

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

Rolle des oxidativen Stresses bei der Degeneration von kardiovaskulären Spenderprothesen im Rattenmodell

Dissertation

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

vorgelegt von

Caroline Constance Lepke

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. Alexander Assmann

Zweitgutachter: PD Dr. med. Christian Vollmer

“C’mon You Know”

Liam Gallagher (*1972)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Assmann A, Schmidt V, Lepke C, et al. Degeneration of biological heart valve grafts in a rat model of superoxide dismutase-3 deficiency. The FASEB Journal. 2022;36:e22591. doi:10.1096/fj.20220 0727RR

Zusammenfassung

Bei fortgeschrittenen Herzklappenerkrankungen ist in vielen Fällen ein Klappenersatz indiziert. Bei den überwiegend eingesetzten biologischen Prothesen führt im Laufe der Jahre kalzifizierende Degeneration zu einem Implantatversagen. Eine Vorbehandlung der Transplantate zwecks Reduktion der Immunantwort des Empfängers ist hierbei von Bedeutung. In der Frühphase der Atherosklerose ist oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) von Bedeutung. Zudem gibt es Hinweise, dass oxidativer Stress auch ein wesentliches Element bei der kalzifizierenden Degeneration der Aortenklappe darstellt. Die Superoxiddismutase (SOD) gilt als zentrales Enzym für den Abbau der ROS.

Basierend darauf war es das Ziel der vorliegenden Studie, den Einfluss oxidativen Stresses auf die Degeneration biologischer kardiovaskulärer Allografts im heterotopen Ratten-Transplantationsmodell zu untersuchen und so eine Plattform für anschließende Untersuchungen zum Thema zu schaffen. Hierzu wurden Ratten mit einer *loss-of-function*-Mutation des Genes der extrazellulären SOD (SOD3) als Modellorganismus für oxidativen Stress verwendet. Sowohl die SOD3-defizienten Ratten als auch SOD3-kompetente Kontrolltiere erhielten entweder Detergens-dezellularisierte oder kryopräservierte Allografts der Aorta samt Aortenklappe von Spenderratten. Die Prothesen wurden nach 4 und 12 Wochen in vivo explantiert und in Hinsicht auf potenzielle Veränderungen wie kalzifizierende Degeneration und chondro-osteogene Transformation histologisch untersucht.

In dieser Studie konnte erstmals ein Implantationsmodell zum Einfluss von oxidativem Stress auf die Degeneration biologischer Aortenklappen-Allografts etabliert werden. Vermehrter oxidativer Stress durch SOD3-Defizienz führte zu einer stärkeren Kalzifizierung kryopräservierter Implantate binnen 12 Wochen ($p < 0,05$), während die Degeneration in dezellularisierten Prothesen generell schwächer ausgeprägt war und keine Gruppenunterschiede aufwies. Weitere Modelle mit deutlicherer Erhöhung des oxidativen Stresses oder längeren Beobachtungszeiträumen sind erforderlich, um die Rolle der ROS für die Degeneration biologischer Prothesen weiter zu entschlüsseln.

Abstract

In advanced valvular heart disease, valve replacement is indicated in many cases. Biological prostheses which are first choice for most patients undergo progressive calcifying degeneration finally leading to implant failure. Pretreatment of the grafts to reduce the immune response of the recipient is important. In the early phase of atherosclerosis, oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS) is important. In addition, there is evidence that oxidative stress is also an essential element in calcifying degeneration of the aortic valve. Superoxide dismutase (SOD) is considered a key enzyme for the degradation of ROS.

Based on this, the aim of the present study was to establish the influence of oxidative stress on the degeneration of biological cardiovascular allografts in the heterotopic rat transplantation model, thus providing a platform for subsequent studies on this topic. For this purpose, rats with a loss-of-function mutation of the extracellular SOD (SOD3) gene were used as a model organism for oxidative stress. Both SOD3-deficient rats and SOD3-competent control animals received either detergent-decellularized or cryopreserved allografts of the aorta including the aortic valve from donor rats. The prostheses were explanted after 4 and 12 weeks *in vivo* and examined histologically for potential changes such as calcifying degeneration and chondro-osteogenic transformation.

This study was the first to establish an implantation model for examination of the influence of oxidative stress on the degeneration of biological aortic valve allografts. Increased oxidative stress due to SOD3-deficiency resulted in increased calcification of cryopreserved implants within 12 weeks ($p < 0.05$), whereas degeneration in decellularized prostheses was generally weaker and showed no group differences. Further models with more significant increase in oxidative stress or longer observation periods are needed to further translate the role of ROS in the degeneration of biological prostheses.

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest	<i>destilliertes Wasser</i>
AR	<i>Aortenregurgitation</i>
CAVD	<i>Calcific Aortic Valve Disease</i>
dezell	<i>detergenz-dezellularisiert</i>
DMEM	<i>Dublecco's Modified Eagle</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
FCS	<i>fetal calve serum</i>
H₂O₂	<i>Wasserstoffperoxid</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
Homo/SOD3^{E124D}	<i>SOD3-defiziente Ratte</i>
IQR	<i>Interquartilsabstand</i>
kryo	<i>kryopräserviert</i>
LANUV	<i>Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
O₂	<i>Sauerstoff</i>
ONOO⁻	<i>Peroxynitrit</i>
ROS	<i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SOD	<i>Superoxiddismutase</i>
SOD1	<i>zytosolische Superoxiddismutase</i>
SOD2	<i>mitochondriale Superoxiddismutase</i>
SOD3	<i>extrazelluläre Superoxiddismutase</i>
Wt	<i>Wildtyp/SOD3-kompetente Kontrolltier</i>
ZETT	<i>Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Atherosklerose und weitere degenerative Faktoren	1
1.2 Herzklappenprothesen und Prothesenversagen	2
1.3 oxidativer Stress, Rolle von SOD3	4
1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies	4
1.3.2 Superoxiddismutase	5
1.4 Ziele der Arbeit	6
2 Material und Methoden	7
2.1 Versuchstiere	7
2.1.1 Spender Aortenprothesen Explantation	7
2.1.2 Detergenz-Dezellularisierung	8
2.1.3 Kryopräservierung	8
2.1.4 Aortenprothesen-Implantation	9
2.2 Materialentnahme	10
2.2.1 Probenexplantation	10
2.2.2 Einbettung	11
2.3 Histologische Auswertung	11
2.3.1 Kryotomie	11
2.3.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	12
2.3.3 Von Kossa Färbung	12
2.3.4 Movat Pentachrom Färbung	13
2.3.5 Erstellung der Mosaik	14
2.3.6 Intima/Media-Ratio	15
2.3.7 Kalzifizierungs-Score	15
2.3.8 Movat-Score	17

2.4	Statistische Methoden	19
2.5	Verwendete Materialien	20
2.5.1	Materialliste	20
2.5.2	Software	21
2.5.3	Geräteliste.....	21
2.6	Tierversuchsgenehmigung	23
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Intimahyperplasie und Intima/Media-Ratio	24
3.2	Von Kossa Auswertung	27
3.2.1	Verkalkung der Intima.....	28
3.2.2	Verkalkung der Media.....	30
3.3	Movat Auswertung	31
3.3.1	Chondro-osteogene Transformation in der Intima.....	32
3.3.2	Chondro-osteogene Transformation in der Media	34
4	Diskussion	36
4.1	Oxidativer Stress Modell	37
4.2	Degeneration kryopräservierter Prothesen	38
4.2.1	Inflammatorische Prozesse.....	38
4.2.2	Intima-Hyperplasie	39
4.2.3	Fortschreitende Kalkablagerungen in Prothesen der SOD3-defizienten Gruppe	40
4.2.4	Chondro-osteogene Transformation.....	40
4.3	Grenzen der vorliegenden Studie.....	41
4.4	Fazit und Ausblick.....	43
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	44

1 Einleitung

Herzklappenerkrankungen treten besonders häufig mit einer steigenden Prävalenz bei zunehmendem Alter auf (1,2). Hierbei ist die degenerative kalzifizierende Form der Aortenklappenstenose, Calcific Aortic Valve Disease (CAVD), die am häufigsten erworbene Herzklappenerkrankung. Die Vermutung steht, dass Aortenklappenstenosen ähnliche Risikofaktoren und inflammatorische Prozesse aufweisen, wie es bei der Atherosklerose der Gefäße der Fall ist. Der Goldstandard bei behandlungsbedürftigen Stenosen ist der operative Klappenersatz mit Entfernung der verkalkten Klappe und Implantation einer Klappenprothese (3–6).

Die Haltbarkeit der Herzklappenprothesen ist jedoch nicht lebenslang. Häufig führt kalzifizierende Degeneration im Laufe der Jahre zu einem Implantatversagen (7).

Zudem wurde festgestellt, dass oxidativer Stress in kalzifizierten Regionen stenotischer Herzklappen erhöht ist (8). Basierend auf bestehenden Forschungsergebnissen liegt die Vermutung nah, dass auch in der Degeneration von Herzklappenprothesen oxidativer Stress eine entscheidende Rolle spielen könnte.

1.1 Atherosklerose und weitere degenerative Faktoren

Atherosklerose ist die häufigste vaskuläre Erkrankung der mittleren und großen Arterien, wobei Nikotinabusus, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie zu den Hauptrisikofaktoren zählen (9). In der Frühphase der Atherosklerose spielt oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle. Lipide und Lipoproteine sammeln sich im subendothelialen Raum der Arterienwand an, werden durch ROS oxidiert und zählen daher zu den Auslösern in der Gefäß- und Klappenverkalkung (10). Zudem konnten oxidierte Lipideinlagerungen in kalzifizierten, stenotischen Herzklappen beobachtet werden (11,12). Maßgeblich verantwortlich für die hämodynamische Progression der Aortenklappenstenosen ist die Kalzifizierung (13). Hierbei sind inflammatorische Prozesse, voranschreitendes Alter, Urämie und oxidativer

Stress primäre degenerative Faktoren (11,13). Des Weiteren spielt die osteochondrogene Transformation eine wichtige Rolle in der vaskulären Verkalkung (13). Deskriptive Studien konnten eine Verbindung zwischen Aortenklappenverkalkungen und Zellveränderungen wie Expressionen von Osteoblasten, Zellproliferation und Atherosklerose aufweisen (11,14,15).

Zusammenfassend scheinen sowohl Lipidablagerungen als auch die Mineralisierung, bis hin zur chondro-osteogenen Transformation aktive Schlüsselrollen im Rahmen der kardiovaskulären Degeneration zu spielen (16).

1.2 Herzklappenprothesen und Prothesenversagen

Bei fortgeschrittenen Herzklappenerkrankungen ist in vielen Fällen ein Klappenersatz indiziert, wobei insbesondere ältere Patienten zunehmend von den Fortschritten in der kardiovaskulären Medizin profitieren (17). Biologische Klappenimplantate werden immer häufiger eingesetzt, da diese im Vergleich zu mechanischen Prothesen physiologischere Eigenschaften besitzen. Mechanische Klappenprothesen aus Carbon weisen zwar eine deutlich längere Haltbarkeit auf und es ist meist nur eine einzige Operation notwendig, allerdings sind die Patienten infolge dessen auf eine lebenslange strenge Antikoagulationstherapie angewiesen, welche wiederum mit schweren Nebenwirkungen verbunden ist (18).

Bei Patienten im Alter von über 60-65 Jahren wird meist ein biologischer Herzklappenersatz verwendet (4). Die häufigste Form hierbei sind Xenotransplantate, meist bovinen oder porcinen Ursprungs, die vor der Transplantation anti-degenerativ behandelt und in einer Polyestermanschette fixiert werden. Diese benötigen, im Gegensatz zu mechanischen Klappenprothesen, nur eine kurzzeitige oder gar keine Therapie mit Antikoagulantien und weisen hierbei deutlich physiologischere Eigenschaften als mechanische Klappenprothesen auf. Menschliche Allografts von verstorbenen Spendern erzielen gute langfristige Ergebnisse, da die Immunantwort des Empfängers geringer ausfällt als bei Xeno-Implantaten. Allerdings ist die Verfügbarkeit stark eingeschränkt, sodass diese Option nicht als

Standardverfahren betrachtet werden kann. Hierbei gilt ebenso nach Implantation eine kurze Antikoagulationstherapie. (18)

Eine lebenslange Haltbarkeit der verfügbaren biologischen Implantate ist nicht gewährleistet, da häufig immunologisch getriggerte kalzifizierende Degeneration zu einem Implantatversagen führt (7).

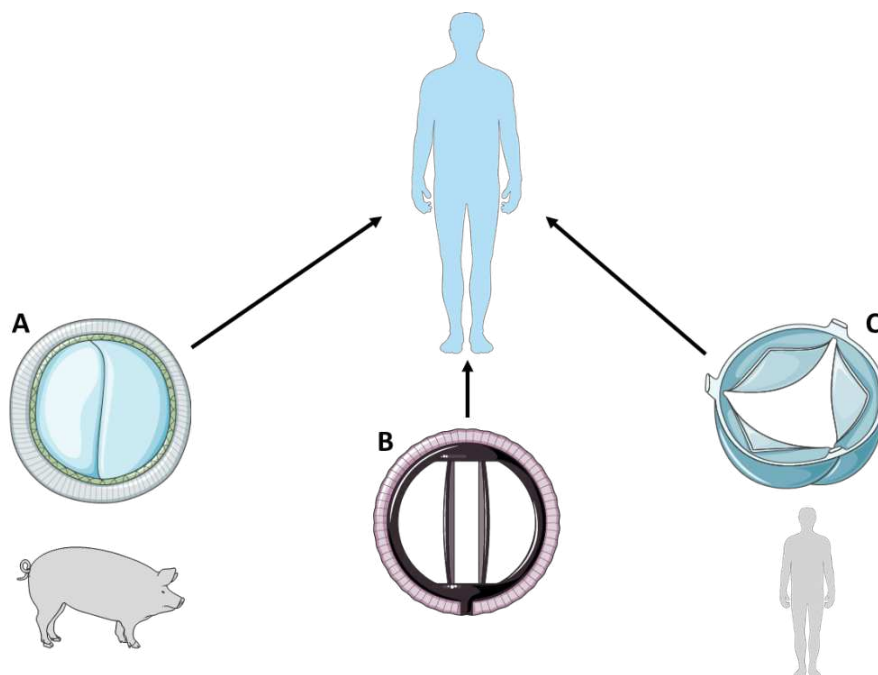


Abbildung 1.1 Die 3 gängigen Formen des Herzklappenersatzes. Xenograft porcinen Ursprungs (A), mechanische Herzklappe (B) und menschliche Allografts (C).

Die Mortalität nach Herzklappenersatz hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie z.B. der Erfahrung der Operateure, ein Klappenersatz zum wiederholten Male, ein einzelner oder mehrfacher Klappenersatz oder ein perioperativer Myokardschaden. Das Risiko einer frühen Mortalität ist darüber hinaus bei notfallmäßigen Operationen erhöht. Späte Todesursachen nach Implantation beruhen auf Arrhythmien, progredienter myokardialen Degeneration, fortgeschrittenem Alter oder Prothesen-Versagen. (19,20)

Eine wichtige Ursache des Prothesen-Versagens ist immunologischer Natur (21). Daher ist eine Vorbehandlung der Transplantate, zwecks Reduktion der Immunantwort des Empfängers, von Bedeutung, wobei eine Dezellularisierung – also die gezielte Entfernung aller zellulären Bestandteile der Prothese vor Implantation - inflammatorisch-degenerative Prozesse reduzieren kann. Dies ist dadurch begründet, dass sich die Immunantwort des Empfängers primär gegen zelluläre Proteine der Implantate richtet, und damit dezellularisierte

Gerüst-Implantate weniger Immunreaktion triggern (22–24). Dezellularisierte Herzklappenprothesen werden daher seit einigen Jahren intensiv experimentell und mittlerweile auch klinisch beforscht, da sie eine vielversprechende Option zur Optimierung der Haltbarkeit biologischer kardiovaskulärer Prothesen darstellen.

Sicher ist, dass Verkalkungen und oxidative Veränderungen mit einer progredienten Funktionsstörung der bioprothetischen Herzklappen verbunden sind (25,26).

1.3 oxidativer Stress, Rolle von SOD3

1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Zwischenprodukte von Sauerstoffmolekülen, die als sekundäre Botenstoffe innerhalb der Zellen fungieren. Erhöhte Konzentrationen und/oder unzureichender Abbau von ROS resultiert in oxidativem Stress (8), welcher zur Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und den daraus resultierenden Gefäßschäden gehört.(27,28)

Stickstoffmonoxid (NO) weist anti-inflammatorische, antikoagulative und vasodilatatorische Eigenschaften auf und gilt als wichtiger Regulator der Homöostase und Pathologie von Herzklappen (29,30). Sauerstoffradikale können hierbei durch Synthese zu einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit führen und dessen vasoprotektive Eigenschaften mindern. Das hieraus entstehende Peroxynitrit (Abbildung 1.2) wirkt zusätzlich gewebsschädigend und führt zu endothelialer und mitochondrialer Dysfunktion (27,28). Zudem konnte in Mäusen mit einem endothelialen NO-Mangel eine Aortenklappensklerose hervorgerufen werden (31), welche erneut auf die vasoprotektiven Eigenschaften schließen lässt.



Abbildung 1.2 Superoxid (O_2^-) reagiert mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit ($ONOO^-$).

1.3.2 Superoxiddismutase

Als größter Abwehrmechanismus von Sauerstoffradikalen und Peroxynitrit (ONOO-) zählen die Superoxiddismutasen (SOD). Diese katalysieren die Dismutation von Sauerstoffradikalen (O_2^-) in Sauerstoff (O_2) und in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Abbildung 1.3) (28). Dadurch erfolgt eine indirekte Hemmung der Reaktion von Superoxid und Stickstoffmonoxid (NO) zu dem gewebsschädigendem Peroxynitrit (Abbildung 1.2). Um eine übermäßige Bildung von Peroxynitrit zu verhindern, muss daher eine ausreichende Enzymaktivität der SOD vorhanden sein.

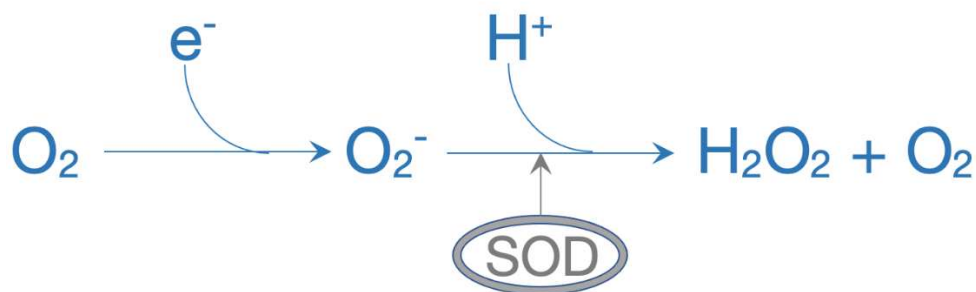


Abbildung 1.3 Superoxiddismutasen (SOD) bauen Superoxid (O_2^-) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2)

In Säugetieren bestehen 3 Isoformen der Superoxiddismutase. Die zytosolische SOD1 und die mitochondriale SOD2 als intrazelluläre Varianten, sowie SOD3 als extrazelluläre Kupfer-Zink-Isoform (29,32). Die SOD3 wird hauptsächlich von vaskulären Glattmuskelzellen und Fibroblasten produziert und bindet an die extrazelluläre Matrix und an endothelialen Zelloberfläche (28).

SOD3 zählt im kardiovaskulären System zur prädominanten Isoform, und erhöhte Konzentrationen verhindern den Abbau von NO durch Sauerstoffradikale (33). Dementsprechend ist die extrazelluläre Form ein wesentlicher bestimmender Faktor der NO-Bioverfügbarkeit und weist eine wichtige protektive Rolle in der Gefäßwand auf (34). SOD3 zeigt einen erheblichen Einfluss in einer Vielzahl an Pathologien, jeweils abhängig von oxidativem Stress, einschließlich arterieller Hypertension, Herzversagen, Ischämie-Reperfusionsschäden und Lungenschädigung (35–38).

Während die SOD3 in den meisten Geweben nur einen kleinen Anteil der gesamten SOD-Aktivität ausmacht, gelang es Stralin et al. eine außergewöhnlich große Menge an SOD3 in menschlichen Blutgefäßwänden darzustellen. (39)

1.4 Ziele der Arbeit

Zusammenfassend spielt SOD3 eine signifikante kardioprotektive Rolle als zentrales Enzym für den Abbau der ROS. Welche Stellung ROS im degenerativen Mechanismus von Herzklappenprothesen haben, wurde nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht untersucht. Eine reduzierte Aktivität von SOD3 spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von erhöhtem oxidativem Stress im kardiovaskulären System und kann daher möglicherweise zur Degeneration von kardiovaskulären Implantaten beitragen.

Vorausgehende Studien konnten eine verminderte SOD3-Aktivität in Ratten durch eine SOD3-E124D-Mutation verursachen. Hierbei konnte eine verstärkte endotheliale Dysfunktion in der Aorta (40), sowie eine verminderte Schutzwirkung gegenüber der Entwicklung von pulmonaler Hypertonie nachgewiesen werden (41). Zudem ist die Wahl der Alimentation entscheidend, da hierbei pathologische Stoffwechselzustände und die daraus resultierende Degeneration von kardiovaskulären Strukturen in Ratten induziert werden können (42).

Basierend darauf war es das Ziel der vorliegenden Studie, den Einfluss oxidativen Stresses durch ROS auf die Degeneration allogener kryopräservierter sowie dezellularisierter Aortenkonduits im heterotopen Transplantationsmodell in SOD3-defizienten Ratten zu untersuchen und so eine Plattform für anschließende Untersuchungen zu diesem Thema zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere, die im Rahmen dieser Dissertation benötigt wurden, entstammen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf und wurden unter Lizenz von Transposagen Biopharmaceuticals Inc. (Lexington, KY, USA) gezüchtet. Die Zucht, sowie sämtliche Tierversuche wurden durchgeführt unter geltender Tierschutz-Versuchstierverordnung und mit den Aktenzeichen 84-02.04.2015.A207 und 84-02.04.2016.A495 durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt.

Wistar-Ratten wurden als Spender für Prothesenallografts verwendet (43). Ratten mit einer *loss-of-function*-Mutation des Genes der extrazellulären Superoxiddismutase ($\text{SOD3}^{\text{E124D}}$)/(SS-Sod3m1Mcwi) wurden als Modellorganismus für oxidativen Stress verwendet. Diese Mutation beschränkt sich auf den Austausch einer Glutaminsäure durch eine Asparaginsäure im Codon 124. Hierdurch kommt es zu einer eingeschränkten Aktivität der extrazellulären SOD. Sowohl die SOD3-defizienten Ratten (Homo/ $\text{SOD3}^{\text{E124D}}$) als auch die SOD3-kompetenten Kontrolltiere (Wt), entstammen eines Dahl/SS-Stammes (SS/JrHsdMcwiCrl; Charles River Laboratories International Inc., Wilmington, MA, USA).

Zur Vermeidung von potenziellen protektiven Östrogen-abhängigen Effekten auf die Degeneration der Prothesen (44), wurden ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet.

Alle Versuchstiere erhielten salzarmes Spezialfutter (Diät AIN-76a; Ssniff, Soest, Deutschland), um die Belastung des kardiovaskulären und renalen Systems der Tiere zu mindern.

2.1.1 Spender Aortenprothesen Explantation

Die mikrochirurgische Vorgehensweise der Spenderprothesen Explantation verlief nach dem im Vorfeld publizierten Schema (43). Die Spenderratten wurden mit 2,0-2,5 % Isofluran euthanasiert und durch eine Zwei-

Höhlen-Eröffnung wurde das Herz samt thorakalen Aorta explantiert. Das explantierte Gewebe wurde mit PBS und 12,5 IU/mL Heparin gespült. Anschließend wurde unter dem Mikroskop ein U-förmiger Aortenkonduit samt Aortenklappenring und angrenzendem Myokard freipräpariert und in Natriumchlorid (NaCl) gespült (Abbildung 2.1-A). Die fertigen Aortenkonduiten wurden direkt im Anschluss zur Weiterverarbeitung detergenz-dezellularisiert (Abbildung 2.1) oder kryopräserviert.

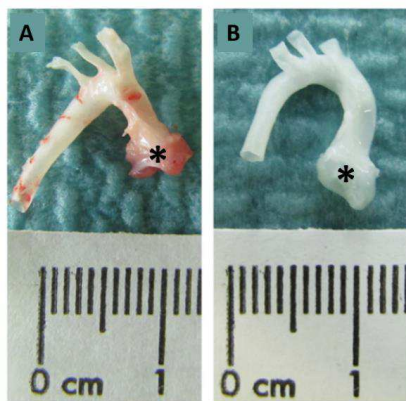


Abbildung 2.1 Aortenprothesen. Explantierte und präparierte native Aortenprothese (A) und detergenz-dezellularisierte Aorten Konduit (B) samt angrenzendem Myokard (schwarzes Sternchen). (modifiziert von Assmann et al. (43))

2.1.2 Detergenz-Dezellularisierung

Die Dezellularisierung erfolgte unter der Sterilbank. Pro Durchlauf wurden zwei Aorten Konduits von Spenderratten in je 12 mL Lösungen gelegt. Diese wurden innerhalb der ersten drei Tage abwechselnd durch vier je zwölfstündige Zyklen mit 0,5% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,5% Natriumdesoxycholat (DCA) und 0,05% Natriumazid (NaN₃) in destilliertem Wasser, sowie zwei Zyklen von jeweils zwei Stunden mit 1kU/mL DNase 1 in PBS gespült. Nach dem dritten Tag folgten vier Zyklen von jeweils 24 Stunden mit 1 % Penicillin/Streptomycin in PBS, sodass nach sieben Tagen die dezellularisierten Spenderprothesen implantiert werden konnten. Jeder Spülvorgang erfolgte auf dem Schüttler mit 220 U/min.

2.1.3 Kryopräservierung

Die Kryopräservierung erfolgte durch Duplecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 10% fetal calve serum (FCS) bei

4°C. Für eine 10 mL Lösung wurden 7 mL DMEM (4,5 g/mol), 1 mL DMSO und 2mL FCS vermischt. Die Aortenkonduits wurden nach Explantation mit Hilfe einer Propan-2-ol Box 1°C pro Minute auf -80°C heruntergekühlt und 4 Wochen lang gelagert. Vor Implantation wurden diese aufgetaut, fünfmal in 7 mL Jonosteril gespült, bis es nicht mehr schäumte und anschließend in 7 mL Jonosteril für die Implantation bereitgestellt.

2.1.4 Aortenprothesen-Implantation

Zwei Wochen vor der Aortenprothesen-Implantation wurde den Empfängerratten nach dem zuvor beschriebenen Verfahren (45) eine Aortenregurgitation (AR) zugeführt. Eine detaillierte Beschreibung des Verfahrens würde den Umfang dieser Dissertation sprengen. Letztlich wurde den Empfängertieren unter Vollnarkose ein Katheter (20 gauge) in die distale Carotis Arterie eingeführt. Durch die parallelaufende Echokardiographie konnte der Katheter durch ein Segel der Aortenklappe gedrückt werden und eine akute AR hervorrufen.

Mit Hilfe des schon publiziertem Verfahrens der Infrarenalen Aortenprothesen Implantation (43) wurden vorgefertigte detergenz-dezellularisierte als auch die kryopräservierten Aortenprothesen implantiert. Hierbei wurden die Empfängerratten mit Isofluran betäubt und anschließend über eine Inhalationsmaske mit 2,0-2,5% Isofluran in Sauerstoff beibehalten. Eine mediane Laparotomie eröffnete den Weg zur infrarenalen Aorta, sodass die vorbehandelten Konduiten durch End-zu-Seit-Anastomose an die infrarenale Aorta angenäht wurden. Die native Aorta zwischen den Anastomosen wurde abgebunden, damit eine ausreichende Implantatdurchblutung gewährleistet werden konnte (Abbildung 2.2).

Sowohl die SOD3-defizienten Ratten (Homo/SOD3^{E124D}) als auch die SOD3-kompetenten Wildtyp Dahl/SS-Kontrolltiere (Wt) erhielten entweder detergenz-dezellularisierte (dezell) oder kryopräservierte (kryo) Allografts der Aorta samt Aortenklappe.

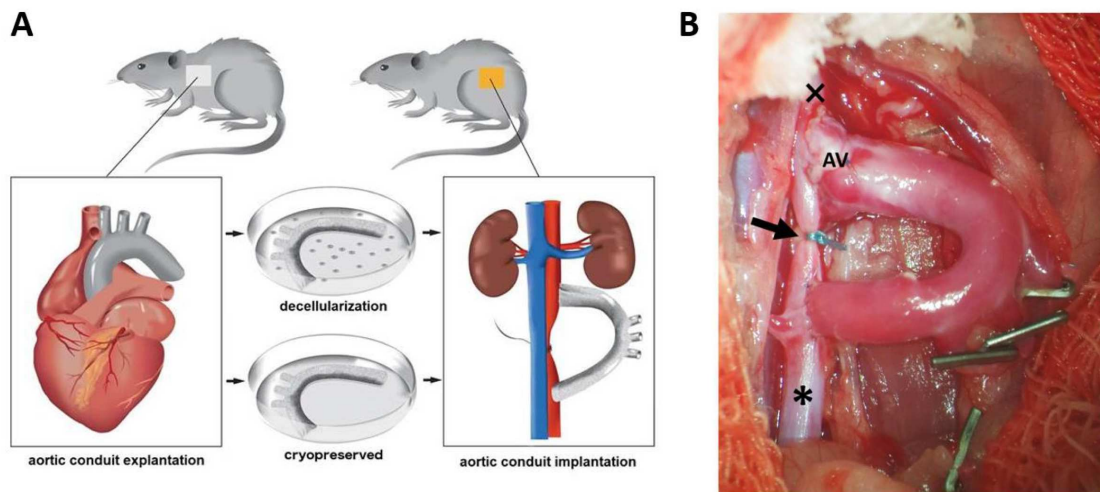


Abbildung 2.2 Implantation der Aortenprothesen. Empfängerratten erhielten entweder detergenz-dezellularisierte oder kryopräservierte Allografts von Spenderratten (A). U-förmige Aortenprothesen wurden mit einer End-zu-Seit-Anastomose an die Infrarenale Aorta mit der Aortenklappe in proximaler Position angebracht (B). Die Aortensektion zwischen der Anastomose wurde ligiert (schwarzer Pfeil). Das schwarze X weist auf den kranialen Teil der Infrarenalen Aorta, das schwarze Sternchen zeigt den kaudalen Teil. (modifiziert nach Assmann et al. (43))

2.2 Materialentnahme

2.2.1 Probenexplantation

Nach 4 oder 12 Wochen erfolgte eine Doppler-Sonografie um eine regelrechte Durchblutung sowie Klappenmotailität der Prothesen sicherzustellen. Darauffolgend wurden die Aortenprothesen sowie die native thorakale Aorta nach 4 oder 12 Wochen in vivo explantiert und in 4 Regionen zur histologischen Auswertung aufgeteilt (Abbildung 2.3).

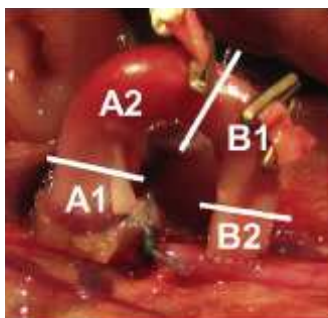


Abbildung 2.3 Aufteilung der Aortenprothesen. A1 - proximale Anastomose samt Aortenklappe, A2 - Aorta ascendens, B1 - Aorta descendens und B2 - distale Anastomose (modifiziert nach Assmann et al. (46))

Zur Messung der totalen SOD-Aktivität wurde zudem intraoperativ Blut von der Vena Cava inferior entnommen. Die Präparate zur molekularbiologischen Auswertung wurden im Ganzen in Mikroreaktionsgefäße gegeben.

2.2.2 Einbettung

Vier Einbettschälchen wurden mit Kryo-Compound gefüllt und die zuvor geteilten 4 Sektionen wurden jeweils in ein Schälchen eingelegt. Ca. 100mL Isopentan wurden in ein Becherglas gefüllt und der gefüllte Becher wurde anschließend für ca. 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff gehalten. Darauffolgend wurden die Einbettschälchen einzeln in das Isopentan hineingelegt, bis diese vollständig eingefroren sind. Die jeweiligen Einbettschälchen wurden daraufhin bei -20°C gelagert und innerhalb von wenigen Tagen zur histologischen Auswertung weiterverwendet.

2.3 Histologische Auswertung

Zur histologischen Auswertung wurden insgesamt 38 Aortenprothesen untersucht. Hierbei wurden 18 detergenz-dezellularisierte Prothesen 20 kryopräservierte Aortenprothesen nach 4 bzw. 12 Wochen in vivo explantiert (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1 Versuchstiergruppen der vorliegenden Studie bezogen auf die Tiere, welche für die histologische Auswertungen verwendet wurden. Detergenz-dezellularisierte (dezell) und kryopräservierte (kryo) Aorten Allografts wurden in SOD3-defiziente (Homo/SOD3^{E124D}) oder Wildtyp (Wt) Ratten implantiert. Die Versuchstiere wurden für 4 oder 12 Wochen nach Implantation gehalten.

Versuchs- gruppe	Explantations- Zeitpunkt (Wochen)	Versuchsbedingung Konduit Typ (Anzahl der Versuchstiere)		Empfängerratte (Genotyp)
		dezell	kryo	
Wt 4	4	5	5	Wt
Wt 12	12	5	5	Wt
Homo 4	4	5	5	SOD3-E124D
Homo 12	12	3	5	SOD3-E124D

2.3.1 Kryotomie

Die im Kryo-Compound eingebetteten Aortenprothesen wurden in jeder der 4 Sektionen (proximale Anastomose samt Aortenklappe (A1), Aorta ascendens (A2), Aorta descendens (B1) und distale Anastomose (B2)) 5 µm dünn geschnitten. Es erfolgten je zwei Kryostatschnitte pro Objektträger auf insgesamt 15 Objektträgern je Sektion. Es wurde darauf geachtet, einheitliche

Schnittebenen in den jeweiligen Sektionen zu treffen. Im Anschluss wurden die einzelnen Objektträger in einer -20°C Kühltruhe eingelagert und zeitnah für die jeweiligen histologischen Färbungen verwendet.

2.3.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung hilft, verschiedene Gewebestrukturen als schnelle Übersichtsfärbung darzustellen. Alle basischen Strukturen, wie Zellplasmaproteine und Kollagene, werden durch Eosin rot gefärbt, alle sauren Strukturen, wie die DNA im Zellkern, werden durch Hämalun blau.

Die Kryoschnitte wurden für je eine Minute in Hämatoxylin, anschließend destilliertes Wasser (Aqua dest), sowie 4-5% Essigsäure und erneut Aqua dest eingetaucht. Nach weiteren zwei Minuten unter fließendem Leitungswasser, folgte eine Minute in 70% Ethanol und zwölf Minuten in Eosin. Die Färbung wurde darauffolgend in aufsteigender Ethanolreihe eine Minute in 70%, zweimal eine Minute in 96% und zweimal eine Minute in 100% entwässert. Abschließend wurden die Schnitte zweimal je eine Minute in Xylol getaucht. Nach der Lufttrocknung wurden die gefärbten Aortenschnitte mit Leica eingedeckt.

2.3.3 Von Kossa Färbung

Die Von Kossa Färbung dient als Nachweis von Calciumablagerungen in Geweben wie z.B. der Aorta. Um einen erfolgreichen Färbedurchgang sicherzustellen, wurde stets eine nachgewiesene verkalkte Aortenprobe als Positivkontrolle mitgeführt.

Zunächst wurden die Schnitte bei -20°C für acht Minuten in Aceton gelegt. Nach anschließender fünf-minütiger Lufttrocknung wurden die Objektträger kurz in Aqua dest getaucht und in 5% Silbernitratlösung unter einer Neonröhre abgestellt. Während des Färbevorgangs wird das Calcium im Gewebe reduziert und durch Silberablagerungen ersetzt. Nach 60 Minuten wurden die Schnitte in drei Zyklen von je drei Minuten mit Aqua dest gespült. Durch eine anschließende zwei-minütige Reduktion in Natriumkarbonat-Formaldehydlösung, wird das Silber in Form von schwarzbraunen Ablagerungen sichtbar. Daraufhin folgten zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser, fünf Minuten in 5%

Natriumthiosulfatlösung, um überschüssiges Silber zu entfernen, und weitere 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Nach drei Minuten in Aqua bidest, wurden zur Darstellung der Zellkerne die Schnitte zehn Minuten lang in Kernechtrot-Aluminiumsulfat getaucht. Das überschüssige Kernechtrot wurde nach erneuten drei Minuten Aqua dest rausgespült und es folgte eine Entwässerung der Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe in je zwei Minuten 50%, 70%, 80% und 100% Ethanol. Zuletzt wurden die Schnitte zweimal für je fünf Minuten in Xylol getaucht und nach Lufttrocknung mit dem Leica Eindeckmedium eingedeckt.

2.3.4 Movat Pentachrom Färbung

Die Movat Pentachrom Färbung wird genutzt, um alle Komponenten des Gewebes in einer Übersichtsfärbung darzustellen. Zudem lässt sich diese auch gut als Knorpelfärbung zum Vorweisen von Proteo-/Glykosaminoglykanen nutzen.

Vor dem Färbegang wurden die Objektträger über Nacht im Inkubator auf 37°C erwärmt. Am nächsten Tag startete die Färbung zunächst mit fünf Minuten Aqua dest, zehn Minuten 4% Formalinlösung zur Fixierung und erneut fünf Minuten Aqua dest. Nach zehn Minuten in auf ca. 50°C erhitzter Bouin's Lösung wurden die Schnitte zehn Minuten unter fließendem, kaltem Leitungswasser abgespült. Es folgten fünf Minuten in 5%igem Natriumthiosulfat und eine mehrfache Spülung mit frischem destilliertem Wasser für zweimal zwei Minuten und eine Minute. Als nächstes wurden mit 1% Alcianblau für 20 Minuten die Muzine und Glykosaminoglykane gefärbt. Der Überschuss wurde mit fließendem Leitungswasser für dreieinhalb Minuten weggespült. Zur Stabilisierung folgten zehn Minuten in auf 60°C erhitztem alkalischen Alkohol und erneute dreieinhalb Minuten unter fließend Wasser. Die Schnitte wurden danach zur Färbung der Zellkerne und elastischen Fasern für neun Minuten in die frisch angesetzte Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung eingelegt. Nach einem weiterer Spülvorgang mit einer Minute unter fließendem Wasser, zweimal zwei Minuten und eine weitere Minute in je frischen Schälchen mit Aqua dest, folgte eine Minute in Brilliant-Crocein-Säurefuchsin. Hierbei färbten sich die Muskulatur und

das Fibrin sowie Fibrinoid. Anschließend wurde wieder mit zweimal zwei Minuten und eine Minute frischem destillierten Wasser gespült. Es folgten zwei fünf-Minuten-Durchläufe zuerst mit 5% Phosphorwolframsäure und darauffolgend mit 1%iger Essigsäure. Im Anschluss wurden die Schnitte wieder mehrfach gespült mit zweimal zwei Minuten und einer weiteren Minuten, jeweils mit Aqua dest. Nachfolgend wurde mit einer Minute 96%igem Ethanol und zweimal einer Minute 100%igem Ethanol entwässert. Die letzte Färbung erfolgte durch acht Minuten in alkoholischem Safran. Zwei weitere einminütige Entwässerungen in 100%igem Ethanol und dreimal fünf Minuten in Xylol zur Entfettung schlossen den Färbeprozess ab. Nach einer kurzen Lufttrocknung wurden die gefärbten Objektträger mit dem Leica Eindeckmedium eingedeckt.

2.3.5 Erstellung der Mosaik

Zu Übersichts- und Auswertungszwecken wurden sämtliche gefärbten Schnitte unter einem Lichtmikroskop in hoher Auflösung mit 10-facher Vergrößerung ab fotografiert und zu Mosaiken zusammengestellt. Hierzu wurde ein Plugin von ImageJ verwendet (Abbildung 2.4 - A). Je nach Größe des Schnittes wurden hierbei zwischen 10 und 27 Einzelbilder automatisiert zu einem großen Bild zusammengefügt (Abbildung 2.4 - B).

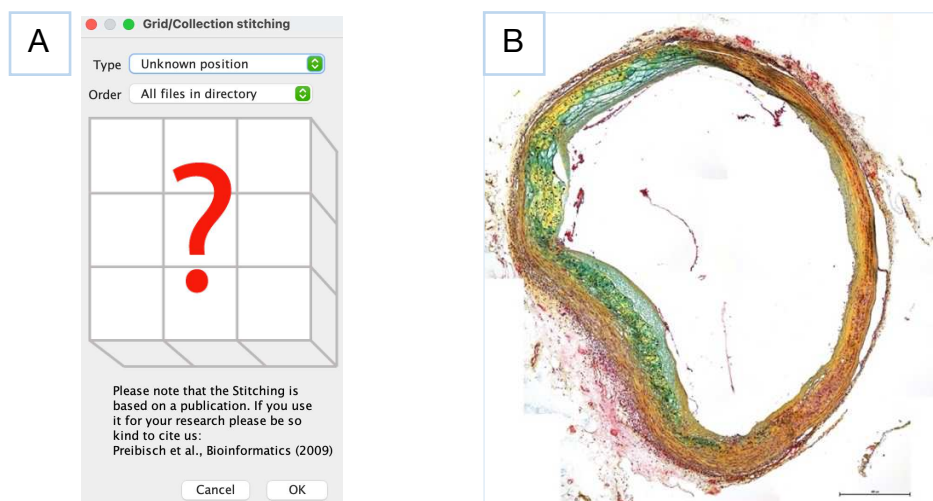


Abbildung 2.4 Erstellung eines Mosaiks. Stitching Plugin von ImageJ (A) durch die Auswahl der unbekannten Reihenfolge der Bilder. Die Bilder wurden danach vom Programm automatisch zusammengefügt und zeigten in einem großen Mosaik die Übersicht des jeweiligen Aortenschnitts (B)

2.3.6 Intima/Media-Ratio

Um eine Intimahyperplasie oder eine Bildung von Neointima darzustellen, wurde bei den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten die Intima vermessen. Mittels der Software Image J konnte jeder Aortenschnitt an acht Stellen ausgemessen werden (Abbildung 2.5). Im Anschluss wurde ein Mittelwert je Aortenschnitt aus den acht Media-Messwerten berechnet, um einen repräsentativen Wert zur Media-Dicke des jeweiligen Aortenabschnitts zu verwenden. Jeder gemessene Intima-Wert wurde durch den Mittelwert des Media-Durchmessers der dazugehörigen Aorta dividiert. Dadurch ergaben sich wiederum je Schnitt acht Intima/Media-Ratio Werte, aus welchen ein weiterer Mittelwert gezogen wurde. Diese Werte wurden dann zur statistischen Auswertung verwendet. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein Intima/Media-Ratio-Mittelwert je Region (A1, A2, B1, B2) je Aortenprothese erstellt wurde.

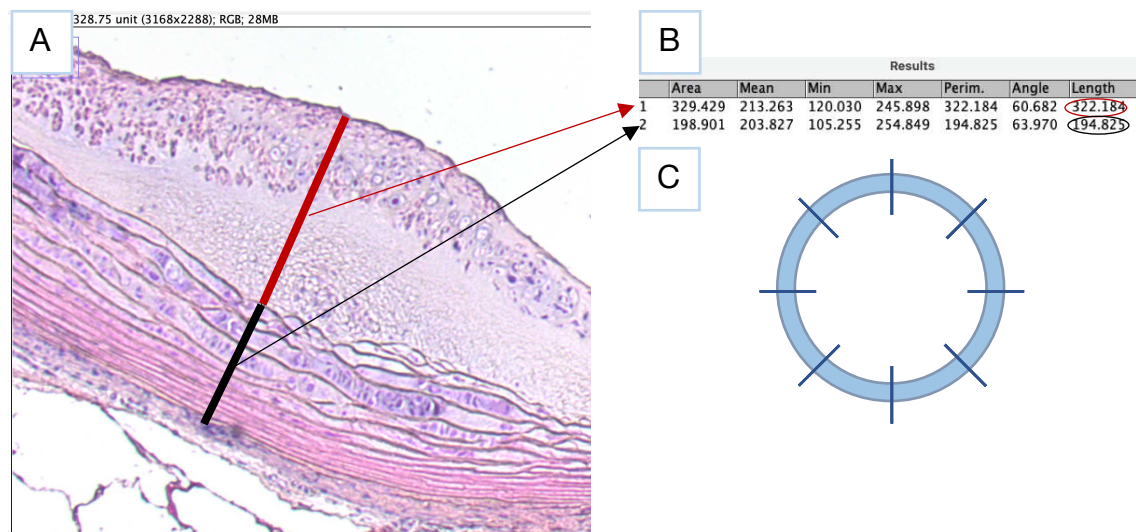


Abbildung 2.5 Anwendung der Image J Software. Messung der Intima (roter Balken) und Media (schwarzer Balken) (A) sowie die dazugehörigen Werte (B). In diesem Beispiel wurde eine Intima von 322,184 μm (rot umrandet) und Media von 194,82 μm (schwarz umrandet) gemessen (B). Aufteilung der 8 Messpunkte je Aortenregion (C).

2.3.7 Kalzifizierungs-Score

Jedes Mosaik eines Aortenschnittes wurde aufgeteilt in 8 gleichmäßige Sektionen (Abbildung 2.5-C), die einzeln bewertet wurden. Hierbei erhielt jede Sektion eine Bewertung von 0 bis 5 (Abbildung 2.6).

- 0 entspricht keiner sichtbaren Verkalkung.
- 1 entspricht einer Mikrokalzifizierung.
Hierbei wurden kleinste Verkalkungen im Gewebe gewertet.
- 2 entspricht einer Makrokalzifizierung,
die in unter 25 % der Intima bzw. Media Fläche zu sehen ist.
- 3 entspricht einer Makrokalzifizierung
zwischen 25 bis 50 % der Intima bzw. Media Fläche.
- 4 entspricht einer Makrokalzifizierung
zwischen 51 bis 75 % der Intima bzw. Media Fläche
- 5 entspricht einer Makrokalzifizierung
von über 75 % der Intima bzw. Media Fläche

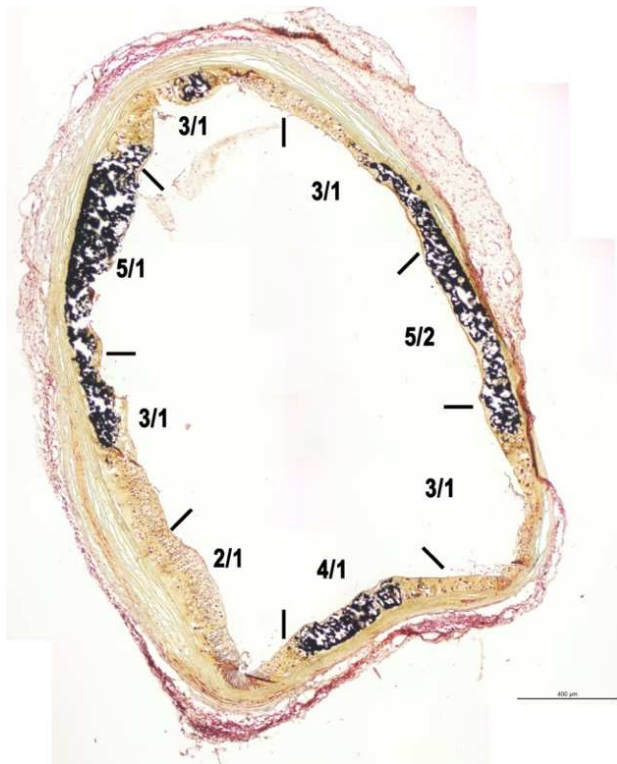


Abbildung 2.6 Überblick Kalzifizierungs-Score. Intima/Media. Der erste Wert je Sektion entspricht der Bewertung der Intima. Der zweite Wert hinter dem Schrägstrich entspricht der Bewertung der Media.

Sowohl für die Intima als auch für die Media, fand eine Einzelbewertung statt. Aus den hieraus resultierenden 8 Bewertungspunkten je Aortensektion wurde ein Mittelwert gezogen, welcher repräsentativ für die jeweilige Aortensektion für die statistische Auswertung verwendet wurde.

2.3.8 Movat-Score

Ähnlich wie beim Kalzifizierungs-Score (2.3.7) wurde jeder Aortenschnitt aufgeteilt in 8 gleichmäßige Sektionen, die einzeln bewertet wurden. Hierbei erhielt jede Sektion eine Bewertung von 0 bis 5.

- 0 entspricht keinem sichtbaren chondroosteogenen Transformation.
- 1 weist kleinste chondroosteogene Veränderungen auf.
- 2 entspricht einem chondroosteogenen Transformation der in unter 25 % der Intima bzw. Media Fläche zu sehen ist.
- 3 entspricht einem chondroosteogenen Transformation zwischen 25 bis 50 % der Intima bzw. Media Fläche.
- 4 entspricht einem chondroosteogenen Transformation zwischen 51 bis 75 % der Intima bzw. Media Fläche
- 5 entspricht einem chondroosteogenen Transformation von über 75 % der Intima bzw. Media Fläche

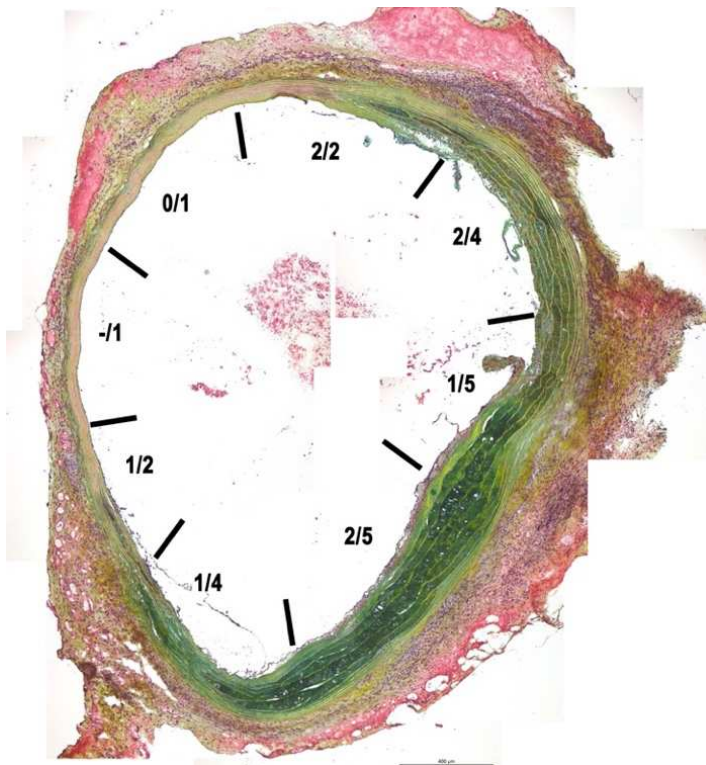


Abbildung 2.7 Beispiel der Bewertung des chondro-osteogener Transformation. Der erste Wert je Sektion entspricht der Bewertung der Intima. Der zweite Wert hinter dem Schrägstrich entspricht der Bewertung der Media. In vereinzelten Fällen einer nicht vorhandenen Intima erfolgte keine Bewertung (-).

Infolgedessen wurden erneut die Intima, als auch die Media einzeln bewertet. Dies folgte dem gleichen Schema wie im vorangegangenen Kalzifizierungs-Score. Die daraus resultierenden 8 Bewertungspunkte je Aortensektion ergaben einen Mittelwert, welcher für die weitere statistische Auswertung verwendet wurde.

2.4 Statistische Methoden

In der hier vorliegenden Dissertation werden die Daten durch Median und Interquartilsabstand (IQR) dargestellt. Nach der Prüfung auf Normalität (D'Agostino-Pearson-Test) erfolgte die statistische Auswertung mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests bzw. des zweiseitigen t-Tests. Gruppenvergleiche im Zeitverlauf wurden durch zweifaktorielle Varianzanalysen ausgewertet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$)

Alle statistischen Analysen wurden mit Prism 9 Version 9.5.0 (525) für macOS (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

2.5 Verwendete Materialien

2.5.1 Materialliste

Material	Hersteller	Kat. nummer
Aceton	Merck KGaA	67-64-1
Alcianblau	Sigma-Aldrich	A5268-25G
Ammoniumhydroxid 30%	Roth	CP17.1
Brilliant Crocein R	Waldeck	1B-109
Deckgläser 24*60mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik Gmbh	k12460
Deoxyribonuclease I from bovine pancrease	Sigma-Aldrich	9003-98-9
Einbetttschälchen, Cryomold, 10*10*5mm	Sakura Finetek USA, Biosystems Switzerland AG	81-0781-00
Eindeckmedium Leica	Leica	14070936261
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich	236489-100G
Eosin	Sigma-Aldrich	861006
Essigsäure	Roth	6755.2
Essigsäure 100%	Roth	6755.2
Ethanol 70%, 96%, 100%	Zentralapotheke UKD	
Formaldehydlösung 37%	Roth	4979.1
Hämatoxylin	Thermo	6765009
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	H3136
HCl 32-37%	Roth	2601.1
Jod	Roth	7935.1
Kaliumjodid	Roth	8491.1
KP-CryoCompound	Klinipath	VWRK1620-C
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich	72049-250G
Objektträger 25*75*1,0 mm	R. Langenbrinck	03-0060
Phosphotungstic Acid	Sigma-Aldrich	P4006-250G
Pikrinsäure	VWR Chemicals	84512.260
Safran du Garinai	Waldeck	5A-394
Säurefuchsin	Roth	T128.1
Sodium dodecyl sulfate	Roth	0183.3
Xylol (Xylene)	VWR	28975.325

Silbernitrat	Roth	93370.1
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich	72049-250G
Natriumcarbonat	Merck KGaA	1.06392.1000
Kernechtrot	Roth	N069.1
Demi-Wasser	Otto Fischar GmbH & Co. KG	PZN 04914151
Cryovials	Biozym Scientific GmbH	710522
Cellstar Tubes	Greiner bio-one	188271
Scalpel No.10	Pfm medical	21080007

2.5.2 Software

Programm	Version	
ImageJ2	2.3.0/1.53f	© 2010-2022
GraphPad Prism	9.3.1 (350)	1994-2021 GraphPad Software, LLC.
Microsoft Excel	16.58 (22021501)	© 2022 Microsoft
Microsoft Word	16.58 (22021501)	© 2022 Microsoft
Leica Fotosoftware	3.7.4.23463	© 2020 Leica Microsystems CMS GmbH
Mendeley Desktop	1.19.8	© 2008-2020 Mendeley Ltd.
Adobe Photoshop cc	19.1.5	© 1990-2018 Adobe Systems Inc.

2.5.3 Geräteliste

Gerät	Version	Bezugsquelle
Kaltlichtquelle/Neonröhre	11W/827	Osram Dulux S
Kryotom	Leica CM 1950	Leica
Kühlschrank		Liebherr Profiline
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph
Mikroskop	Leica DM2000 LED	Leica
Mikroskop mit Digitalkamera	Leica DFC7000 T	Leica
Reagenzglasschüttler	RS-TR05	Phoenix Instrument
Tiefkühltruhe (-20°C)	ARCTIS LowFrost	AEG
Tiefkühltruhe (-80°C)		Thermo Scientific
Abzug	maxxima	wrt – Laborbau GmbH & Co. KG
Inkubator (37°C)	HERAcell 240i	Thermo Scientific
Trockenschrank (60°C)	B 6030	Heraeus

Waage	BP 110 S	sartorius
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Sigma Laborzentrifugen GmbH
Pürierstab	Art-Miccra D-8	Art Labortechnik
Sterilbank	HERAsafe KS	Thermo Scientific
Cryo-Einfriergerät	NU200	Thermo Scientific

2.6 Tierversuchsgenehmigung

Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem nationalen Tierschutzgesetz durchgeführt und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt.

AZ-84.02.04.2015.A207; Genehmigung erteilt am 06.08.2015

Zudem wurde vom Promovenden ein tierversuchskundlicher Kurs an der ZETT des Universitätsklinikums Düsseldorf absolviert.

3 Ergebnisse

3.1 Intimahyperplasie und Intima/Media-Ratio

Sämtliche kryopräservierten Aortenprothesen zeigten eine Hyperplasie der Intima innerhalb von 4 und 12 Wochen. (Abbildung 3.1)

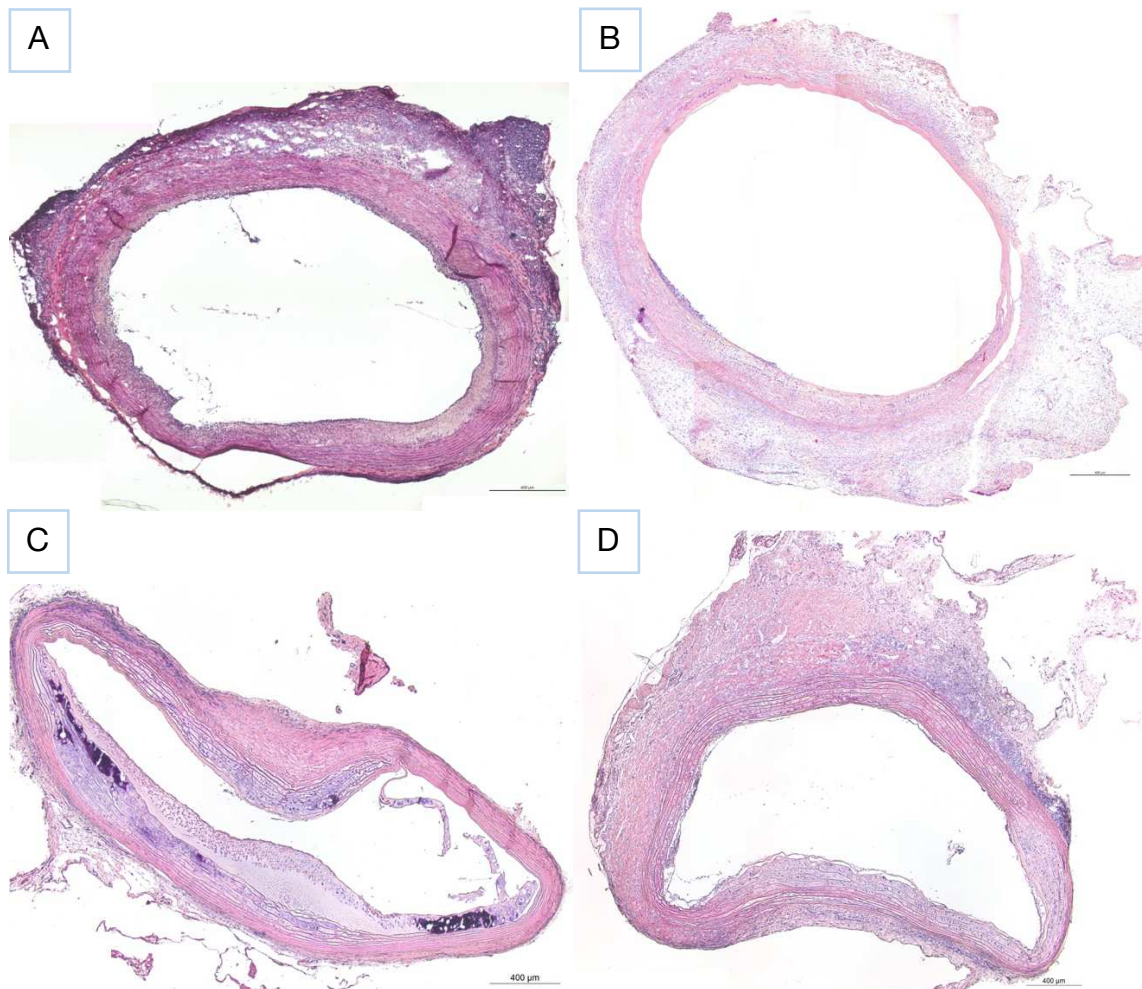


Abbildung 3.1 Intima-Hyperplasie kryopräservierter Aortenprothesen. Beispielhafte Bilder hyperplastischer Intima-Formation nach 4 Wochen (A, B) und 12 Wochen (C, D) nach Implantation in SOD-3-defizienten Ratten (A, C) oder Ratten der Kontrollgruppe (B, D).

Die durchschnittliche Intimadicke der kryopräservierten Aortenprothesen in der SOD3-defizienten-Gruppe zeigte sich signifikant erhöht (nach 4 Wochen: 25,8 µm [IQR 13,3 – 86,0 µm] vs. 28,0 µm [IQR 11,0 – 50,1 µm] in der Kontrollgruppe, nach 12 Wochen: 40,6 µm [IQR 16,2 – 75,1 µm] vs. 30,6 µm [IQR 14,5 – 57,1 µm] in der Kontroll-Gruppe, $p = 0,0979$ „Gruppe“ als Variationsquelle).

Die Intimahyperplasie in den Detergens-dezellularisierten Prothesen war generell schwächer ausgeprägt und wies keine Gruppenunterschiede auf. (Abbildung 3.2)

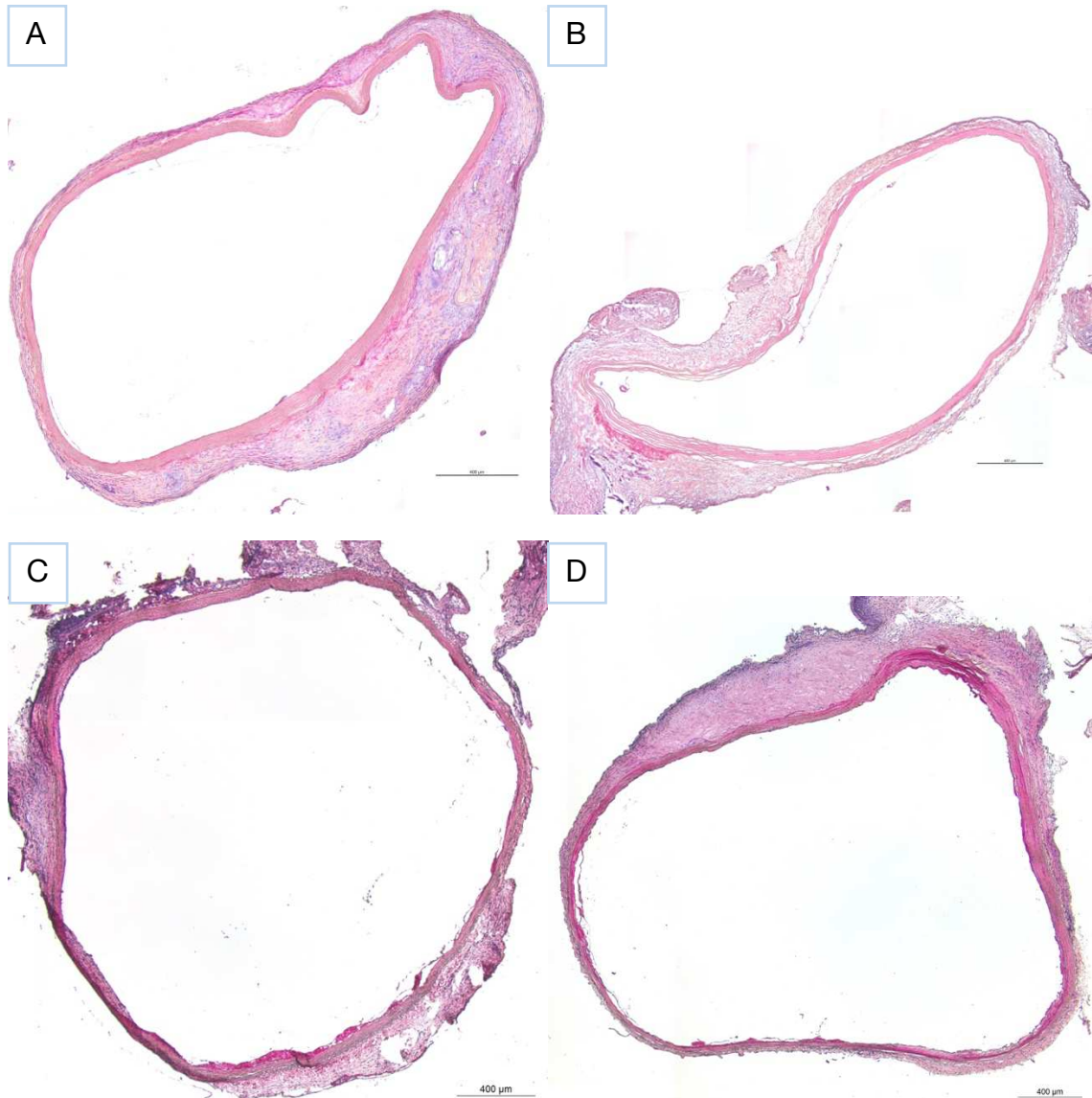


Abbildung 3.2 Detergenz-dezellularisierte Aortenprothesen ohne nennenswerte Intima-Formationen. Beispielhafte Bilder nach 4 Wochen (A, B) und 12 Wochen (C, D) nach Implantation in SOD-3-defizienten Ratten (A, C) oder Ratten der Kontrollgruppe (B, D)

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in kryopräservierten Aortenprothesen zwischen der SOD3-defizienten-Gruppe und der Kontrollgruppe in der Intima/Media-Ratio zu den Beobachtungszeiträumen von 4 und 12 Wochen. (Abbildung 3.3)

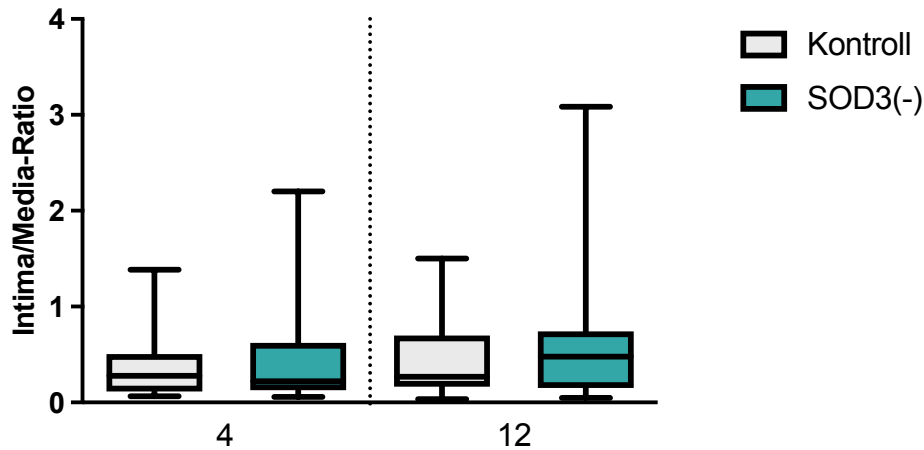


Abbildung 3.3 Quantifikation der Intimahyperplasie in kryopräservierten Aortenprothesen der Kontroll- und SOD3-defizienten-Tiergruppe zu den Zeitpunkten 4 und 12 Wochen. Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt. * $p \leq 0,05$

Innerhalb der SOD3-defizienten-Gruppe zeigte sich eine Tendenz zur Intimahyperplasie im verlängerten Zeitraum, es konnte jedoch kein signifikanter Anstieg festgestellt werden. (Abbildung 3.4)

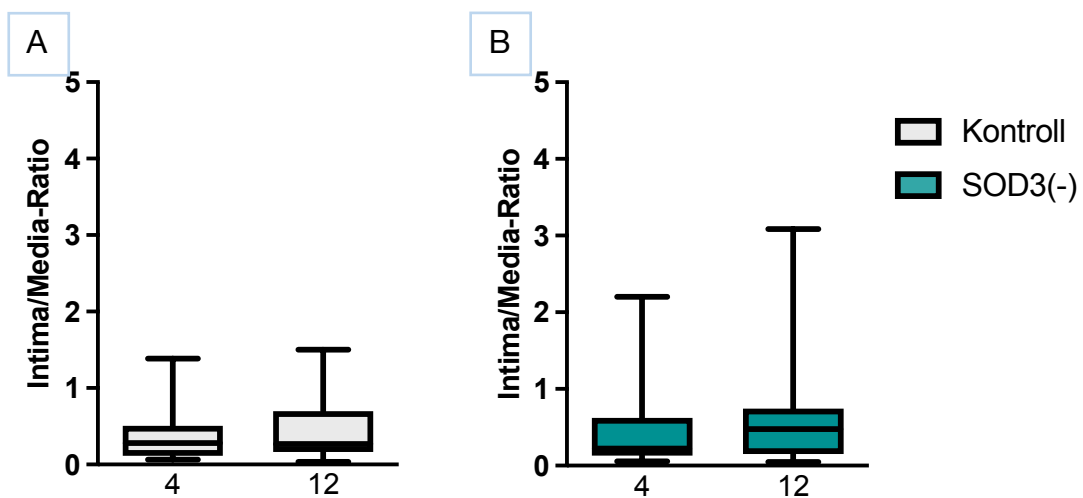


Abbildung 3.4 Vergleich der Intimahyperplasie kryopräservierter Aortenprothesen innerhalb der Kontroll-Gruppe (A) bzw. SOD3-defizienten-Gruppe (B). Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt.

3.2 Von Kossa Auswertung

Nach 4 und 12 Wochen *in vivo* zeigte die Von Kossa Färbung Mikrokalzifizierungen in nahezu allen Transplantaten. Insbesondere in den kryopräservierten Aortenprothesen traten zudem Makrokalzifizierungen häufiger auf. (Abbildung 3.5)

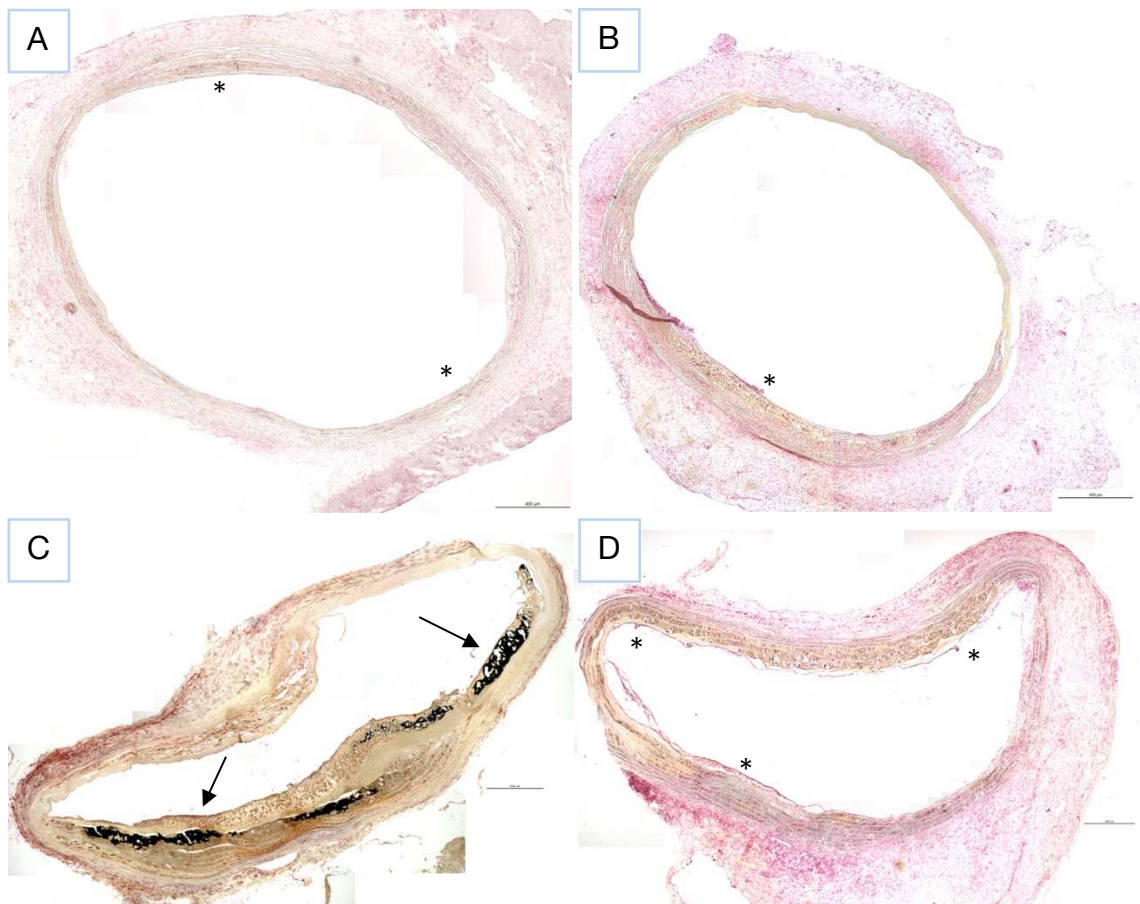


Abbildung 3.5 Hydroxylapatit-Ablagerungen kryopräservierter Aortenprothesen. Beispielhafte Bilder des Verkalkungsgrades nach 4 Wochen (A, B) und 12 Wochen (C, D) nach Implantation in SOD-3-defizienten Ratten (A, C) oder Ratten der Kontrollgruppe (B, D). Mikrokalzifizierungen (*). Makrokalzifizierungen (Pfeile).

Auch hier fiel die Degeneration in detergent-dezellularisierten Prothesen wiederum deutlich schwächer aus und wies vereinzelt Mikrokalzifizierungen auf. Eine ausgeprägtere Kalkablagerung im Sinne von Makrokalzifizierungen war nicht zu beobachten. (Abbildung 3.6)

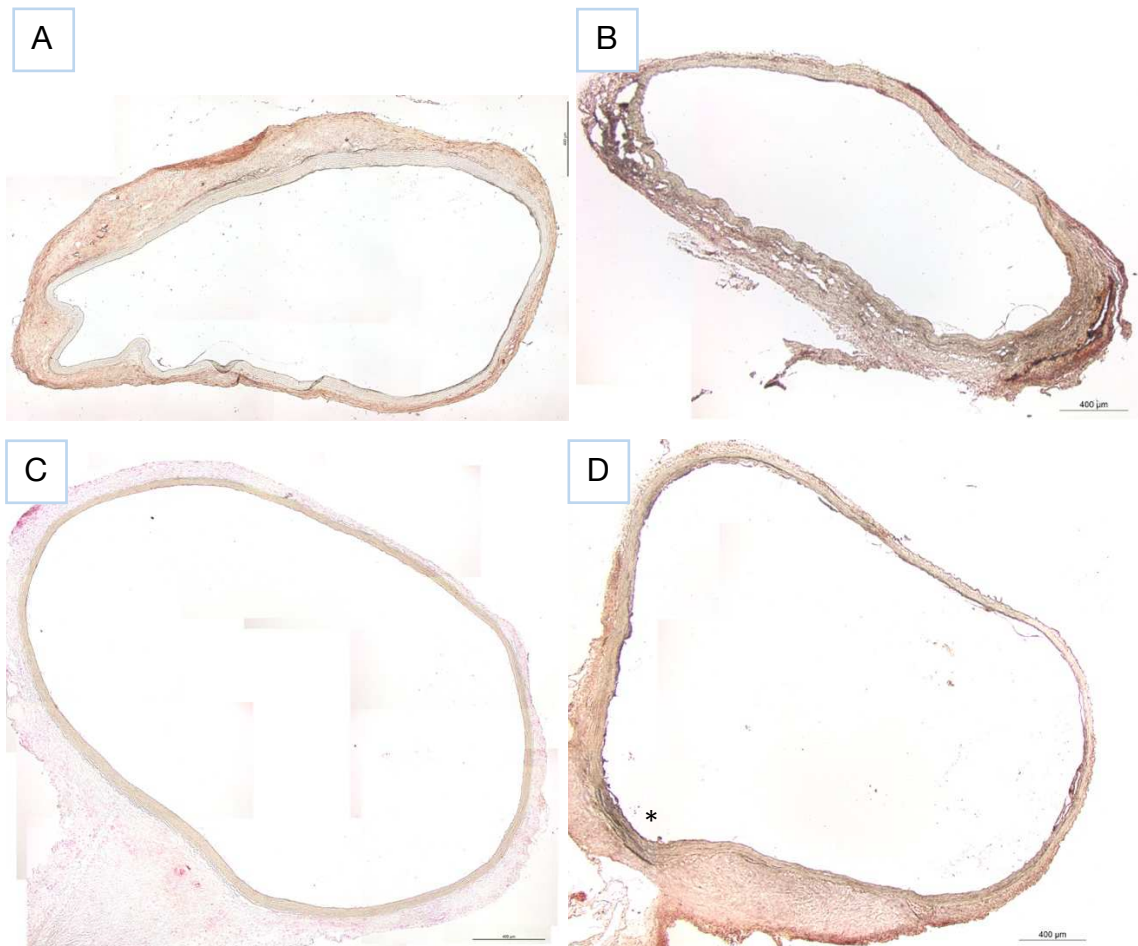


Abbildung 3.6 Kalkablagerung detergent-dezellularisierter Aortenprothesen. Beispielhafte Bilder der histologischen Untersuchung der Verkalkung nach 4 Wochen (A, B) und 12 Wochen (C, D) nach Implantation in SOD-3-defizienten Ratten (A, C) oder Ratten der Kontrollgruppe (B, D). Mikrokalzifizierungen (*).

Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich daher ausschließlich auf die Degeneration kryopräservierter Aortenprothesen durch Hydroxylapatit-Ablagerungen.

3.2.1 Verkalkung der Intima

Bei der Auswertung der Degeneration durch Kalzifizierung in der Intima der implantierten Prothesen kam es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen der SOD3-defizienten und der Kontrollgruppe. Es zeigte sich dabei ein ähnlicher Verkalkungsgrad zu den jeweiligen Explantationszeitpunkten (4 Wochen: $p=0,5131$; 12 Wochen: $p=0,6053$). (Abbildung 3.7)

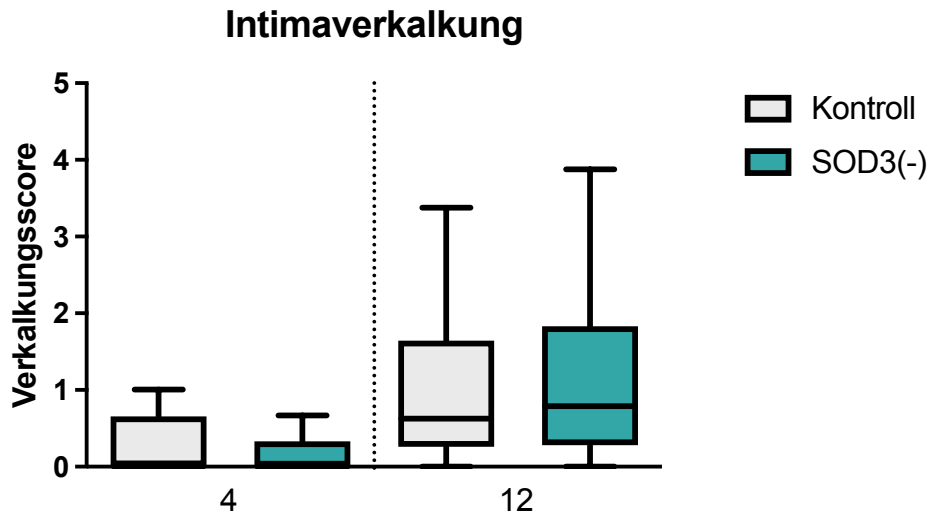


Abbildung 3.7 Bewertung der Hydroxylapatit-Ablagerungen in kryopräservierten Aortenprothesen der Kontroll- und SOD3-defizienten-Tiergruppe zu den Zeitpunkten 4 und 12 Wochen. Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt.

Bei der Bewertung der Hydroxylapatit-Ablagerungen innerhalb der Kontroll-Gruppe, zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten. ($p=0,0125$ bei 4 vs. 12 Wochen). Eine zunehmende Kalzifizierung durch längere Zeitabstände konnte innerhalb der SOD3-defizienten Gruppe festgestellt werden. So wies 4 gegenüber 12 Wochen einen eindeutigen signifikanten Unterschied in den SOD3-defizienten Tieren auf (0 [IQR 0 – 0,33] vs. 0,92 [IQR 0,34 – 1,77] $p \leq 0,0001$) (Abbildung 3.8)

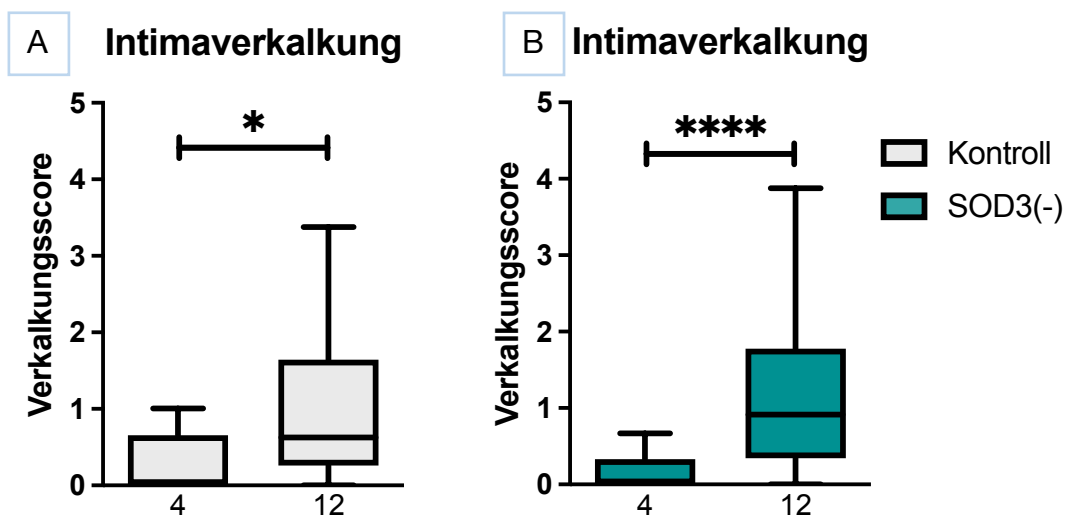


Abbildung 3.8 Vergleich der Kalk-Ablagerungen in der Intima kryopräservierter Aortenprothesen innerhalb der Kontroll-Gruppe (A) bzw. SOD3-defizienten-Gruppe (B). Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt. * $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$

3.2.2 Verkalkung der Media

Zwölf Wochen nach Implantation kryopräservierter Konduits zeigte sich in der SOD3-defizienten-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe eine signifikant erhöhte Hydroxylapatit-Ablagerung (1,56 [IQR 0,78 – 1,97] vs. 0,94 [IQR 0,53 – 1,47], $p=0,0198$). (Abbildung 3.9)

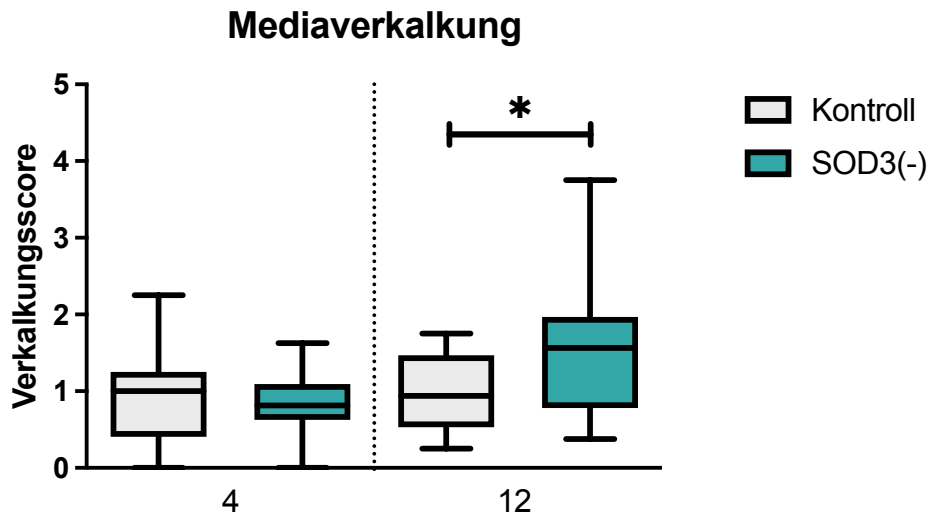


Abbildung 3.9 Bewertung der Hydroxylapatit-Ablagerungen in der Media von kryopräservierten Aortenprothesen der Kontroll- und SOD3-defizienten-Tiergruppe zu den Zeitpunkten 4 und 12 Wochen. Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt. $*p \leq 0.05$

Des Weiteren konnte eine signifikant stärkere Kalzifizierung der SOD3-Defizienz-Gruppe nach 12 Wochen im Vergleich zu nach 4 Wochen festgestellt werden (0,81 [IQR 0,63 – 1,09] vs. 1,56 [IQR 0,84 – 1,91], $p=0,0024$). (Abbildung 3.10)

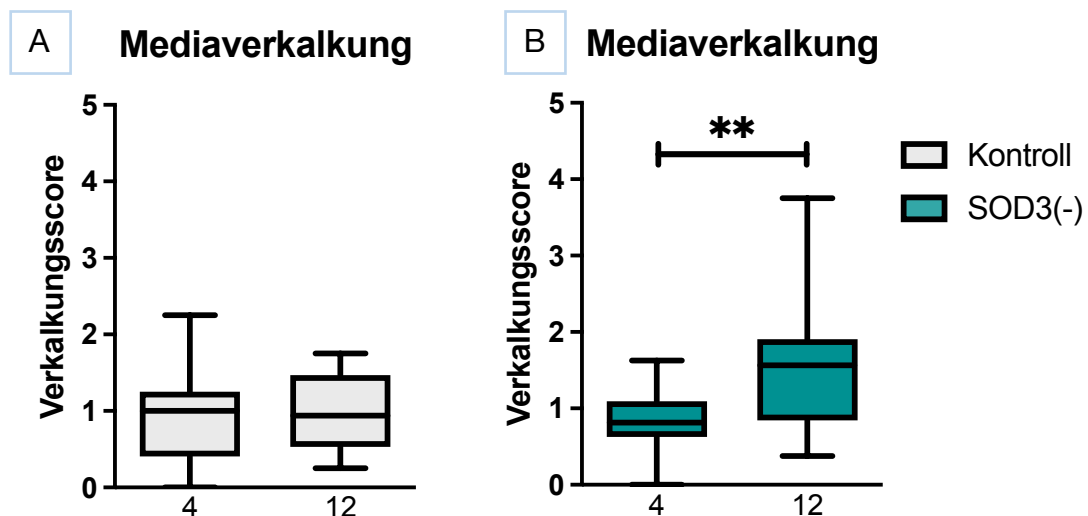


Abbildung 3.10 Vergleich der Kalk-Ablagerungen in der Intima kryopräservierter Aortenprothesen innerhalb der Kontroll-Gruppe (A) bzw. SOD3-defizienten-Gruppe (B). Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt. $**p \leq 0,01$.

3.3 Movat Auswertung

Innerhalb der kryopräservierten Implantate konnte eine chondro-osteogene Transformation sowohl in der Media als auch in der hyperplastischen Intima nachgewiesen werden. Hierbei weisen Bereiche der Aortenwand Zellen mit chondroidem Phänotyp und eine umgebende Glykosaminoglykan-Ansammlung auf. (Abbildung 3.11)

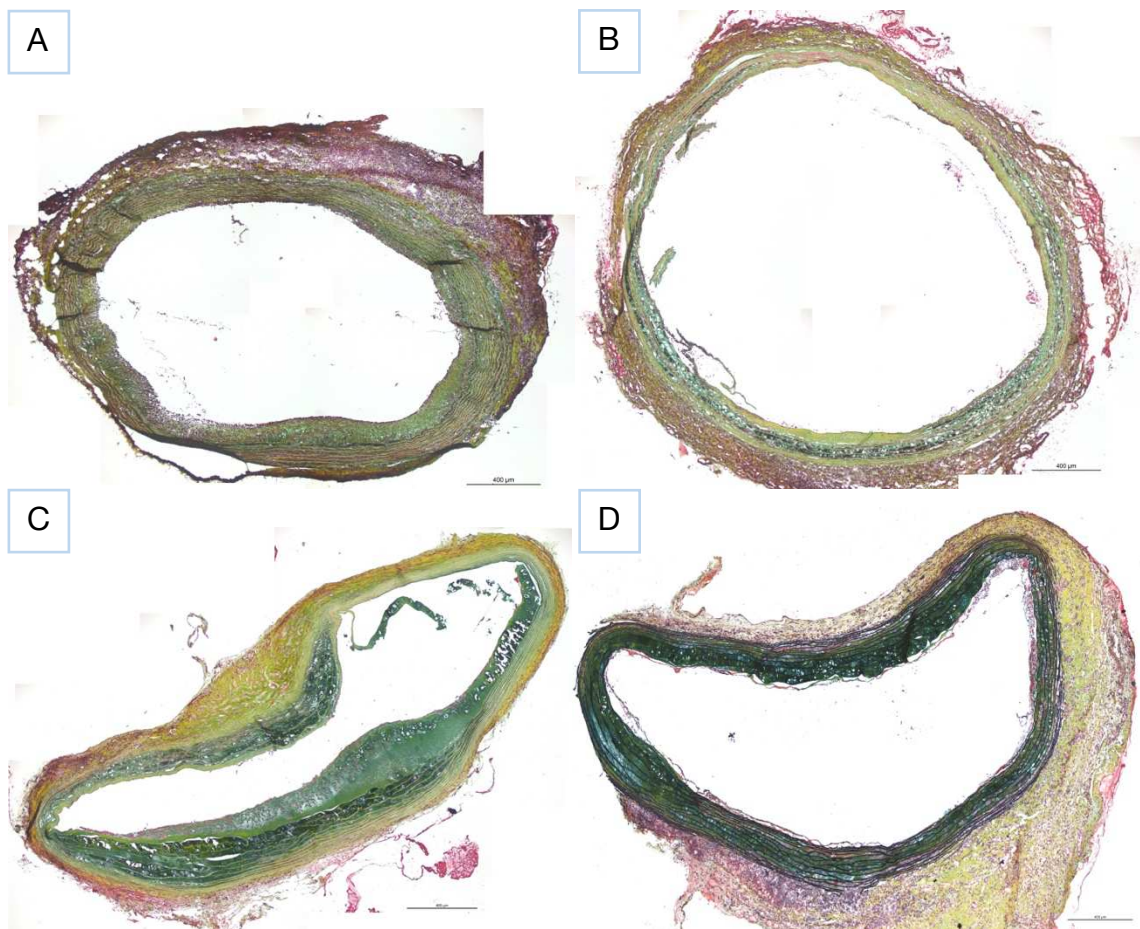


Abbildung 3.11 Chondro-osteogene Transformation kryopräservierter Aortenprothesen. Beispielhafte Bilder eines chondro-osteogene Umbaus nach 4 Wochen (A, B) und 12 Wochen (C, D) nach Implantation in SOD-3-defizienten Ratten (A, C), sowie in Ratten der Kontrollgruppe (B, D).

In den detergent-dezellularisierten Aortenprothesen konnte keine chondro-osteogene Transformation nachgewiesen werden. (Abbildung 3.12)

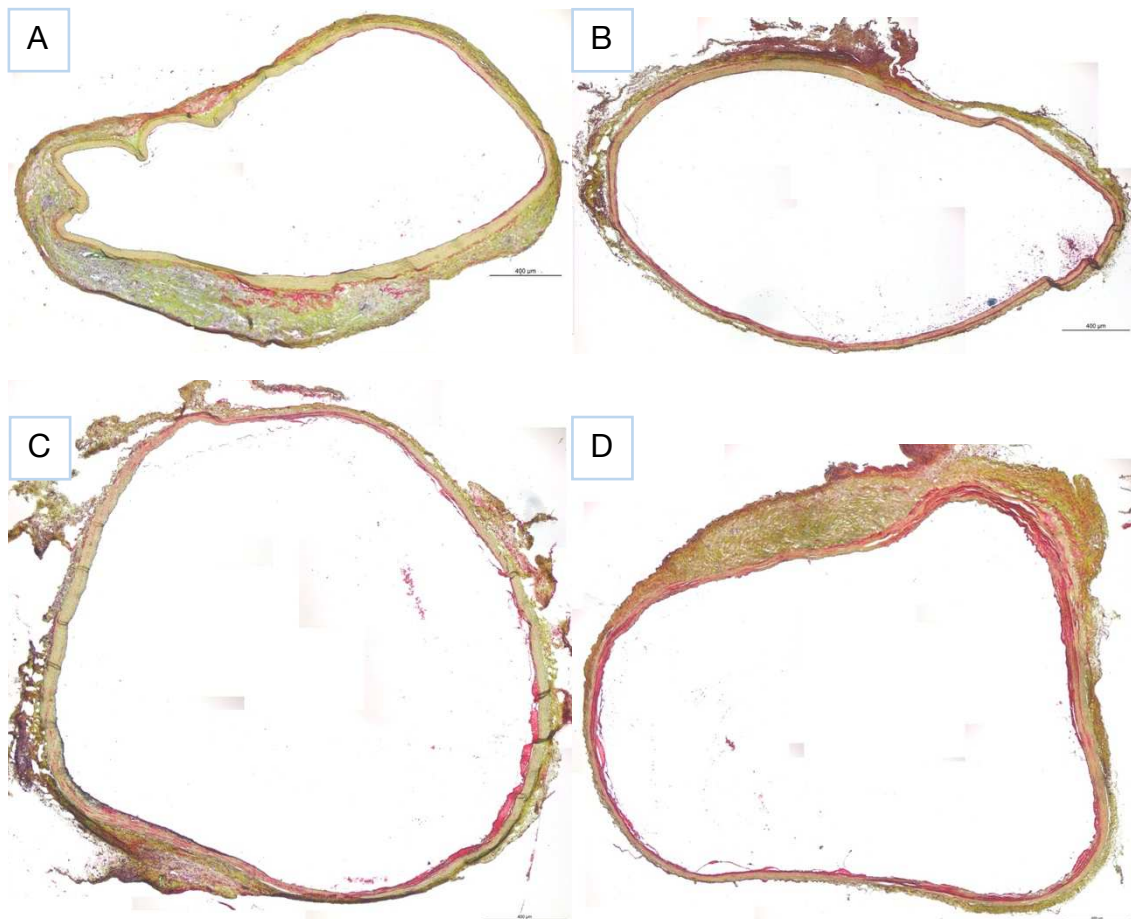


Abbildung 3.12 Detergenz-dezellularisierter Aortenprothesen ohne Nachweis einer chondro-osteogenen Transformation. Beispielhafte Bilder Movat-gefärbter Prothesen nach 4 Wochen (A, B) und 12 Wochen (C, D) nach Implantation in SOD-3-defizienten Ratten (A, C) oder Ratten der Kontrollgruppe (B, D)

3.3.1 Chondro-osteogene Transformation in der Intima

In der Intima kryopräservierter Aortenprothesen fiel der Grad des chondro-osteogenen Umbaus in beiden Gruppen ähnlich aus und wies keine Gruppenunterschiede auf (nach 4 Wochen: 0,84 [IQR 0,28– 1,28] in SOD3(-) vs. in der Kontrollgruppe mit 0,96 [IQR 0,38 – 1,85]), nach 12 Wochen: in SOD3(-) mit 1,62 [IQR 0,94 – 2,36] vs. 1,35 [IQR 0,89 – 2,47] in der Kontroll-Gruppe, $p = 0,58$ „Gruppe“ als Variationsquelle) (Abbildung 3.13)

Intima Chondroosteogene Transformation

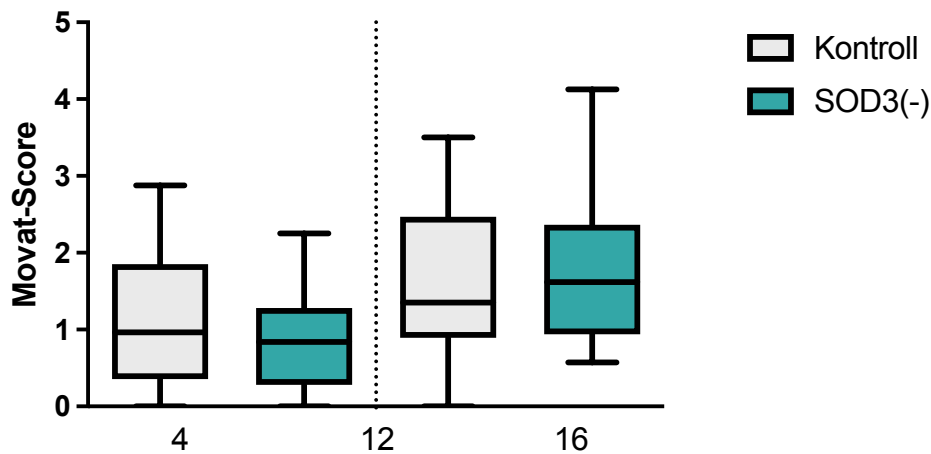


Abbildung 3.13 Bewertung der chondro-osteogene Transformation in der Intima kryopräservierter Aortenprothesen der Kontroll- und SOD3-defizienten-Tiergruppe zu den Zeitpunkten 4 und 12 Wochen. Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt.

Innerhalb der SOD3-defizienten Gruppe zeigte sich eine signifikante Progredienz chondro-osteogener Transformation im Laufe der Zeit (4 vs. 12 Wochen: 0,84 [IQR 0,28 – 1,28] vs. 1,62 [IQR 0,94 – 2,36], $p=0,0011$). (Abbildung 3.14)

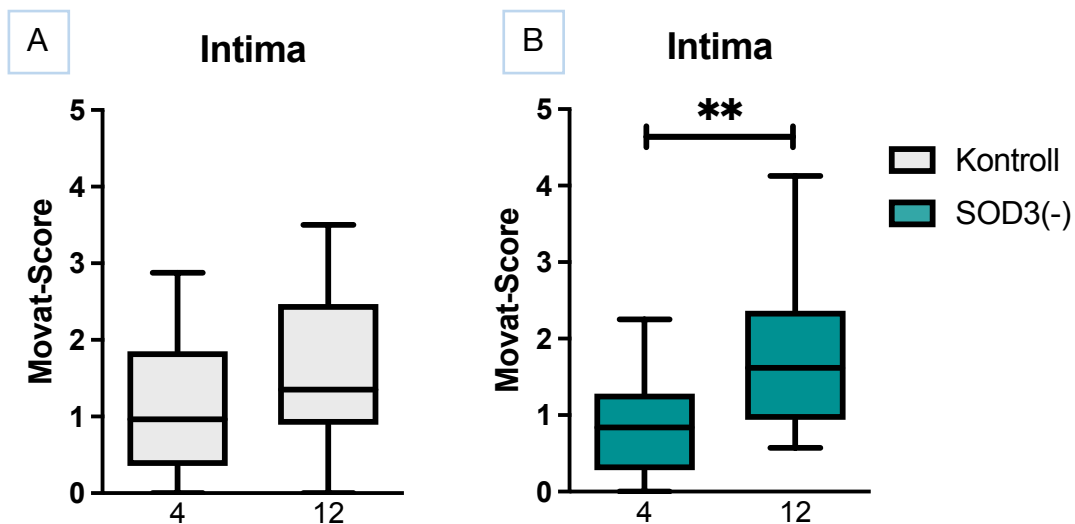


Abbildung 3.14 Vergleich des erhöhten chondro-osteogenen Umbaus in der Intima kryopräservierter Aortenprothesen innerhalb der Kontroll-Gruppe (A) bzw. SOD3-defizienten-Gruppe (B). Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt. $**p \leq 0,01$

3.3.2 Chondro-osteogene Transformation in der Media

Sowohl nach 4 und 12 Wochen *in vivo* ergaben sich chondro-osteogene Transformationen in der Media. Hierbei schien die SOD3-Defizienz-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine ausgeprägtere Ablagerung von Glycosaminoglykanen zu zeigen, ein signifikanter Unterschied konnte nach der Quantifizierung jedoch nicht festgestellt werden (nach 4 Wochen: 2,94 [IQR 1,72 – 3,72] in SOD3(-) vs. in der Kontrollgruppe mit 2,38 [IQR 1,66 – 3], nach 12 Wochen: in SOD3(-) mit 2,44 [IQR 1,31 – 3,94] vs. 1,94 [IQR 1,16 – 2,31] in der Kontroll-Gruppe, $p = 0,0686$ „Gruppe“ als Variationsquelle). (Abbildung 3.15)

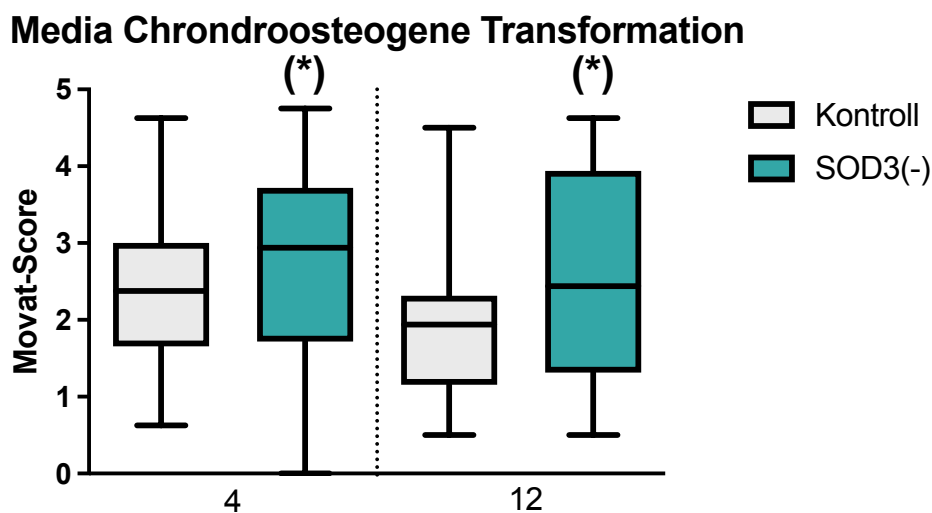


Abbildung 3.15 Bewertung der chondro-osteogene Transformation in der Media kryopräservierter Aortenprothesen der Kontroll- und SOD3-defizienten-Tiergruppe zu den Zeitpunkten 4 und 12 Wochen. Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt. (*) $p = 0,0686$ (für SOD3(-) vs. Kontroll wenn beide Zeitpunkte zusammen betrachtet werden)

Innerhalb der SOD3-defizienten Ratten konnte ein generell stark ausgeprägter chondro-osteogener Umbau in der Prothesenmedia nachgewiesen werden, signifikante Unterschiede zwischen den Beobachtungszeiträumen bestanden jedoch nicht. (Abbildung 3.16)

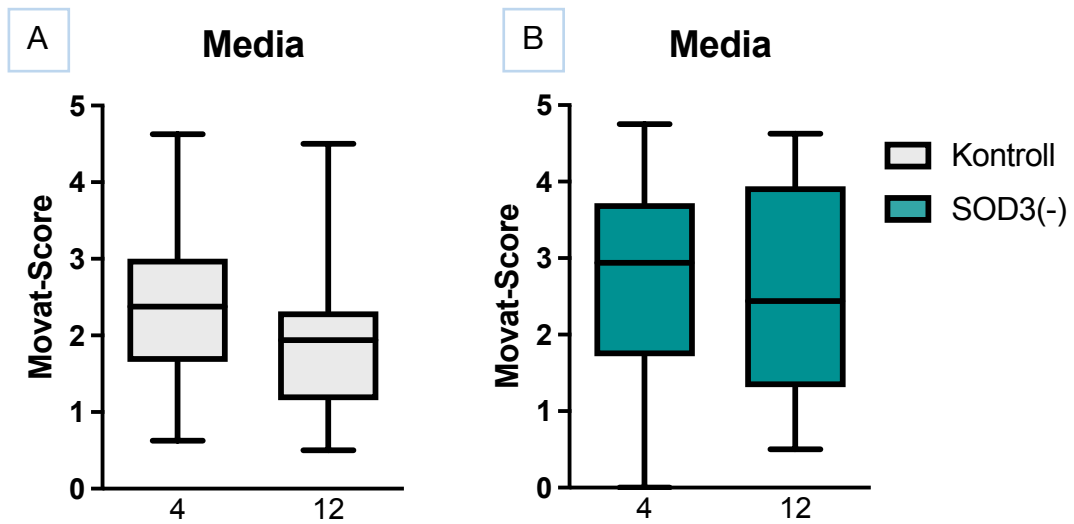


Abbildung 3.16 Vergleich des erhöhten chondro-osteogenen Umbaus in der Media kryopräservierter Aortenprothesen innerhalb der Kontroll-Gruppe (A) bzw. SOD3-defizienten-Gruppe (B). Die oberen und unteren Ränder der Box stellen 25% bzw. 75%-Intervalle dar. Minimum und Maximum werden durch die Whisker dargestellt.

4 Diskussion

Mit zunehmendem Alter treten immer häufiger Herzklappenerkrankungen auf, wodurch zur Erhaltung der Lebensqualität des Patienten häufig ein Herzklappenersatz indiziert ist. Hierbei spielt die Wahl des Implantats eine ausschlaggebende Rolle für das Patienten-Outcome. Prothesenversagen und der daraus resultierende wiederholte Herzklappenersatz steigern das Risiko der Mortalität (19,20). Aufgrund dessen sind Studien zur Klärung des Ursprungs der Prothesendegeneration und Erfassung von möglichen unterstützenden Therapien zur Verlängerung der Prothesenhaltbarkeit essenziell.

Wie bereits erwähnt, konnten Forschungsergebnisse einen erhöhten oxidativen Stress in kalzifizierten Regionen stenosierter Herzklappen zeigen (8). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die durch die ROS verursachte Kalzifizierung und zelluläre Transdifferenzierung durch antioxidative Enzyme reversibel ist (47). Basierend darauf liegt die Vermutung nahe, dass auch in der Degeneration von biologischen Prothesen oxidativer Stress eine entscheidende Rolle spielen könnte und eine eventuelle zusätzliche Behandlung, vor oder nach Klappenersatz, eine längere Prothesenhaltbarkeit erzeugen könnte.

Forschungsergebnisse, die den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und biologischen Herzklappenprothesen beschreiben, sind nach jetzigem Kenntnisstand rar. Eine Studie konnte einen Zusammenhang zwischen Kalzifizierung und oxidativen Veränderung mit einer fortschreitenden Funktionsstörung bioprothetischer Herzklappen feststellen (25). Darüber hinaus konnte oxidativer Stress, insbesondere über Hydroxyl- und Tyrosylradikale verursachte Wege, eine mögliche Verbindung zur Degeneration von biologischen Herzklappenprothesen aufweisen (26).

Die hier vorliegende Studie ist in dieser Form das erste in-vivo Modell, welches sich mit den Auswirkungen einer reduzierten Antioxidantien-Wirkung durch eine geminderte SOD3-Aktivität auf die Degeneration von biologischen Herzklappenprothesen befasst.

4.1 Oxidativer Stress Modell

Es gibt verschiedene Ansätze, um einen erhöhten oxidativen Stress hervorzurufen, entweder durch eine vermehrte ROS-Produktion oder eine verringerte ROS-Inaktivierung. Durch eine geminderte Antioxidantien-Aktivität (in dieser Arbeit SOD-Aktivität) kann ROS verringert abgebaut werden, was zu einer Ansammlung von Superoxid-Anionen führt.(48)

Es konnte festgestellt werden, dass beim Menschen die weit verbreitete SOD3-Genvariante SOD3^{R123G} die Bindung von SOD3 an die Zelloberfläche durch eine Veränderung an der Heparin-Bindungsstelle beeinträchtigt (49). Weitere Forschungen um die Genvariante SOD3^{R123G} im Menschen konnten Zusammenhänge mit einem gesteigertem Risiko für Myokardischämie aufweisen und letztendlich auf pathophysiologische Mechanismen hinweisen, welche entweder bestehende Erkrankungen mit erhöhtem oxidativen Stress oder eine Ansammlung von oxidativem Stress im Laufe der Zeit erfordern (50–53). Letzteres bezieht sich auf die Erkenntnisse, dass die Wirkungen von SOD3^{R123G} auf den Verlauf einer ischämischen Herzkrankheit interessanter Weise überwiegenden bei Patienten mit einem Alter von über 70 Jahren beobachtet wurde. Dies stimmt mit den Ergebnissen einer Studie mit SOD3-defizienten Mäusen überein. Demnach wurde entdeckt, dass insbesondere bei älteren Tieren die SOD3-Aktivität wichtig ist, um vor einer endothelialen Dysfunktion zu schützen (54).

Die vorhandenen Daten zu SOD3^{R123G} bestätigen, dass Tiermodelle mit verminderter SOD3-Aktivität klinisch relevante kardiovaskuläre Erkrankung imitieren können (48).

Da sich die hier vorliegende Studie mit der Degeneration von Aortenklappenprothesen beschäftigt, sind die zuvor genannten Mausmodelle für ein mikrochirurgisches Modell technisch limitiert. Um mikrochirurgische Schwierigkeiten zu verringern, fiel die Wahl daher auf ein Rattenmodell und das bereits etablierte Aortenprothesen-Implantations-Modell (43). Wie zuvor schon erwähnt, konnten vorausgehende Studien eine verminderte SOD3-Aktivität in Ratten durch eine SOD3^{E124D}-Mutation verursachen. Hierbei konnte eine verstärkte endotheliale Dysfunktion in der Aorta (40), sowie eine verminderte

Schutzwirkung gegenüber der Entwicklung von pulmonaler Hypertonie nachgewiesen werden (41). Diese Forschungsergebnisse zeigen den prodegenerativen Effekt der Mutation auf das vaskuläre System der Ratten. Daher wurden in der vorliegenden Studie Ratten mit einer loss-of-function-Mutation des Genes SOD3^{E124D} verwendet.(48)

Für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tiermodell konnte eine signifikant geminderte totale SOD-Aktivität im Blutserum in der SOD3-defizienten Versuchsgruppe festgestellt werden (48,55). Die SOD3^{E124D}-Mutation verursacht ein nicht funktionsfähiges extrazelluläres SOD3-Enzym, sodass folglich die SOD3-Aktivität reduziert wird. Da SOD3 die häufigste SOD-Isoform in extrazellulären Flüssigkeiten ist, und somit unter physiologischen Bedingungen auch die meiste antioxidative Aktivität im Blutserum verursacht (28,35), führt die SOD3^{E124D}-Mutation zu einer nachgewiesenen Reduktion der gesamten SOD-Aktivität im Blut.

4.2 Degeneration kryopräservierter Prothesen

Betrachtet man die einzelnen histologischen Färbungen, so zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den detergent-dezellularisierten Prothesen und den kryopräservierten Aortenprothesen. Die Degeneration in den detergent-dezellularisierten Prothesen war generell schwächer ausgeprägt und wies keine Gruppenunterschiede zwischen der SOD3-defizienten Gruppe und der Kontroll-Gruppe auf. Die vorliegende Studie beschäftigte sich zunächst mit der Degeneration von sowohl kryopräservierten als auch detergent-dezellularisierten Aortenprothesen zu den Zeitpunkten nach 4 und 12 Wochen.

4.2.1 Inflammatorische Prozesse

Es ist bekannt, dass implantierte kryopräservierte Transplantate einen inflammatorischen Prozess im Empfängerorganismus hervorrufen (56). Vorausgehende Studien konnten dahingegen feststellen, dass detergent-dezellularisierte Prothesen aufgrund der fehlenden Spenderzellen eine geminderte inflammatorische Reaktion aufweisen (42).

Die vorliegende Studie konnte erhöhte Entzündungsmarker wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL1}\beta$ in den kryopräservierten Allografts im Vergleich zu den detergent-dezellularisierten Prothesen nach 4 Wochen darstellen. Diese Tendenz war jedoch nach 12 Wochen nicht mehr zu erkennen (55). Dies ist vereinbar mit den Erkenntnissen, dass ein inflammatorischer Prozess bereits in der Frühphase der kardiovaskulären Degeneration erfolgt (57). Ein signifikanter Unterschied zwischen der SOD3-defizienten Gruppe und der Kontroll-Gruppe konnte hierbei nicht festgestellt werden (48,55). Dies könnte nahelegen, dass die inflammatorischen Prozesse bei der SOD3-defizienten Gruppe nicht maßgeblich an der verstärkten Mediaverkalkung beteiligt waren. Eine andere Erklärung könnte jedoch sein, dass die Untersuchungen sich auf das ganze Explantat beziehen, während Unterschiede in der Verkalkung hauptsächlich in der Media auftraten. Mögliche Gruppen-Unterschiede hätten dadurch nicht erkannt werden können.(48)

Eine zusätzliche histologische Aufarbeitung mittels Immunofluoreszenz-Färbungen zur Erfassung von inflammatorischem Infiltrat könnte eine weitere interessante Untersuchung darstellen. Wie zuvor erläutert, liegt jedoch die Vermutung nahe, dass die hier vorliegenden Beobachtungszeiträume für den Nachweis von inflammatorischen Prozessen, welche in der Frühphase der kardiovaskulären Degeneration liegen, zu lange sein könnten.

4.2.2 Intima-Hyperplasie

In kryopräservierten Aortenimplantaten konnte in der hier vorliegenden Studie eine Intima-Hyperplasie in beiden Gruppen festgestellt werden, welche in den SOD3-defizienten-Tieren tendenziell stärker ausgeprägt war, jedoch keinen signifikanten Gruppenunterschied darstellte. In den detergent-dezellularisierten Prothesen kam es zu keiner nennenswerten Neointima-Ansammlung. Vorausgehende Studien mit kryopräservierten kardiovaskulären Allografts in Ratten bestätigten ebenfalls eine hyperplastische Intima-Bildung in Gegenwart von aktivierten Myofibroblasts.(42,48,56,58)

4.2.3 Fortschreitende Kalkablagerungen in Prothesen der SOD3-defizienten Gruppe

Im Laufe der Zeit konnten sowohl in der Intima als auch in der Media kryopräservierter Aortenprothesen fortschreitende Hydroxylapatit-Ablagerung im Laufe der Zeit nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie konnten zwar Kalk-Ablagerungen auch in der hyperplastischen Intima nachgewiesen werden, diese wiesen jedoch keine Unterschiede zwischen der SOD3-defizienten- und der Kontroll-Gruppe auf. Im Gegensatz zur Intima zeigte sich in der Media eine signifikant erhöhte Verkalkung der SOD3-defizienten Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren binnen 12 Wochen. Es ist bekannt, dass in nativen Arterien die Mediaverkalkung, also Arteriosklerose, durch oxidativen Stress gefördert wird (13). Ein ähnlicher pathophysiologischer Prozess könnte den Ort der verstärkten Degeneration in der Media der SOD3-defizienten-Tieren erklären (48).

4.2.4 Chondro-osteogene Transformation

Eine chondro-osteogene Transformation tritt charakteristischerweise in Bereichen fortgeschrittener Intimahyperplasie auf. Vorausgehende Studien beschrieben bereits, dass Myofibroblasten eine Transformation zu chondroiden Zellen in der hyperplastischen Intima durchmachen (46,59). So zeigte sich in der hier vorliegenden Studie ebenfalls ein chondro-osteogener Umbau in der Intima kryopräservierter Aortenprothesen, jedoch ohne Gruppenunterschiede.

In der Media hingegen zeigten sich ähnliche Prozesse der chondro-osteogenen Transformation wie bei der Kalkablagerung. So wurde ein verstärkter Umbau in Verbindung mit signifikant erhöhten Kalkablagerungen bei Tieren der SOD3-defizienten-Gruppe überwiegend in der Media kryopräservierter Prothesen beobachtet.

Analysen hinsichtlich verschiedener Gen-Expressionen zeigten bei Osteopontin und α SMA in Prothesen der SOD3-defizienten Gruppe keine signifikante erhöhte Genexpression.(48)

Es konnte jedoch ein signifikanter Anstieg an RUNX2 in SOD3-defizienten Ratten nach 12 Wochen festgestellt werden.(48) Frühere Daten weisen zudem

auf die Rolle von RUNX2 als osteogener Transkriptionsfaktor hin, welcher die kardiovaskuläre Degeneration fördert.(42,60) Zudem konnte eine erhöhte RUNX2-Expression in durch oxidativen Stress ausgelösten Verkalkung von glatten Gefäßmuskelzellen festgestellt werden.(61) Hierbei wurden Aorten von Mäusen isoliert und in vitro einer Kalzifizierung durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) unterzogen. Durch das H_2O_2 kam es zu einem phänotypischen Wechsel der vaskulären glatten Muskelzellen vom kontraktilen zum osteogenen Phänotypen. Durch eine Hemmung von RUNX2, konnte eine blockierte Verkalkung festgestellt werden. Eine induzierte Überexpression von RUNX2, förderte wiederum die Verkalkung der Gefäßmuskelzellen. Des Weiteren konnte unter pro-osteogener Stimulation zudem ein erhöhter RUNX2-Spiegel in valvulären interstitiellen Zellen nachgewiesen werden (30). Hierbei wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Runx2-Expression aufgehoben wird, wenn valvuläre interstitielle Zellen mit valvulären Endothelzellen kokultiviert wurden. Vergleicht man dies mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, so ist in Letzterer eine chondro-osteogene Transformation überwiegend in der Media der Transplantate zu finden. Hier liegen interstitielle Zellen, aber, im Gegensatz zur Implantat-Intima, keine Endothelzellen vor.(48) Darin zeigt sich eine Parallele zu den dargelegten Ko-Kultur-Versuchen.

4.3 Grenzen der vorliegenden Studie

Wie bei allen Versuchsmodellen mit Tieren besteht auch in dieser Studie eine Einschränkung durch die anatomischen Verhältnisse und die Physiologie der Versuchstiere. Die Wahl der Verwendung eines Rattenmodells könnte den moderaten degenerativen Effekt der implantierten Prothesen erklären. Kleine Nager sind im Vergleich zum Menschen weniger anfällig für kardiovaskuläre Degeneration. Ratten weisen eine geminderte Bindungsfähigkeit von SOD3 zu Proteoglykanen der Zelloberfläche auf, sodass der interstitielle SOD3-Gehalt im vaskulären Gewebe von Ratten im Vergleich zu anderen Säugetieren geringer ausfällt (62–64). Dies wirft die berechtigte Frage auf, welchen Einfluss SOD3 auf kardiovaskuläre Erkrankungen in Ratten hat. Dennoch konnte in der vorliegenden Studie eine erhöhte Degeneration der kryopräservierten Prothesen

durch Kalzifizierung bei den SOD3-defizienten Tieren nachgewiesen werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei Menschen, welche größere Mengen an extrazellulärer SOD in Gefäßwänden besitzen, eine ausgeprägtere Degeneration zu erwarten wäre. Eine direkte Schlussfolgerung von der Ratte auf den Menschen ist jedoch begrenzt. (48)

Ein weiterer limitierender Faktor ist der Beobachtungszeitraum. Vorausgehende Studien im SOD3^{E412D}-Modell zeigten signifikante Veränderungen im Sinne von chronischen Nierenkrankheiten, bestehend aus fokaler Nekrose und Fibrose, Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose mit Hypertonie und Nierenversagen mit erhöhtem Serumkreatinin erst im Zeitraum von 21 Wochen (65). Entscheidend scheint hierbei ein geringer kontinuierlicher oxidativer Stress über einen längeren Beobachtungszeitraum zu sein (48).

Hinzu kommt, dass die intrazelluläre zytosolische SOD1 unter physiologischen Bedingungen den primären Regulator der ROS in der Gefäßwand darstellt. Die extrazelluläre SOD3 hingegen ist entscheidend unter pathophysiologischen Bedingungen (66). In unserem SOD3^{E412D}-Modell erfolgte die Alimentation der Versuchstiere durch natriumarmes Spezialfutter, welches die Belastung des kardiovaskulären und renalen Systems der Tiere minderte. Dies könnte darin resultieren, dass die pathophysiologischen Zustände mit vermehrter ROS-Produktion nicht in ausreichendem Maße vorhanden waren und die Verringerung der extrazellulären antioxidativen Kapazität durch SOD3-Mangel möglicherweise nicht so entscheidend auf die Prothesendegeneration wirkte. Ein zusätzliches pathologisches Modell durch salzreiche Ernährung der SOD3-defizienten Ratten könnte unter diesem Aspekt ein interessanter nächster Ansatz für Folgestudien sein. Das gewählte Design der vorliegenden Studie ohne zusätzliche ROS-verstärkende Erkrankungen hat jedoch den klaren Vorteil, dass weitere potenzielle degenerative Faktoren solcher Erkrankungen nicht berücksichtigt werden müssen.(48)

4.4 Fazit und Ausblick

In dieser Studie konnte erstmals ein Implantationsmodell zum Einfluss von oxidativem Stress auf die Degeneration biologischer Aortenklappen-Allografts etabliert werden. Vermehrter oxidativer Stress durch SOD3-Defizienz führte zu einer stärkeren Kalzifizierung kryopräservierter Implantate binnen 12 Wochen, während die Degeneration in dezellularisierten Prothesen generell schwächer ausgeprägt war und keine Gruppenunterschiede aufwies. Weitere Modelle mit deutlicherer Erhöhung des oxidativen Stresses, salzreicher Ernährung als pathologisches Modell oder veränderten Beobachtungszeiträumen sind erforderlich, um die Rolle der ROS für die Degeneration biologischer und vor allem detergenz-dezellularisierten Prothesen weiter zu entschlüsseln. Des Weiteren wäre die Evaluierung von potenziellen protektiven Effekten durch antioxidative Behandlung, wie z.B. einer lokalen Beschichtung mit Antioxidantien der Implantate, ein guter Ansatz für weitere Studien.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet*. 2006;368(9540):1005–11.
2. Iung B, Baron G, Tornos P, Gohlke-Bärwolf C, Butchart EG, Vahanian A. Valvular Heart Disease in the Community: A European Experience. *Curr Probl Cardiol*. 2007;32(11):609–61.
3. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, u. a. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2022;75(6):524.
4. Treede H. Aortenklappenstenose - Diagnose und Therapieoptionen. *Thieme-Refresher Innere Medizin*. 2016;R25–40.
5. Frerker C, Möllmann H. Aortic valve stenosis in the year 2020. *Kardiologe*. 2021;15(2):101–8.
6. Brown ML, Pellikka PA, Schaff HV., Scott CG, Mullany CJ, Sundt TM, u. a. The benefits of early valve replacement in asymptomatic patients with severe aortic stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(2):308–15.
7. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, u. a. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT™ in pediatric patients. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2003;23(6):1002–6.
8. Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Peña-Silva R, Heistad DD. Dysregulation of Antioxidant Mechanisms Contributes to Increased Oxidative Stress in Calcific Aortic Valvular Stenosis in Humans. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(10):843–50.
9. Eapc PC, Crawford C, Ireland N, France ID, Di E, United A, u. a. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice Developed by the Task Force for cardiovascular disease prevention in clinical practice with representatives of the European Society of.

2021;3227–337.

10. Pohle K, Mäffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, u. a. Progression of Aortic Valve Calcification. 2015;
11. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, u. a. 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. *Circulation*. 2011;124(16):1783–91.
12. Mohty D, Pibarot P, Despre J, Co C, Arsenault B, Cosnay P, u. a. Association Between Plasma LDL Particle Size , Valvular Accumulation of Oxidized LDL , and Inflammation in Patients With Aortic Stenosis. 2007;
13. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: Implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res*. 2018;114(4):590–600.
14. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, u. a. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*. 2003;107(17):2181–4.
15. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*. 2001;103(11):1522–8.
16. Rajamannan NM, Rajamannan NM. Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology. 2013;(October 2009).
17. Conti V, Lick SD. Cardiac Surgery in the Elderly: Indications and Management Options to Optimize Outcomes. *Clin Geriatr Med*. 2006;22(3):559–74.
18. O'Brien MF, Gregory Stafford E, Gardner MAH, Pohlner PG, Tesar PJ, Cochrane AD, u. a. Allograft aortic valve replacement: Long-term follow-up. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(SUPPL. 2).

19. Butany J, Collins MJ. Analysis of prosthetic cardiac devices: A guide for the practising pathologist. *J Clin Pathol*. 2005;58(2):113–24.
20. Tjang YS, van Hees Y, Körfer R, Grobbee DE, van der Heijden GJMG. Predictors of mortality after aortic valve replacement. *Eur J Cardiothoracic Surg*. 2007;32(3):469–74.
21. Clarke DR, Campbell DN, Hayward AR, Bishop DA. Degeneration of aortic valve allografts in young recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Mai 1993;105(5):932–4.
22. Neumann A, Cebotari S, Tudorache I, Haverich A, Sarikouch S. Heart valve engineering: Decellularized allograft matrices in clinical practice. *Biomed Tech*. 2013;58(5):453–6.
23. Ground M, Waqanivavalagi S, Walker R, Milsom P, Cornish J. Models of immunogenicity in preclinical assessment of tissue engineered heart valves. *Acta Biomater* [Internet]. 2021;133:102–13. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.049>
24. Badria AF, Koutsoukos PG, Mavrilas D. Decellularized tissue-engineered heart valves calcification: what do animal and clinical studies tell us? *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2020;31(12). Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-020-06462-x>
25. Lee S, Levy RJ, Christian AJ, Hazen SL, Frick NE, Lai EK, u. a. Calcification and oxidative modifications are associated with progressive bioprosthetic heart valve dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(5):1–13.
26. Christian AJ, Lin H, Alferiev IS, Connolly JM, Ferrari G, Hazen SL, u. a. The susceptibility of bioprosthetic heart valve leaflets to oxidation. *Biomaterials* [Internet]. 2014;35(7):2097–102. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.045>
27. Incalza MA, D’Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2018;100:1–19. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>
28. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling,

- vascular function, and diseases. *Antioxidants Redox Signal*. 2011;15(6):1583–606.
29. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(8):1367–73.
 30. Richards J, El-Hamamsy I, Chen S, Sarang Z, Sarathchandra P, Yacoub MH, u. a. Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: Interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling. *Am J Pathol*. 2013;182(5):1922–31.
 31. El Accaoui RN, Gould ST, Hajj GP, Chu Y, Davis MK, Kraft DC, u. a. Aortic valve sclerosis in mice deficient in endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2014;306(9):1302–13.
 32. Choi S. Encyclopedia of Signaling Molecules. *Encycl Signal Mol*. 2018;
 33. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):337–49.
 34. Jung O, Marklund SL, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: In vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. *Circ Res*. 2003;93(7):622–9.
 35. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(3):236–56.
 36. Pinto A, Immohr MB, Jahn A, Jenke A, Boeken U, Lichtenberg A, u. a. The extracellular isoform of superoxide dismutase has a significant impact on cardiovascular ischaemia and reperfusion injury during cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2016;50(6):1035–44.
 37. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. Bd. 55, *Cardiovascular Research*. 2002. S. 239–49.
 38. Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene

- transfer and endogenous regulators of ecSOD. Bd. 151, Translational Research. 2008. S. 68–78.
39. Strålin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. November 1995;15(11):2032–6.
 40. Beyer AM, Raffai G, Weinberg BD, Fredrich K, Rodgers MS, Geurts AM, u. a. Amelioration of salt-induced vascular dysfunction in mesenteric arteries of Dahl salt-sensitive rats by missense mutation of extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2014;306(3):339–47.
 41. Xu D, Guo H, Xu X, Lu Z, Fassett J, Hu X, u. a. Exacerbated pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in animals with loss of function of extracellular superoxide dismutase. *Hypertension*. 2011;58(2):303–9.
 42. Assmann A, Zwirnmann K, Heidelberg F, Schiffer F, Horstkötter K, Munakata H, u. a. The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model. *Biomaterials*. 2014;35(26):7416–28.
 43. Assmann A, Akhyari P, Delfs C, Flögel U, Jacoby C, Munakata H, u. a. Development of a growing rat model for broad in vivo assessment of bioengineered aortic conduits. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;60(S 01).
 44. Zhang B, Miller VM, Miller JD. Influences of Sex and Estrogen in Arterial and Valvular Calcification. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(September):1–11.
 45. Munakata H, Assmann A, Poudel-Bochmann B, Horstkötter K, Kamiya H, Okita Y, u. a. Aortic conduit valve model with controlled moderate aortic regurgitation in rats: A technical modification to improve short- and long-term outcome and to increase the functional results. *Circ J*. 2013;77(9):2295–302.
 46. Assmann A, Delfs C, Munakata H, Schiffer F, Horstkötter K, Huynh K, u. a. Acceleration of autologous invivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials* [Internet].

- 2013;34(25):6015–26. Verfügbar unter:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.037>
47. Branchetti E, Sainger R, Poggio P, Grau JB, Patterson-Fortin J, Bavaria JE, u. a. Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(2).
 48. Assmann A, Schmidt V, Lepke C, Sugimura Y, Assmann AK, Barth M, u. a. Degeneration of biological heart valve grafts in a rat model of superoxide dismutase-3 deficiency. *FASEB J.* 2022;36(11):1–13.
 49. Folz RJ, Peno-green L, Crapo JD. A. $\cdot > 9^\circ \cdot >$. 1994;3(12):2251–4.
 50. Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Marklund S, Heegaard NHH, Steffensen R, Sillesen H, u. a. Genetically Reduced Antioxidative Protection and Increased Ischemic Heart Disease Risk: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation.* 2004;109(1):59–65.
 51. Yamada H, Yamada Y, Adachi T, Fukatsu A, Sakuma M, Futenma A, u. a. Protective role of extracellular superoxide dismutase in hemodialysis patients. *Nephron.* 2000;84(3):218–23.
 52. Chu Y, Alwahdani A, Iida S, Lund DD, Faraci FM, Heistad DD. Vascular effects of the human extracellular superoxide dismutase R213G variant. *Circulation.* 2005;112(7):1047–53.
 53. Iida S, Chu Y, Weiss RM, Yu MK, Faraci FM, Heistad DD. Vascular effects of a common gene variant of extracellular superoxide dismutase in heart failure. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2006;291(2):914–21.
 54. Lund DD, Chu Y, Miller JD, Heistad DD. Protective effect of extracellular superoxide dismutase on endothelial function during aging. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2009;296(6).
 55. Schmidt V. Establishment of a model of cardiovascular allograft. 2017. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Masterarbeit
 56. Legare JF, Lee TD, Ross DB. Cryopreservation of rat aortic valves results in increased structural failure. *Circulation* [Internet]. 7. November 2000;102(19 Suppl 3):III75-8. Verfügbar unter:
http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.102.suppl_3.III-75

57. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, u. a. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 2007;116(24):2841–50.
58. Assmann AK, Goschmer D, Sugimura Y, Chekhoeva A, Barth M, Assmann A, u. a. A Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists in Counteracting the Degeneration of Cardiovascular Grafts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2021;79(1):e103–15.
59. Assmann A, Horstkötter K, Munakata H, Schiffer F, Delfs C, Zwirnmann K, u. a. Simvastatin does not diminish the in vivo degeneration of decellularized aortic conduits. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;64(4):332–42.
60. Chen Y, Zhao X, Wu H. Transcriptional programming in arteriosclerotic disease; A Multifaceted Function of the Runx2 (Runt-Related Transcription Factor 2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(1):20–34.
61. Chang HB, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, u. a. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*. 2008;283(22):15319–27.
62. Carlsson LM, Marklund SL, Edlund T. The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(11):5219–22.
63. Karlsson K, Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. *Biochem J*. 1988;255(1):223–8.
64. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest*. 1984;74(4):1398–403.
65. Guo H, Xu D, Kuroki M, Lu Z, Xu X, Geurts A, u. a. Kidney failure, arterial hypertension and left ventricular hypertrophy in rats with loss of function mutation of SOD3. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2020;152(November 2019):787–96. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.023>

66. Wolin MS. Extracellular superoxide dismutase depletion in hypertension unmasks a new role for angiotensin II in regulating Cu,Zn-superoxide dismutase activity. *Hypertension*. 2006;48(3):368–9.

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Prof. Dr. Alexander Assmann, meinem Doktorvater, bedanken. Ohne seine Hilfe, die zahlreichen richtungsweisenden Ratschläge und die stetige Unterstützung wäre das Ziel dieses Projektes nicht verwirklicht worden.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari, welcher zum Zeitpunkt der Forschung Leiter der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie war, für die zahlreichen Impulse und den zielorientierten Rat bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg für die Möglichkeit diese Dissertation an der Klinik für Herzchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anfertigen zu können.

Der gesamten Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie möchte ich ebenfalls für die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit herzlich danken. Ich schätze jede einzelne Person in diesem Team.

Ein besonderer Dank ist an Vera Schmidt gerichtet. Vielen Dank für die gemeinsamen Stunden im Labor, welche stets Freude an diesem gemeinsamen Projekt machten, sowie eine schöne Freundschaft daraus entwickelte. Ich möchte ebenso meiner Arbeitsgruppe mit Dr. med. Agunda Chekhoeva, Dr. med. Mahfuza Toshmatova und insbesondere Dr. med. Yukiharu Sugimura für seine chirurgischen Eingriffe mit viel Präzision und Geduld danken. Dankeschön für die methodische Anleitung und die anregenden Diskussionen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, welche mich auch durch schwierige Situation in meinem Leben stets ermutigt und unterstützt haben. Meinem Partner Jonas verdanke ich mehr als Worte ausdrücken können. Seine motivierenden Worte während des Schreibprozesses, sowie die Aussicht auf viel Kaffee machten es deutlich leichter. Unseren beiden Katern Keith und Sir Paul möchte ich natürlich auch danken, da ihre stetigen Tapser über die Tastatur die Korrektur der Dissertation deutlich einfacher gestaltet hat.