, 2006. 5: p. 3.
141. Law, B., et al., *Diabetes-induced alterations in the extracellular matrix and their impact on myocardial function*. Microsc Microanal, 2012. 18(1): p. 22-34.
142. Selig, J.I., et al., *Impact of hyperinsulinemia and hyperglycemia on valvular interstitial cells - A link between aortic heart valve degeneration and type 2 diabetes*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. 1865(9): p. 2526-2537.
143. Hutson, H.N., et al., *Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture*. PLoS One, 2016. 11(9): p. e0163858.
144. Corsi, A., et al., *Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues*. J Bone Miner Res, 2002. 17(7): p. 1180-9.
145. Fondard, O., et al., *Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors*. Eur Heart J, 2005. 26(13): p. 1333-41.
146. Matilla, L., et al., *A Role for MMP-10 (Matrix Metalloproteinase-10) in Calcific Aortic Valve Stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. 40(5): p. 1370-1382.

5 Literaturverzeichnis

147. Simionescu, A., D. Simionescu, and R. Deac, *Biochemical pathways of tissue degeneration in bioprosthetic cardiac valves. The role of matrix metalloproteinases*. ASAIO J, 1996. 42(5): p. M561-7.
148. Rajachar, R.M., et al., *Role of carbonic anhydrase II in ectopic calcification*. Cardiovasc Pathol, 2009. 18(2): p. 77-82.
149. Sanchez-Pina, J., et al., *Pigmentation of the aortic and pulmonary valves in C57BL/6J x Balb/cByJ hybrid mice of different coat colours*. Anat Histol Embryol, 2019. 48(5): p. 429-436.
150. Tandon, I., et al., *Label-free optical biomarkers detect early calcific aortic valve disease in a wild-type mouse model*. BMC Cardiovasc Disord, 2020. 20(1): p. 521.
151. Drolet, M.C., et al., *A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice*. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(4): p. 850-5.
152. Scatena, M., et al., *Increased Calcific Aortic Valve Disease in response to a diabetogenic, procalcific diet in the LDLr(-/-)ApoB(100/100) mouse model*. Cardiovasc Pathol, 2018. 34: p. 28-37.
153. Paigen, B., A.S. Plump, and E.M. Rubin, *The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia*. Curr Opin Lipidol, 1994. 5(4): p. 258-64.
154. Perlman, R.L., *Mouse models of human disease: An evolutionary perspective*. Evol Med Public Health, 2016. 2016(1): p. 170-6.
155. Semsarian, C., *Use of mouse models for the analysis of human disease*. Curr Protoc Hum Genet, 2009. Chapter 15: p. Unit 15 2.
156. Justice, M.J. and P. Dhillon, *Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility*. Dis Model Mech, 2016. 9(2): p. 101-3.
157. Ku, C.H., et al., *Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch*. Cardiovasc Res, 2006. 71(3): p. 548-56.
158. Ellsmere, J.C., R.A. Khanna, and J.M. Lee, *Mechanical loading of bovine pericardium accelerates enzymatic degradation*. Biomaterials, 1999. 20(12): p. 1143-50.
159. Selig, J.I., et al., *Crosstalk of Diabetic Conditions with Static Versus Dynamic Flow Environment-Impact on Aortic Valve Remodeling*. Int J Mol Sci, 2021. 22(13).

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Payam Akhyari als Doktorvater und Leiter der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie für die Betreuung meiner Arbeit, die konstruktiven und ideenreichen Gespräche sowie die interessanten und motivierenden Einblicke in die experimentelle und klinische Forschung.

Nicht weniger möchte ich Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth für die großartige Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die umfassende Einarbeitung im Labor, die tolle fachliche Betreuung und das Verständnis und die Unterstützung während jeder Phase dieser Arbeit danken.

Ein riesengroßes Danke auch an Frau Dr. rer. nat. Jessica Selig für die Motivation und die Unterstützung in allen Lebenslagen, für die akribische und unermüdliche Korrektur der Arbeit und nicht zuletzt für das große entgegengebrachte Vertrauen in Form der von ihr mühevoll und hart erarbeiteten Proben.

Zudem danke ich der gesamten Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie für die freundliche Aufnahme, die vielen gemeinsam verbrachten Stunden im Labor, für die aufbauenden Worte wenn es einmal nicht lief wie geplant und die gute Zusammenarbeit. Es war eine tolle Zeit mit euch!

Ebenso geht ein großer Dank an meine Familie und natürlich an meinen Freundinnen, die mit mir gemeinsam nicht nur das Studium und diese Arbeit bestritten, sondern auch darüber hinaus noch so viel mehr zu einer unvergessenen Zeit beitrugen. Ihr seid wunderbar!

Last but not least ein riesiges Danke an meinen Freund Benjamin, der diese Arbeit in allen ihren Facetten erlebte. Danke für die Unterstützung in Form von aufmunternden Worten und Schokolade, für das Korrekturlesen und für das unentwegte Verständnis aller mit dieser Arbeit zusammenhängender Launen.

Tausend Dank!