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

# Etablierung der Kultivierung von Aortenklappen unter Hypoxie in einem *ex vivo* Modell (Bioreaktor)

**Dissertation** 

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

> vorgelegt von Asya Candan (2024)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Margriet Ouwens Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

#### Teile dieser Arbeit wurden in Fachaufsätzen veröffentlicht:

Niazy N, Barth M, Selig JI, Feichtner S, Shakiba B, <u>Candan A</u>, Albert A, Preuß K, Lichtenberg A, Akhyari P. Degeneration of Aortic Valves in a Bioreactor System with Pulsatile Flow. Biomedicines. 2021 Apr 23;9(5):462.

# Zusammenfassung

Hypoxie führt, aufgrund einer Taschenverdickung bei einer kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (CAVD), zu einer Hochregulierung des Hypoxieinduzierten Faktors  $1\alpha$  (Hif- $1\alpha$ ) und seiner Zielgene vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1) und Carboanhydrase 9 (CA9). Der Einfluss von Hypoxie auf die CAVD-Progression ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht. Ziel der Arbeit ist die Etablierung der Kultivierung der Aortenklappe unter hypoxischen Bedingungen, als Modell zur Erforschung von Therapieansätzen der CAVD. Dafür wurden ovine Aortenklappen in einem 3D-Zellkulturmodell unter statischen Bedingungen für 7 und 14 Tage unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert. Die Morphologie und Zellverteilung wurden durch histologische Analysen untersucht. Zusätzlich wurden native ovine Aortenklappenkonduits in einem ex vivo Modell unter physiologischen Bedingungen mit einem pulsatilen Flussprofil im Bioreaktor kultiviert. Der computergesteuerte Bioreaktor hielt die Bedingungen Temperatur, Druck und pH-Einstellung aufrecht. Um optimale hypoxische Kulturbedingungen im Bioreaktor zu etablieren, wurde der Sauerstoffpartialdruck innerhalb des Bioreaktors für verschiedene Begasungsbedingungen und Die Schlaucharten gemessen. Aortenklappenkonduits wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen im Bioreaktor unter Verwendung von Silikon – und Gummischläuchen kultiviert. Nach 3 Tagen Kultivierung wurden hier die Genexpression analysiert und die Klappenmorphologie mit Hilfe etablierter, histologischer Färbemethoden untersucht. Die histologische Untersuchung der ovinen Aortenklappen im 3D-Zellkulturmodell zeigte nach 7 Tagen in allen Bedingungen keine morphologischen Veränderungen. Nach 14 Tagen war eine Verdickung der Taschen im Vergleich zu 7 Tagen Kultivierung zu sehen, bei erhaltener Zellmorphologie und Struktur der extrazellulären Matrix. Im Bioreaktorsystem konnten verschiedene hypoxische Bedingungen entwickelt werden. Die hypoxische Kultivierung von Aortenklappen im Bioreaktor führte zu keiner erhöhten Expression von Hif-1α-Zielgenen (VEGF, SLC2A1 und CA9). Die histologische Analyse konnte den Erhalt der Gewebeintegrität der Aortenklappe sowohl im Bioreaktor als auch im 3D-Zellkulturmodell zeigen, während die Kultivierung mit Gummischläuchen zu Gewebedefekten führte.

## Summary

Local hypoxia due to leaflet thickening during calcific aortic valve disease (CAVD) leads to upregulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) and its target genes vascular endothelial growth factor (VEGF), solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1), carbonic anhydrase 9 (CA9). However, interrelation of CAVD progression with hypoxia in aortic valve is still poorly understood. The aim of this work is to establish the cultivation of the aortic valve under hypoxic conditions in order to use therapeutic approaches for calcic aortic valve disease.

Ovine aortic valves were cultivated in an ECM-based 3D cell culture model under static conditions for 7 and 14 days under normoxic and hypoxic conditions (1% O<sub>2</sub>). 3D culture morphology and cell distribution were as well examined by histological analysis. In addition, native aortic valve conduits were cultivated in an ex vivo model under physiological conditions and a pulsatile flow profile. The computer-controlled bioreactor maintained these conditions via temperature, pressure and pH adjustment. To establish hypoxic culture conditions in the bioreactor partial oxygen pressure within the bioreactor was measured for various chamber setups, gassing conditions and different kind of tubes to find an optimal hypoxic condition. Ovine aortic valve conduits were cultivated under normoxic and hypoxic conditions in the bioreactor using silicone and rubber tubes. After 3 days of cultivation gene expression levels were analyzed and valve-morphology were explored with histological dye. Histological analysis of ovine valves in the 3D cell culture model showed no morphological alterations after 7 days in all conditions. After 14 days a leaflet thickening compared to 7 days of cultivation could be seen, indicating preserved cell morphology, extracelluar matrix structure and ongoing leaflet thickening in hypoxic and normoxic conditions. Different hypoxic conditions could be developed in the bioreactor system. Hypoxic cultivation of aortic valves in the bioreactor did not lead to higher expression of Hif-1a target genes (VEGF, SLC2A1 and CA9). No morphological changes were observed under hypoxic conditions compared to normoxia. Tissue integrity was intact using silicone tubes, while cultivation with rubber tubes led to destruction of the tissue. The histological analysis could show maintenance of the tissue integrity of the aortic valve as well in the bioreactor system as in the 3D cell culture model.

# Abkürzungsverzeichnis

3D	3-dimensional
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
Aquadest	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
CA9	Carboanhydrase 9
CAVD	calcific aortic valve disease
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Тад
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminintetaacetat
ECM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetal calf serum
FIH	Factor Inhibiting HIF
h	Stunde
HE	Hämatoxylin und Eosin
HRE	Hypoxie-Response-Elemente
HCL	Salzsäure
mbar	Millibar
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
N <sub>2</sub>	Stickstoff
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PBS	phosphate buffered saline
PHD	Prolyl-4-hydroxylase
pVHL	von Hippel-Lindau-Protein
qRT-PCR	qualitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
RT	Raumtemperatur

RNA	Ribonukleinsäure
SLC2A1	solute carier family 2 member (GLUT-1)
ΤΑνι	Transkatheter-Aortenklappen-Implantation
VEC	valvular endothelial cell
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIC	valvular interstitial cell
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

Ζ	usamr	menfassung	I
S	umma	ary	II
A	bkürzı	ungsverzeichnis	III
1	Ein	nleitung	1
	1.1	Klinischer Hintergrund der Aortenklappendegeneration	1
	1.1	.1 Aufbau und Funktion der Aortenklappe	1
	1.1	.2 Aortenklappendegeneration	1
	1.1	.3 Therapeutische Ansätze	2
	1.2	Der Einfluss von Hif-1α auf die Herzklappe	4
	1.2	2.1 Hif-1α-Signalweg	4
	1.2	2.2 Hif-1α-Zielgene	5
2	Fra	agestellung	6
3	Ma	iterialien	7
	3.1	Geräte	7
	3.2	Verbrauchsmaterialien	8
	3.3	Software	11
	3.4	Kits	12
	3.5	Chemikalien	12
	3.6	Angesetzte Puffer und Lösungen	15
	3.7	RT-qPCR Primer	17
4	Me	ethoden	18
	4.1	Zellkulturmethoden	18
	4.1	.1 Sterilbank	18
	4.1	.2 3D-Spannmodell	18
	4.2	<i>Ex vivo</i> Modell	19
	4.2	2.1 Aufbau Bioreaktor	19
	4.2	2.2 Präparation der Aortenklappenkonduits	22
	4.2 unc	2.3 Durchlauf im Bioreaktorsystem unter Beeinflussung physic d hypoxischer Parameter	logischer 22
	4.3	Histologie	24
	4.3	3.1 Kryoschnitte	24
	4.3	3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	25
	4.3	8.3 Movat-Pentachrom-Färbung	25
	4.4	Semi-quantitative Genexpressionsanalyse	26
	4.4	.1 RNA-Isolation	27

	4.4	4.2	Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung	28
	4.4	4.3	Reverse Transkription	28
	4.4	4.4	Quantitative reverse transcriptase PCR	28
	4.5	Dat	tenverarbeitung und statistisches Verfahren	29
5	Er	gebr	lisse	30
	5.1	Op	timierung des Bioreaktorsystems	30
	5.2	1.1	Einfluss der Begasung	30
	5.2	1.2	Einfluss des Begasungsvolumens und des Druckes	33
	5.2	1.3	Einfluss der Pumpenumdrehungszahl	34
	5.2	1.4	Einfluss des Schlauchmaterials	35
	5.2	1.5	Fazit zur Kultivierung unter Hypoxie	37
	5.2	Exp	pression von Hif-1α-Zielgenen im Bioreaktormodell	38
	5.2	2.1	PCR-Analyse der VEGF-, SLC2A1-, CA9-Expression im Setting	1 39
	5.2	2.2	PCR-Analyse der VEGF-, SLC2A1-Expression im Setting 2	40
	5.3	His	tomorphologische Untersuchungsergebnisse der kultivierten	
	Aorte	enkla	appen	40
	5.3	3.1	HE-Färbung Bioreaktor	41
	5.3	3.2	Movat-Pentachrom-Färbung Bioreaktor	42
	5.3	3.3	HE-Färbung 3D-Spannmodell	43
	5.3	3.4	Movat-Pentachrom-Färbung 3D-Spannmodel	44
6	Di	skus	sion	46
	6.1	Bei	urteilung der Optimierungen und des Versuchsablaufs	46
	6.2	De	r Einfluss von Hypoxie auf die Genexpression	50
	6.3 Aorte	De enkla	r Einfluss von Hypoxie auf die Degeneration von nativen, ovinen appentaschen	52
	6.4	Scł	nlussfolgerungen	54
7	Ve	erzeio	chnisse	55
	7.1	Tal	pellenverzeichnis	55
	7.2	Abl	bildungsverzeichnis	56
	7.3	Lite	eraturverzeichnis	57
8	Da	anksa	agung	68

# 1 Einleitung

- 1.1 Klinischer Hintergrund der Aortenklappendegeneration
- 1.1.1 Aufbau und Funktion der Aortenklappe

Das menschliche Herz besitzt insgesamt vier Herzklappen. Man unterscheidet die Segelklappen und die Taschenklappen. Die Aortenklappe (Valva aortae) zählt zu den Taschenklappen und befindet sich an der Aortenwurzel zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta. Sie besteht aus drei halbmondförmigen Taschen (Valvulae seminlunares) mit jeweils einem feinen Knötchen (Noduli valvulae seminlunares) am Rand, der zum dichten Verschluss der Taschen dient. Die Funktion der Aortenklappe ist es den unidirektionalen Blutfluss zu gewährleisten und einen Rückstrom des ausgeworfenen Blutes aus den Kammern zu verhindern [1]. Mikroskopisch weist die Aortenklappe eine gefäßfreie, dreischichtige extrazelluläre Matrix (ECM) auf, die beidseitig von valvulären Endothelzellen (VEC) umgeben ist. Die VECs bilden eine Barriereschicht zum Blutstrom und beeinflussen die Klappenpermeabilität und inflammatorische Prozesse [2]. Die valvulären interstitiellen Zellen (VIC) bilden die Hauptzellen der Herzklappe und sind in allen Herzklappenschichten vorhanden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese der ECM und vermitteln Umbauprozesse der Matrixkomponenten [2, 3]. Die ECM bildet das Grundgerüst der Herzklappe und besteht aus der Lamina fibrosa, der Lamina spongiosa und der Lamina ventricularis. Die Fibrosa ist der Aorta zugewandt und besteht zum größten Teil aus Kollagenfasern, die dem Gewebe die nötige Festigkeit bei mechanischer Beanspruchung verleiht. Die in der Mitte gelegene Spongiosa enthält vor allem Glykosaminoglykane und bildet eine lockere Bindegewebsschicht. Die ventrikuläre Schicht enthält hauptsächlich Elastin und ermöglicht die elastische Beweglichkeit während der Systole und Diastole [4, 5].

### 1.1.2 Aortenklappendegeneration

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (CAVD) gehört zu einer der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen in den Industrieländern, die eine zunehmende Prävalenz in der alternden Bevölkerung zeigt. Rund 30% der über 65-jährigen in den westlichen Ländern leidet an einer Aortenklappensklerose [6, 7]. Es handelt sich um einen aktiven Degenerationsprozess, der durch eine fibrotische Verdickung des Taschengewebes charakterisiert ist, ebenso durch eine vermehrte Vaskularisation, Inflammation und Kalzifizierung [8, 9]. Funktionell gesehen entsteht bei Fortschreiten der Erkrankung eine Aortenklappenstenose. Abhängig vom Stenosegrad zeigt sich klinisch, nach initialer Asymptomatik, eine zunehmende Dyspnoe, Leistungsminderung, Schwindel und Angina pectoris [9]. Die erhöhte linksventrikuläre Druckbelastung bewirkt einen Funktionsverlust der Aortenklappe mit verminderter Ejektionsfraktion und kann unbehandelt in eine Herzinsuffizienz und den Tod führen [10]. Die bekannten klinischen Risikofaktoren umfassen das männliche Geschlecht, Tabakkonsum, arterielle Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus, erhöhte Level von LDL-Cholesterin und Lipoprotein(a) [7-11]. Eine zentrale Rolle bei der CAVD spielen die VICs, die für die Aufrechterhaltung der Klappenfunktion entscheidend sind. Diese können ihren Phänotyp abhängig von Umgebungsfaktoren verändern. Verstärkte hämodynamische Beanspruchung durch Bluthochdruck, erhöhten Scherstress und Dehnung bewirken eine Endothelzellschädigung und damit die Stimulation der VICs zur Initiierung von wird die VIC-Differenzierung Reparaturprozessen. Beeinflusst durch Wachstumshormone. Es kommt zu einer Phänotypveränderung der VICs, die zu pro-fibrotischen und pro-kalzifizierenden Prozessen an der Herzklappe führen. Die Zell- und Matrixzusammensetzung verändert sich infolge der pathologischen Bedingungen und es kommt zum Fortschreiten der CAVD durch Fibrosierung, Kalzifizierung und Versteifung der Aortenklappe [2, 3, 12-14].

#### 1.1.3 Therapeutische Ansätze

Weltweit sind etwa 3% der Bevölkerung über dem 75. Lebensjahr an einer Aortenklappenstenose erkrankt [15]. Das Mortalitätsrisiko bei Aortenklappenerkrankten ist im Gegensatz zu anderen Herzklappenerkrankungen wesentlich höher und steigt jährlich an [16]. Derzeit gibt es keine wirksame pharmakologische Therapie der Aortenklappenstenose. Medikamentöse Therapieansätze mit Statinen zur Senkung des LDL-Cholesterins als bekannter Risikofaktor der CAVD zeigten keine Wirkung auf das

Forstschreiten der Erkrankung und den damit verbundenen Komplikationen [17-20]. Auch die häufig eingesetzten ACE-Hemmer zeigten retrospektiv keine Effekte [21, 22]. Die Wirksamkeit anderer Medikamente wie DDP-4-Inhibitoren, Cadherin 11, Bisphosphonate, ENPP1-Inhibitoren und P2Y2 Agonisten wird in präklinischen und klinischen Studien erforscht [23-29].

Die einzigen etablierten Therapiemöglichkeiten bei fortgeschrittenen bzw. symptomatischen Herzklappenerkrankungen sind die chirurgische Behandlung und die interventionelle Behandlung mittels Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI) [30]. Deutschlandweit wurden 2022 insgesamt 38.492 Herzklappenoperationen durchgeführt, von denen die Aortenklappe mit fast 25.616 Eingriffen den Großteil ausmacht [31]. Dabei wird die Aortenklappe durch eine mechanische oder biologische Herzklappenprothese ersetzt. Die mechanische Klappe ist häufig als Zweiflügelklappe ausgeführt, welche sich durch ihre gute Hämodynamik und hohe mechanische Zuverlässigkeit auszeichnet [32]. Mechanische Klappenprothesen haben eine nahezu lebenslange Haltbarkeit, weshalb die amerikanischen und europäischen Richtlinien für Herzklappenerkrankungen ihre Verwendung bei Patienten unter 60 Jahren empfiehlt [33-36]. Voraussetzung zum Einsatz der Kunstklappe ist die dauerhafte Antikoagulation, die mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergeht [37]. Biologische Herzklappenprothesen enthalten Material von menschlichen (Homografts) bzw. tierischen Spendern (Xenografts). Deutschlandweit finden Xenografts am häufigsten Verwendung. Im Gegensatz zu einer mechanischen Klappe ist keine lebenslange Antikoagulation notwendig [38]. Die Haltbarkeit der Prothesen ist jedoch durch degenerative Prozesse, wie Restenosierung auf 10 -15 Jahre limitiert [39-42]. Die Indikation zum Einsatz von biologischen Herzklappenprothesen besteht daher bei Patienten über 70 Jahren oder bei Patienten mit erhöhtem Blutungsrisiko [34, 43].

Die Goldstandardbehandlung einer schweren CAVD ist der chirurgische Klappenersatz. In den letzten Jahren hat sich die TAVI als attraktive, weniger invasive Methode etabliert. Diese wird vor allem bei Patienten mit hohem Operationsrisiko oder bei bestehenden Komorbiditäten eingesetzt und zeigt eine häufigere Verwendung gegenüber dem chirurgischen Klappenersatz.

#### 1.2 Der Einfluss von Hif-1α auf die Herzklappe

#### 1.2.1 Hif-1α-Signalweg

Der Hypoxie-induzierte Faktor (Hif) ist ein Transkriptionsfaktor und Schlüsselregulator bei der Versorgung der Zelle mit Sauerstoff. Er besteht aus den zwei Untereinheiten Hif-1 $\alpha$  und Hif-1 $\beta$  (siehe Abb. 1). Unter normoxischen Bedingungen wird die Hif-1a-Untereinheit durch sauerstoffabhängige Prolyl-4hydroxylasen (PHDs) an zwei Prolinresten und durch Factor Inhibiting HIF (FIH) an einem Lysinrest hydroxyliert. Das hydroxylierte Hif-1a wird von der E3-Ubiquitin-Ligase Hippel-Lindau-Protein (pVHL) gebunden und proteasomal abgebaut [44-48]. Unter Hypoxie wird die HIF-1 $\alpha$ -Prolinhydroxylierung unterdrückt und Phosphorylierung von Hif-1a durch aktive Kinasen initiiert. Die stabilisierte Hif-1α-Untereinheit wandert in den Zellkern, wo sie als Komplex mit Hif-1β dimerisiert. Durch Bindung an Hypoxie-Response-Elemente (HRE) wird die Transkription von Genen aktiviert, die z. B. an Erythropoese, Glykolyse, pH-Regulation und Angiogenese beteiligt sind [49-51].



Abb. 1: Symbolische Übersicht über Hif-1α Signalweg

Bei Normoxie wird Hif-1α kontinuierlich proteasomal abgebaut, bei eintretender Hypoxie gelangt Hif-1α in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt. Roter Punkt: Hydroxilierung von Hif-1α durch PHD und FIH; Grüner Punkt: Phosphorylierung von Hif-1α durch spezifische Kinasen.

#### 1.2.2 Hif-1α-Zielgene

Die Akkumulation von Hif-1α führt zur transkriptionellen Hochregulierung von Genen, die an der hypoxischen Reaktion beteiligt sind. Zu den vermehrt bei Hypoxie exprimierten Genen gehören z.B. der vascular endothelial growth factor (VEGF), der solute carier family 2 member (SLC2A1) und die Carboanhydrase 9 (CA9). Eine ineffiziente Gefäßversorgung und die daraus resultierende Verringerung des Gewebesauerstoffpartialdrucks führen häufia zu Neovaskularisationen, um die Gewebeversorgung zu gewährleisten. Die kompensatorischen Mechanismen beruhen auf der Entwicklung von kollateralen Blutgefäßen in ischämischen Geweben. Maßgeblich daran beteiligt ist VEGF, der als Hypoxie-induzierter angiogener Faktor fungiert [52, 53]. Während eine hypoxische Umgebung eine große Auswirkung auf die Angiogenese hat, indem sie das Gefäßwachstum durch die Hif-1α / VEGF-Achse stimuliert, hat es zudem Einfluss auf Stoffwechselprozesse. Unter Hypoxie entsteht ein metabolischer Wechsel zur Glykolyse. Hierbei kommt es zur Überexpression des vom SLC2A1-Gen kodierten Glukosetransporters (GLUT-1), stimuliert durch HIF-1a [54, 55]. Dieser ermöglicht den Übertritt des Blutzuckers durch die Blut-Hirn-Schranke zum Gewebe. Carboanhydrasen gehören zu den Zinkmetalloenzymen, die die reversible Hydratation von Kohlendioxid katalysieren. Sie sind an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt, darunter Atmung, Verkalkung, Säure-Basen-Gleichgewicht, Knochenresorption und die Bildung von Kammerwasser, Liquor, Speichel und Magensäure. Die Carboanhydrase 9 (CA9) ist ein zellulärer Biomarker für Hypoxie. Die Promotorregion des CA9-Gens enthält ein HRE, an das Hif-1α binden kann, wodurch hypoxische Bedingungen die CA9-Expression erhöhen können [56, 57].

# 2 Fragestellung

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben, handelt es sich bei der CAVD um eine progrediente Erkrankung ohne bisherige konservative oder medikamentöse Heilungsmethoden. Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der Aortenklappendegeneration sind bis heute nicht vollständig verstanden. Aufgrund der Verdickung der Aortentaschen mit fortschreitender Degeneration, spielt Hypoxie eine wichtige Rolle.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen voll automatisierten, computergesteuerten Bioreaktor zur Kultivierung von ovinen Aortenklappen für hypoxische Bedingungen zu etablieren. Dieser ist in der Arbeitsgruppe bereits in früheren Arbeiten für Untersuchungen unter normoxischen Bedingungen genutzt worden [59, 60]. Für die Zellkultur etablierte Parameter für Hypoxie lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf *ex vivo* Modelle übertragen. Für die Etablierung hypoxischer Versuchsbedingungen sollen sowohl unterschiedliche Begasungsbedingungen analysiert, als auch Parameter im Versuchsaufbau, welche Auswirkungen auf den Sauerstoffaustausch im System haben (z.B. Schlaucharten), variiert werden.

Abschließend soll der Einfluss von Hypoxie auf die Morphologie der Taschen durch histologische Analysen histomorphologisch und durch die Analyse der Expression von Hif-1α-Zielgenen in ovinen Aortenklappentaschen mittels semiquantitativer *RT-PCR* molekularbiologisch untersucht werden.

Verglichen werden dabei Aortenklappentaschen, die in einem bereits etablierten 3D-Spannmodell unter Normoxie und Hypoxie kultiviert wurden. Die Fragestellung ist, ob die im Bioreaktor etablierten Parameter zu einer Veränderung der Expression von Hif-1α Zielgenen führen und mit dem statischen 3D-Spannmodell für Aortenklappentaschen vergleichbar sind.

Mit erfolgreicher Etablierung des Bioreaktor-Hypoxiemodells könnte dieses genutzt werden, um Aufschluss über die Beeinflussung des Krankheitsverlaufs der CAVD durch Hypoxie und mögliche medikamentöse Angriffspunkte durch Hif-1α-Inhibitoren zu geben.

# 3 Materialien

# 3.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Standort
Bioreaktor	Engineo GmbH	Kelkheim, Deutschland
Autoklav VX-95	Systec GmbH	Linden, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Gelaire	Sydney, Australien
BSB4		
Wasserbad	GFL Gesellschaft für	Burgwedel, Deutschland
	Labortechnik mbH	
Inkubatoren (1% O <sub>2</sub> , 20%	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
O <sub>2</sub> ) HERAcell 240i	Inc.	
Rollerpumpe	Stöckert Instrumente	München, Deutschland
	GmbH	
Vakuum Pumpe	KNF Neuberger GmbH	Freiburg, Deutschland
Notebook Nx6310	HP Inc.	Kalifornien, USA
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG	Deutschland
Ellipse Pro 160	Eaton Corporation	Dublin, Irland
Überspannungsschutz		
Feinwaage	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Spiegelreflexkamera	Canon Inc.	Tokio, Japan
Power Shot SX20IS		
Leuchtplatte slimlite LED	Kaiser Fototechnik GmbH	Buchen, Deutschland
	& Co.KG	
Elektronikrührer Mono	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
	Inc.	
Zentrifuge 5904 R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge		
Tischzentrifuge	Biozym	Hessisch Oldendorf,
		Deutschland
Vortexmischer REAX	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
2000	GmbH und Co. KG	
Thermomixer 5436	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

T3000 Thermocycler	Biometra GmbH (Analytik	Göttingen (Jena),
	Jena AG)	Deutschland
StepOnePlus <sup>™</sup> Real-Time	ThermoFisher Scientific	Schwerte, Deutschland
PCR System	GmbH	
Tecan Reader, infinite	Tecan Deutschland	Crailsheim, Deutschland
M1000 PRO	GmbH	
Art-Miccra D-8	Miccra GmbH	Heitersheim, Deutschland
(Homogenisator)		
Probenbeutel	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Kryostat Leica CM 1950	Leica Mikrosysteme	Wetzlar, Deutschland
	Vertrieb GmbH	
Systemmikroskop Leica	Leica Mikrosysteme	Wetzlar, Deutschland
DM 2000	Vertrieb GmbH	
Easyferm Plus VP 120	Hamilton Bonaduz AG	Bonaduz, Schweiz
(pH-Sonde)		
Visiferm Do 120 (O <sub>2</sub> -	Hamilton Bonaduz AG	Bonaduz, Schweiz
Sonde)		
Tomporaturoondo	En alla a Onabili	Kalkhaim Dautachland

# 3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Standort
Silikonschlauch 0,5 mm	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Silikonschlauch 4 mm	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Silikonschlauch 12 mm	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Silikonschlauch 12,7 mm	RCT Reichelt	Heidelberg, Deutschland
(1/2 Zoll)	Chemietechnik GmbH &	
	Co.	

Silikonschlauch 9,5 mm	RCT Reichelt	Heidelberg, Deutschland
(3/8 Zoll)	Chemietechnik GmbH &	
	Co.	
Pumpenschlauch 12,7	Raumedic AG	Helmbrechts, Deutschland
mm (1/2 Zoll)		
Kautschukschlauch 10	RCT Reichelt	Heidelberg, Deutschland
mm	Chemietechnik GmbH &	
	Co.	
Kabelbinder, Breite =	RS Components	Corby, UK
3.5mm		
Kabelbinder, Breite =	RS Components	Corby, UK
2.5mm		
Konnektor	Cormed Medizintechnik	Rüthen, Deutschland
	GmbH & Co. KG	
Y-Konnektor 3/8 x 1/2 x	Cormed Medizintechnik	Rüthen, Deutschland
1/2	GmbH & Co. KG	
MPX 320-39	Applied Critical Fluids	Mannheim, Deutschland
(Stecksystem)	GmbH	
Schlauchbinder 17-22mm	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Schlauchbinder 12-17mm	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Schlauchbinder 9-14mm	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Schlauchbinder 7-12mm	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Schlauchbinder 5-10mm	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Filter Midisart 2000	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Deckel GL45 mit Dichtring	Duran Group GmbH	Wertheim, Deutschland
O-Ring 15,5 x 3mm	Arcus GmbH	Kelkheim, Deutschland
Oxygenierungskammer	freundliche Leihgabe Prof.	Dr. A. Lichtenberg
(Glas)		

Herzklappenkammer	freundliche Leihgabe Prof. Dr. A. Lichtenberg	
(Glas)		
Druckluft	Air liquide S.A.	Paris, Frankreich
Kohlenstoffdioxid	Air liquide S.A.	Paris, Frankreich
Stickstoff	Air liquide S.A.	Paris, Frankreich
Flüssiger Stickstoff	Air liquide S.A.	Paris, Frankreich
Tube 15 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen,
		Deutschland
Tube 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen,
		Deutschland
Petrischale 9 cm	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Prolene Faden 4-0	Ethicon Inc.	Bridgewater, USA
Skalpell	Feather Safety Razor Co.	Osaka, Japan
	LTD	
Raucodrape® PRO	Lohmann & Rauscher &	Rengsdorf, Deutschland
(Klebetuch)	Co. KG	
Combi-Stopper	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
OP-Handschuhe	Semperit AG	Wien, Österreich
Cryomold 17 x 17 x 5 mm	Weckert Labortechnik	Kitzingen, Deutschland
KP-CryoCompound	Klinipath – a VWR	Duiven, Niederlande
	Company	
Cyrotube 2 ml	Biosigma S.r.l.	Cona, Italien
Deckgläser 24 x 50 mm	Engelbrecht Medizin- und	Edermünde, Deutschland
	Labortechnik GmbH	
Objektträger 24 x 50 mm	Paul Marienfeld & Co. KG	Lauda Königshofen,
		Deutschland
Faltenfilter	Machery-Nagel GmbH &	Düren, Deutschland
	Co. KG	
Messpipetten (5, 10, 25	Costar Corning	Wiesbaden, Deutschland
ml)	Intercorporated	
Mikropipetten (2.5, 10, 20,	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
100, 200, 1000, 3000,		
5000 µI)		

Reaktionsgefäße (0.2, 0.5,	BioSigma s.r.l.	Cona, Italien
1.5, 2 ml)		
Multiwell Platten (6,12, 96)	Greiner Bio-One GmbH	Kremsmünster,
		Deutschland
Polypropylen 200 x 300	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
mm	KG	
Silikonschlauch ½"x3/32	Free Life Medical GmbH	Aachen, Deutschland
60cm, unsterile VE 10		
Mini-Spike	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Filter	Ahlstrom-Munksjö Oyi	Helsinki, Finnland
Nadelspitzen:	Becton, Dickinson and	Franklin Lakes, USA
BD Vacutainer Safety-Lok	Company	
21Gx3/4"x12" (Ø=0,8mm)		

# 3.3 Software

Software	Hersteller
Tissue controller, IO Server	Engineo GmbH
Fiji GPL v2	Johannes Schindelin, Albert Cardona,
	Mark Longair, Benjamin Schmid, und
	andere
GNU Octave 5.1.0	John W. Eaton
GraphPad PRISM v9	GraphPad Software inc.
StepOnePlus Software v2.3	Thermo Fisher Scientific Inc.
LAS v3.8	Leica Camera AG
Microsoft Office 2021	Microsoft Corporation

## 3.4 Kits

Kit	Hersteller	Standort
RNeasy MiniKit	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen	Hilden, Deutschland
QIAshredder	Qiagen	Hilden, Deutschland
QuantiTect Reverse	Qiagen	Hilden, Deutschland
Transcription Kit		
GoTaq qPCR Master Mix	Promega GmbH	Mannheim, Deutschland

## 3.5 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Standort
Amphotericin B, 50 mg,	Medicopharm AG	Nußdorf/Inn, Deutschland
Fungizone		
Dulbecco's Modified	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Eagle's Medium (DMEM)		
+ GlutaMAX <sup>™</sup> -I		
Dulbecco's Phosphate	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Buffered Saline (DPBS)		
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland
(FCS)	GmbH	
Incidin Liquid	Ecolab Deutschland	Monheim am Rhein,
	GmbH	Deutschland
Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
NaCI-Lösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Nicht essentielle	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland
Aminosäuren (NEAA)	GmbH	
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
2-Methylbutan/ Isopentan	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
pH-Puffer pH = 9.21	Hamilton Bonaduz AG	Bonaduz, Schweiz
pH-Puffer pH = 9.21	Hamilton Bonaduz AG	Bonaduz, Schweiz

ß-Glycerolphosphat-	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland
Disodium-Pentahydrat	GmbH	
		(Spannversuch)
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	(Spannversuch)
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland
	GmbH	
Hämatoxylin liquid	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Hämatoxylin solid	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland
	GmbH	
Xylol	VWR International GmbH	Radnor, USA
Ethanol 70%, 96%, 99,8%	Zentralapotheke UKD	Düsseldorf, Deutschland
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Roti Histokitt II	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Ammoniumhydroxid 30%	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Pikrinsäure	VWR International GmbH	Radnor, USA
Formaldehylösung 4%,	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
37%	KG	
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland
	GmbH	
Alcianblau	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland
	GmbH	
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland
	GmbH	
Phosphotungistic Acid	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland
	GmbH	
Jod	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	
Kaliumiodid	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland
	KG	

Brilliant Crocein R	Waldeck GmbH & Co. KG	Münster, Deutschland	
Säurefuchsin	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland	
	KG		
Safran du Gatinais	Waldeck GmbH & Co. KG Münster, Deutschla		
Salzsäure 32 – 37%	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland	
	KG		
Aqua dest.	Otto Fischer GmbH & Co.	Saarbrücken,	
	KG	Deutschland	
Nuclease-freies Wasser	Qiagen	Hilden, Deutschland	
Trizol	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland	
	GmbH		
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland	
	GmbH		
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie	München, Deutschland	
	GmbH		
RNAse Away	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland	
	KG		
RNAse freies Wasser	Qiagen Kit	Hilden, Deutschland	
Destroy-SR-15 (RNA-Iso)	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf,	
		Deutschland	
RDD Puffer	Qiagen	Hilden, Deutschland	
DNAse	Qiagen	Hilden, Deutschland	
DTT	Carl Roth GmbH & Co. +	Karlsruhe, Deutschland	
	KG		
Buffer RLT	Qiagen	Hilden, Deutschland	
gDNA Wipeout Buffer	Qiagen	Hilden, Deutschland	
RT Buffer	Qiagen	Hilden, Deutschland	
RT Primer Mix	Qiagen	Hilden, Deutschland	
Reverse Transkriptase	Qiagen	Hilden, Deutschland	

Puffer/ Lösung	Bestandteile
Amphotericin B	50 mg Amphotericin B
	100 ml NaCl 0,9%
Kulturmedium	500 ml DMEM Medium
	50 ml FCS (10%)
	10 ml Pencillin/Streptomycin (2%)
	5 ml Amphotericin B (1%, 5 μg/ml finale
	Konz.)
	5 ml nicht essentielle Aminosäuren
	(1%)
Kaliumchloridlösung 3M	22,37 g Kaliumchlorid
	ad Aqua dest. 100 ml
Puffer zum Abspülen der Aorta	500 ml PBS
	5 ml Pen/Strep (1%)
	5 ml Amphotericin B (1%, 5 µg/ml finale
	Konz.)
Calciumchlorid	0,8324g Calciumchlorid
	ad Aqua dest. 5 ml
β-Gylcerolphosphat-Sodium-	6,122 g β-Gylcerolphosphat-Sodium-
Pentacholat	Pentacholat
	ad Aqua dest. 20 ml
Eosin-Lösung	1 g Eosin
	ad Aqua dest. 100 ml
	100 ml 100% Ethanol
	200 µl Essigsäure
Essigsäure 4 – 5%	10 ml Essigsäure
	ad Aqua dest. 190 ml
Alkalischer Alkohol	40 ml Ammoniumhydroxid (30%)
	360 ml Ethanol (96%)
Bouin's Lösung	20 ml Essigsäure (100%)
	100 ml Formaldehyd (37%)

# 3.6 Angesetzte Puffer und Lösungen

	300 ml Pikrinsäure (wässrig gesättigt)
Natriumthiosulfat 5%	10 g Natriumthiosulfat
	ad Aqua dest. 200 ml
Alcianblau 1%	2 g Alcianblau
	ad Aqua dest. 200 ml
Alkoholisches Hämatoxylin 2%	10 g Hämatoxylin
	500 ml Ethanol (96%)
Eisenchlorid	12,4 g Eisen-Chlorid-Hexahydrat
	5 ml Salzsäure (32 – 37%)
	ad Aqua dest. 500 ml
Jodlösung	10 g Jod
	20 g Kaliumjodid
	ad Aqua dest. 500 ml
Weigert's Eisenhämatoxylin	20 ml Jodlösung
	40 ml Eisenchlorid
	60 ml Hämatoxylin (2%)
Brilliant Crocein R Stock	4 g Brilliant Crocein R
	ad Aqua dest. 398 ml
Säurefuchsin Stock	0,5 g Säurefuchsin
	2,5 ml Essigsäure (100%)
	ad Aqua dest. 497,5 ml
Crocein-Säurefuchsin	20 ml Säurefuchsin
	80 ml Brilliant Corcein R Stock
Phosphorwolframsäure 5%	25 g Phosphorwolframsäure
	ad Aqua dest. 500 ml
Eisessig 1%	5 ml Essigsäure (100%)
	ad Aqua dest. 495 ml
Alkoholischer Safran	12 g Safran du Gatinais
	200 ml Ethanol (100%)
DTT	9,8 ml RLT
	200 µl 2M DTT Lösung

# 3.7 RT-qPCR Primer

Zielgen	Forward Primer	Reverse Primer
VEGF	CGGATCAAACCTCACCAAAG	AAATGCTTTCTCCGCTCTGA
SLC2A	GCACCAGCTAGGCATCGT	GGGATGAAGATGACGCTCAG
1		
CA9	GTGCCTATGAGCAGTTGCTG	AAGTAGCGGCTGAAGTCAGA
	TC	GG

# 4 Methoden

## 4.1 Zellkulturmethoden

## 4.1.1 Sterilbank

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Zellkulturbank. Die genutzten Materialien waren stets steril verpackt oder wurden im Vorhinein mittels eines Autoklavs sterilisiert und von außen mit Oberflächendesinfektionsmittel bzw. Ethanol gereinigt. Die verwendeten Proben stammen von 6 Monate alten Kälbern aus einem örtlichen Schlachthof (Laame GmbH Wuppertal, Germany). Die Herzen wurden nach der Schlachtung kühl transportiert und frisch verarbeitet. Eine sterile Arbeitsweise wurde gründlich durchgeführt.

## 4.1.2 3D-Spannmodell



Abb. 2: 3D-Spannmodell

Exemplarisch dargestellt sind die aufgespannten Taschen der ovinen Aortenklappen in einer 6-Well-Platte

Das 3D-Spannmodell ist eine etablierte Untersuchungsmethode bei der *in vitro* ovine Aortenklappentaschen statisch unter verschiedenen Rahmenbedingungen kultiviert werden [58, 60]. Die Aortenklappentaschen wurden aus frischen Schafsherzen unter sterilen Bedingungen präpariert. Für die Verwendung der Gewebe ist keine Tierversuchsgenehmigung nötig. Aus jeder Aortenklappe wurden jeweils drei Aortenklappentaschen gewonnen. Die herausgeschnittenen

Taschen wurden in PBS gewaschen und auf 3 – 4 mm dicke Gummiringe mit einem Durchmesser von  $\frac{1}{2}$  Zoll gespannt. Fixiert wurden die Ränder durch 1 cm lange Nadeln. Die aufgespannten Aortenklappentaschen wurden einzeln in die Well-Platten mit 10 ml frisch angesetztem Kulturmedium gesetzt (siehe Abb. 2). Die ovinen Aortenklappentaschen (n=6) wurden unter drei verschiedenen Bedingungen Normoxie (21% O<sub>2</sub>), Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) und Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) mit degenerativen Faktoren (ß-Glycerolphosphat + Calciumchlorid) für jeweils 7 und 14 Tage inkubiert. Kultiviert wurde das Gewebe in einem Inkubator, mit dem die Temperatur, Feuchtigkeit und der CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>-Gehalt geregelt werden kann. Ein Mediumwechsel fand nach jeweils 3,5 Tagen (12 Well-Platten) oder 7 Tagen (6 Well-Platten) statt. Das Gewebe wurde anschließend in PBS gewaschen und für weitere Untersuchungszwecke bei -80°C gelagert.

#### 4.2 Ex vivo Modell

In der vorliegenden Arbeit wird ein computergesteuertes Bioreaktorsystem genutzt, das die Kultivierung von ovinen Aortenklappen unter kontrollierten Bedingungen und einem pulsierenden Fluss durch die Klappe als adäquate und effektive Umgebung zur Analyse der Degeneration der Aortenklappe ermöglicht [59, 60].

#### 4.2.1 Aufbau Bioreaktor

Der Bioreaktor besteht aus einem Schlauchsystem und zusätzlich integrierten Komponenten zur Regulation und Beurteilung der Funktionsweise (Abb. 3).

Die Oxygenierungskammer dient zum direkten Gasaustausch. Über zwei seitliche Anschlussstellen wird ein durch den Bioreaktor kontrolliertes Gasgemisch gefiltert zu- und wieder abgeführt. An der oberen Öffnung der Oxygenierungskammer wird die pH-Sonde angebracht. Die beiden unteren Öffnungen bilden die Verbindungen für die Herzklappenkammer und das Schlauchsystem.

Die Herzklappenkammer besteht aus einer inneren und äußeren Kammer, die zylindrisch geformt sind. Die innere Kammer besteht aus zwei gegenüberliegenden Glasrohren, die an zwei Glasstäben seitlich befestigt sind.

An der Innenseite der Glasrohre befinden sich zwei kurze Schlauchstücke in deren Mitte die Aortenkonduits eingebracht und eingenäht werden können. Die äußere Kammer wird über die innere Kammer gestülpt und in ein Gewinde gedreht, welches durch einen Gummiring und Verschlussdeckel abgedichtet wird. Kongruent zur inneren Kammer, weist die äußere Kammer drei Oliven auf. Mittig wird die Temperatursonde angebracht und die restlichen Anschlüsse werden blind verschlossen.

An die Herzklappenkammer ist über ein spezielles Stecksystem ein Schlauch angebracht. Das Schlauchsystem ist das Verbindungsstück zu den gläsernen Komponenten und bildet einen Kreislauf. Es dient zum Durchfluss des Kulturmediums und wird am unteren Ende in eine Pumpe angebracht. Die verwendeten Schläuche weisen unterschiedliche Dicken und Durchmesser auf, abhängig von der Beanspruchung und Funktion. Aufgrund der mechanischen Belastung werden die Pumpenschläuche nach jedem Versuchsablauf ausgetauscht. Verbunden sind die Schläuche über Konnektoren. Ein Y-Konnektor dient dabei als Verbindungsstück zwischen dem Schlauchsystem und Oxygenierungskammer. Am anderen Ende ist die der pO<sub>2</sub>-Sonde angeschlossen. Die Dichtigkeit im Bioreaktorsystem wird gewährleistet durch Schlauchschellen, Kabelbindern, Schläuchen Anbringen von oder Verschlusskappen an Verbindungsstellen.

Die Temperaturregulation erfolgt über eine Heizmanschette. Die Heizmanschette wird um das Schlauchsystem angelegt und an freie Abschnitte eine Wärmeisolierung angebracht, damit die Temperatur konstant gehalten wird.

Alle Kammern, Schläuche und Einbauteile können für Reinigungszwecke demontiert werden und sind autoklavier- und wiederverwendbar.



Abb. 3: Übersicht des gesamten Bioreaktors

A: Gesamte Bioreaktoreinheit mit zwei Kammern; a: Rollerpumpe, b: Kontrollbox, c: Heizmanschette, d: Isolation, e: pH-Sonde, f: Druck Indikator, g: Barometer CO2, h: Barometer Druckluft, i: Schutzbox cave: Modifikationen am Aufbau als Teil der Etablierung (siehe Abb. 5) B: Aufbau des Kammersystems; a: Schlauch, b: Herzklappenkammer, c: pO<sub>2</sub>-Sonde, d: Temperatursonde, e: pH-Sonde, f: Luftfilter; verändert nach Niazy et al., Biomedecines, 2021, Degeneration of Aortic Valves in a Bioreactor System with Pulsatile Flow

Die Steuerung des **Bioreaktors** erfolgen Bedienung und über die TissueController-Software. Die Software ist eigens für das Bioreaktormodell entwickelt worden und befindet sich auf einem PC, der mit dem Bioreaktor verbunden ist. Die Steuerungssoftware enthält drei Registerkarten: Anlagenübersicht, Messwert-Historie und Alarme. Die Anlagenübersicht stellt die aktuellen Messwerte dar und dient zum Einstellen der Messgrößen. Die Temperatur, der Druck, der pH-Wert und die Pumpenumdrehungszahl können dabei ausgewählt, geregelt und gemessen werden. Der Sauerstoffpartialdruck wird ebenfalls gemessen.

Die Messwert-Historie ermöglicht die graphische Darstellung der Messwertverläufe der unterschiedlichen Parameter. Die gemessenen Daten werden vom *IOServer* in die Datenbank übertragen und können am Ende eines Versuchs zur weiteren Auswertung in eine *Excel* Tabelle exportiert werden.

Die Registerkarte Alarme hat eine Warnfunktion und zeigt aktuelle Störungsmeldungen an.

#### 4.2.2 Präparation der Aortenklappenkonduits

Das Aortenkonduit besteht aus der Aortenwurzel mit der Aortenklappe (siehe Abb. 4). Am oberen Ende befindet sich die Aorta und das untere Ende wird durch einen Myokardring begrenzt. Das Gewebe wird in gekühltem PBS gewaschen und anschließend über Nacht in einem angesetzten Standardmedium bei 37°C kultiviert, um kontaminiertes ovines Gewebe auszuschließen.



Abb. 4: Aortenkonduit präpariert

# 4.2.3 Durchlauf im Bioreaktorsystem unter Beeinflussung physiologischer und hypoxischer Parameter

Die Kultivierung der ovinen Aortenkonduits im Bioreaktor erfolgt unter sterilen Bedingungen in den Kultivierungskammern. Die Einzelteile der Kultivierungskammer und die Messgeräte, wie die pH-Sonde, pO<sub>2</sub>-Sonde und Temperatursonde, werden zunächst autoklaviert. Unter der Sterilbank erfolgt der Zusammenbau der einzelnen Komponenten. Das am Tag zuvor präparierte und über Nacht kultivierte Aortenklappenkonduit wird mit sterilen chirurgischen Instrumenten und Nahtmaterial mit Einzelknopfnähten am Schlauchstück der inneren Kammer befestigt. Vor Inbetriebnahme des Bioreaktors wird die Heizmanschette des Bioreaktors über die Steuerungssoftware und das Kulturmedium auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Durch das Vorwärmen sollen optimale Startbedingungen zur Kultivierung des ovinen Gewebes gewährleistet werden, um das Abkühlen und den Untergang von Zellen zu verhindern. Die Kultivierungskammer wird über die obere Öffnung der Oxygenierungskammer mit circa 500 ml Kulturmedium befüllt. Der richtige Füllstand ist auf Höhe der Oxygenierungskammer am Übergang des schmalen Halses zum breiten Rand erreicht. Die pH-Sonde wird in die obere Öffnung der Oxygenierungskammer eingebracht, sodass die Referenzelektrode in das Medium ragt. Zuletzt werden alle Verbindungsstellen auf Leckagen überprüft und festgezogen. Die Anbringung der Kultivierungskammer erfolgt an Stativklemmen der zentralen Bioreaktoreinheit. Eine Befestigungsposition befindet sich am Hals der Oxygenierungskammer, eine andere zwischen den Ringscheiben der Herzklappenkammer. Über die Oxygenierungskammer wird die dazugehörige Schutzhaube angebracht. In den letzten Schritten erfolgen die Anschlüsse zwischen dem Bioreaktor und der Kultivierungskammer. Die mit Filtern versehenen Gasschläuche an der Oxygenierungskammer werden mit den Bioreaktorschläuchen verbunden. Der Pumpenschlauch wird in die Pumpe eingebracht. Diese erzeugt einen pulsatilen Fluss in Richtung der Herzklappenkammer, wodurch sich die eingenähte Aortenklappe öffnen und schließen kann. Die Schlauchleitungen werden in die Heizmanschette eingelegt und die restlichen, freien Abschnitte mit Wärmeisolierungen versehen. Die pHpO<sub>2</sub>-Sonde und der Temperaturfühler werden mit den Sonde, die Anschlusskabeln am Bioreaktor verbunden.

Die Einstellung der Rahmenbedingung zur Kultivierung der ovinen Aortenklappenkonduits erfolgt über die Steuerungssoftware. Verglichen wird die Kultivierung der ovinen Aortenkonduits unter Hypoxie und Normoxie. Dabei werden dieselben Rahmenbedinungen gewählt, mit Ausnahme der Begasung (Tabelle 1). Bei Normoxie wird Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in einem bestimmten Verhältnis, in Abhängigkeit des pH-Wertes, automatisiert durch die Bioreaktorsoftware zugeführt (REM). Der Zufluss der Gase unter Hypoxie ist das Ergebnis aus den Etablierungsversuchen. Die Parametereinstellungen werden über die Anlagenübersicht vorgenommen.

Tabelle 1: Parameter-Einstellung

Normoxiebioreaktor		Hypoxiebioreaktor	
	Laufzeit	72 h	
	Luft-Zufluss	0	
	CO <sub>2</sub> - Zufluss	0,02 L/min	
bar	N <sub>2</sub> - Zufluss	0,2 L/min	
	Druck	107 mbar	
	рН	7,35	
I	Temperatur	37°C	
	Pumpe	50 rpm	
	Dar	Hypoxiebiore   Laufzeit   Luft-Zufluss   CO2- Zufluss   N2- Zufluss   Druck   pH   Temperatur   Pumpe	

.2 L/min 07 mbar ,35 7°C 0 rpm Der Bioreaktorlauf wird nach Eingabe der Sollwerte gestartet. Da der Bioreaktor ein vollautomatisiertes System ist, müssen keine weiteren Veränderungen vorgenommen werden. Regelmäßig wird das System auf Störungen, Kontaminationen und Dichtigkeit überprüft. Die Messhistorie veranschaulicht dabei graphisch Veränderungen, die gegebenenfalls aufgehoben werden

müssen. Die kultivierten Aortenklappen werden am Ende des Versuchs nach 72 Stunden geerntet und in PBS gereinigt. Die drei Taschenklappen werden herauspräpariert und erneut in PBS gewaschen. Eine der drei Taschen wird für die histologische Beurteilung in KP-CryoCompound eingebettet (siehe Abschnitt 4.3), die anderen beiden Taschen zur quantitativen Genanalyse (siehe Abschnitt 4.4) in Micro-Tubes gelagert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert werden die

gewonnen Präparate bei -80°C.

#### 4.3 Histologie

4.3.1 Kryoschnitte

Zur histologischen Beurteilung der morphologischen Veränderungen der Aortenklappentaschen unter verschiedenen Bedingungen im 3D-Spannmodell und ex vivo Modell Bioreaktor erfolgt die Gewinnung des Gewebes nach jedem Durchlauf. Dafür werden die zu untersuchenden Präparate in KP-CryoCompound eingebettet, mittels Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Damit wird die langfristige Nutzbarkeit und Haltbarkeit der Gewebeproben gewährleistet und Strukturveränderungen wie z.B. durch Denaturierung von Proteinen verhindert. Im Anschluss erfolgt die Herstellung von 10 µm dünnen Schnitten am Kryostaten. Die Schnittpräparate werden für histologische Untersuchungszwecke auf Glasobjektträger aufgezogen und bei -20 °C weitergelagert.

#### 4.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gehört zu dem Standard der histopathologischen Übersichtsfärbungen zur Beurteilung der Gewebearchitektur, Gewebereaktionen und dem Nachweis von Ablagerungen, Fremdgewebe oder Nekrosen. Bei dieser Färbung unterscheidet man die sauren Farbstoffe (Eosin) und die basischen Farbstoffe (Hämatoxylin). Das acidophile Eosin bindet an positiv geladene Gruppen, wie (extra-) zelluläre Proteine und färbt diese rot. Das basophile Hämatoxylin bindet an negativ geladene Gruppen, wie Zellkernen, endoplasmatischem Retikulum, Ribosomen und färbt diese blau. Die Färbung erfolgt durchgehend unter dem Abzug. Die Kryoschnitte werden zunächst in vorher gefiltertem Hämatoxylin 1 min lang eingefärbt. Anschließend erfolgt die einminütige Reinigung in destilliertem Wasser und die Behandlung in 4-5% iger Essigsäure für 1 min. Unter fließendem Leitungswasser werden die Kryoschnitte 2 min lang gewaschen. Fixiert werden die Schnitte in 70% Alkohol für 1 min und werden dann für 12 min in Eosin B gefärbt. Die stufenweise, schonende Entwässerung zur Verhinderung eines Zellschrumpfens erfolgt mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol, Xylol). Zuletzt werden die Kryoschnitte an der Luft getrocknet, mit dem ROTI Histokitt II eingedeckt und unter einem Deckglas konserviert.

#### 4.3.3 Movat-Pentachrom-Färbung

Bei der Movat-Pentachrom-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung zur Darstellung aller Komponenten des Bindegewebes. Das Gewebe wird mit

Alcianblau, Weigert's Eisenhämatoxylin, Crocein-Säurefuchsin und alkoholischem Safran gefärbt.

Zellkerne und elastische Fasern erscheinen schwarz, Muskulatur rot, kollagenes und retikuläres Bindegewebe gelb, Glykosaminoglykane grün und Fibrin intensiv rot. Die Färbung erfolgt durchgehend unter dem Abzug und die Kryoschnitte werden über Nacht bei Zimmertemperatur auf 37°C aufgetaut. Diese werden zunächst für vier Minuten in destilliertem Wasser, danach 10 min in 4%iger Formalinlösung und erneut für 5 Minuten in destilliertem Wasser fixiert. In eine vorher auf 100°C erhitzte Bouin's Lösung werden die Präparate 10 min lang gefärbt. Für weitere 10 min werden die Präparate unter fließendem, kaltem Leitungswasser gespült, für 5 min in 5%igem Natriumthiosulfat fixiert und in destilliertem Wasser (5 min) gereinigt. Im nächsten Schritt erfolgt die Färbung mit 1% igem Alcianblau für 20 min. Nach einem Waschvorgang von 3,5 min werden die Kryoschnitte in erhitztem alkalischen Alkohol (60°C) für 10 min stabilisiert. Der Waschvorgang wird erneut für 3,5 min unter fließendem Leitungswasser wiederholt und neun Minuten lang in Weigert's Eisenhämatoxylin gefärbt. Nach einer einminütigen Reinigung mit Leitungswasser, wird ein erneutes Waschen mit jeweils frischem, destilliertem Wasser (5 min) durchgeführt. Es erfolgt die Anfärbung mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsin für 1 min und in einem Zwischenschritt eine Reinigung mit destilliertem Wasser (5 min). Im vorletzten Schritt werden diese in 5% iger Phosphorwolframsäure differenziert, 1% iger Essigsäure für jeweils 5 min gespült und erneut mit destilliertem Wasser gereinigt (5 min). Sukzessiv werden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96%, 100% Ethanol) entwässert, mit Safran 8 min lang gefärbt und mit 100% igem Alkohol zweimal für 1 min gespült und dehydratisiert. Im letzten Schritt erfolgt die Entfettung mit Xylol dreimal für jeweils 5 min und das Eindecken mit ROTI Histokitt II und Deckglas.

#### 4.4 Semi-quantitative Genexpressionsanalyse

Zur Bestimmung der Genexpression wird die *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR) angewendet. Mit verschiedenen, etablierten Methoden ist es möglich aus Proben die RNA zu isolieren, in eine *messenger RNA* (mRNA) umzuwandeln, in *complementary desoxyribonucleic*
*acid* (cDNA) umzuschreiben und im letzten Schritt die spezifische Genanalyse durchzuführen.

### 4.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgt an ovinen Aortenklappen aus dem 3D-Spannversuchmodell und dem Bioreaktor. Die Gewebeproben werden zunächst aufgetaut und in ein Eppi mit 350 µl Trizol überführt. Es handelt sich hierbei um eine einphasige Lösung, die die RNase-Aktivität hemmt und für eine kontaminationsfreie Gesamt-RNA sorgt. Mit Hilfe eines Homogenisiersystems werden die Aortenklappentaschen vollständig in einzelne Partikel zerkleinert, sodass eine homogene, feinverteilte Suspension entsteht. Diese Flüssigkeit wird für 15 min auf Eis gekühlt.

Im nächsten Schritt erfolgt die Phasentrennung. Hierfür werden weitere 650 µl Trizol hinzugegeben, was eine sequentielle Ausfällung von Nukleoproteinkomplexen ermöglicht. Zusätzlich wird 200 µl Chloroform in jedes Tube pipettiert und gründlich vermischt. Die homogene Flüssigkeit beginnt sich hierbei in eine wässrige obere Schicht, eine Interphase und eine rötliche untere Schicht zu separieren. RNA und Kohlenhydrate sammeln sich in der wässrigen Phase, die DNA in der Interphase und Proteine sowie Lipide in der organischen Phase. Zur vollständigen Phasentrennung wird die Probelösung für 25 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugationsschritt kommt das Qiagen RNeasy Mini Kit unter Anleitung der Herstellerangaben zum Einsatz. Die wässrige Phase wird unter strenger Trennung von der Interphase abpipettiert und zur gleichen Menge 70% Ethanol hinzugegeben. 700 µl des RNA-Ethanol-Gemisches wird auf eine RNeasy Säule gegeben. Sukzessiv erfolgt die Aufreinigung der RNA durch Zentrifugation und Gabe von Puffern nach den Herstellerangaben. Der Durchfluss, der am Ende bleibt, enthält die aufgereinigte RNA. Limitierend für weitere Untersuchungszwecke, wie die qPCR, kann die Menge an gewonnener RNA sein. was neben dem Gewebetyp, auch durch die Homogenisierungstechnik bzw. durch die Aufreinigung beeinflusst wird.

### 4.4.2 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt durch eine photometrische Messung und wird in ng/µl gemessen. Mit Hilfe eines *Tecan Readers* kann sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der Probe gemessen werden. Hierfür werden 2 µl der RNA-Probe auf eine Mikroplatte pipettiert und die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Das entspricht dem Absorptionsmaxium aller Nukleinsäuren. Die zusätzliche Messung bei 280 nm dient der Detektion von Verunreinigungen durch Proteine oder andere Partikel. Daraus ergibt sich ein 260/280-Quotient, der ab einem Wert > 2 als Verunreinigung zu werten ist.

### 4.4.3 Reverse Transkription

Als wichtiger Zwischenschritt zur Genexpressionsbestimmung wird die RNA mittels der reversen Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben. Die cDNA enthält im Gegensatz zur DNA keine Introns. Verwendet wird das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* unter Verwendung der Herstellerangaben. Umgeschrieben werden 100 ng/µl RNA mit den beigesetzten Reagenzien. Alle Schritte im Umgang mit den RNA-Proben werden auf Eis durchgeführt. Die gewonnene cDNA wird bei -20°C gelagert.

## 4.4.4 Quantitative reverse transcriptase PCR

Die qRT-PCR ist ein Verfahren zur Amplifikation der cDNA, die auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruht. Die Quantifizierung der vervielfältigten DNA ist durch Fluoreszenzmessung möglich. Verwendet wird der DNA-Farbstoff SYBR Green I, der in die DNA interkaliert. Das Fluoreszenzsignal nimmt mit jedem Zellzyklus an Intensität zu und dient als Maß für die Genexpressionsrate. Für den Versuchsbeginn wird die cDNA auf 5 ng/µl mit RNase-freiem Wasser verdünnt und mit Primern, Rnase-freiem Wasser und dem *GoTaq<sup>R</sup> qPCR Master Mix* versetzt (Tabelle 2). Die hinzugegebenen Primer sind unter Abschnitt 3.7 zu finden.

### Tabelle 2: Reaktionsansatz qRT-PCR

Reagenz	Volumen pro Well
cDNA (5 ng/µl)	2 µl
GoTaq <sup>R</sup> qPCR Master Mix	10 µl
RNase-freies Wasser	7,4 µl
Primer Forward (10 pmol/µl)	0,3 µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	0,3 µl
Total	20 µl

Die qRT-PCR erfolgt unter Verwendung des *Thermocyclers StepOnePlus<sup>TM</sup> real time PCR System* und des *GoTaq<sup>R</sup>* q*PCR Master Mix* nach Anleitung des Herstellers. Die relativen Genexpressionslevel wurden anhand der delta-delta-CT ( $\Delta\Delta$ Ct) -Methode berechnet. Diese vergleicht die Differenz der Expression ( $\Delta$ Ct) zwischen dem gewünschten Gen und dem Referenzgen zunächst unter den Versuchsbedingungen und separat in entsprechenden Positivkontrollen. Anschließend wird die Differenz ( $\Delta\Delta$ Ct) zwischen den experimentellen und den Positivkontrollproben berechnet.

# 4.5 Datenverarbeitung und statistisches Verfahren

Aufnahmen von histologischen Gewebeproben wurden mit der Leica DM2000 und der Leica Appilcation Software LAS V3.8 angefertigt. Die statischen Auswertungen der Datensätze sowie die Erstellung der Graphen erfolgten mit Pad Prism Version 9. Alle Ergebnisse wurden Graph als Mittelwert±Standardfehler angegeben. Die Signifikanz wurde mit nichtparametrischen Tests bestimmt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde zum paarweisen Vergleich von Normoxie- und Hypoxiebedingungen durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

# 5 Ergebnisse

# 5.1 Optimierung des Bioreaktorsystems

Als Ausgangspunkt dient ein Bioreaktorsystem, das bereits erfolgreich zur Kultivierung von ovinen Aortenklappen zur Beurteilung der Klappendegeneration unter normoxischen Bedingungen etabliert ist [59, 60]. Teil der Fragestellung ist bestehende Bioreaktorsystem zur Kultivierung der es, das ovinen Aortenklappenkonduits unter Hypoxie zu optimieren und etablieren. Es werden Testversuche unter Betrachtung aller regulierbaren Parameter zur Beeinflussung des Sauerstoffpartialdrucks vorgenommen. Dazu gehören die Temperatur, der Sauerstoffpartialdruck, das Begasungsvolumen, die Schlauchbeschaffenheit, die Druckverhältnisse, die Pumpenumdrehung und das Begasungssetting im System. Dabei wird darauf geachtet, dass die Kultivierungsbedingungen physiologisch bleiben und die Sollwerte nicht zu stark verändert werden.

## 5.1.1 Einfluss der Begasung

Zur Senkung des Sauerstoffpartialdrucks wird Stickstoff verwendet und die Position der Gaszufuhr variiert, um die Effizienz des Gasaustauschs zu verbessern. Hierfür werden verschiedene Versuchseinstellungen (Settings) untersucht. In der ersten Versuchseinstellung ("Setting 1"), welches dem bestehenden Versuchsaufbau unter Normoxie entspricht, erfolgt die Begasung über die Oxygenierungskammer (Abb. 5 A). Der Gasaustausch findet über die Oberfläche der Flüssigkeit in der Oxygenierungskammer statt. In der zweiten und dritten Versuchseinstellung ("Setting 2" und "Setting 3") erfolgt die Gaszufuhr über den oberen (Abb. 5 B) bzw. unteren Anschluss der Herzklappenkammer (siehe Abb. 5 C), wodurch der Gasfluss teilweise durch das Medium erfolgt.



Abb. 5: Schematische Übersicht über das computergesteuerte Bioreaktorsystem mit pulsierendem Fluss.

A: "Setting 1" - Begasung über die Oxygenierungskammer. B: "Setting 2" - Begasung über Herzklappenkammer oben. C: "Setting 3" - Begasung über Herzklappenkammer unten. Die Oxygenierungskammer dient zum Gasaustausch (1). Der pH-Wert (2), der Sauerstoffpartialdruck (3) und der Druck werden gemessen und aufrechterhalten. Die Temperatur (4) wird durch die Heizmanschette (5) gemessen und geregelt. Das Kulturmedium wird von einer pulsierenden Rollenpumpe (6) durch die Herzklappe geleitet.

Untersucht wird der Einfluss auf den Sauerstoffpartialdruck in den drei verschiedenen Versuchseinstellungen unter Verwendung verschiedener Gasvolumina von 0,02 L/min, 0,5 L/min und 1,0 L/min Stickstoff (Abb. 6). Das Ziel ist es zu ermitteln, wie viel Stickstoff notwendig ist, um den Sauerstoffpartialdruck signifikant zu senken. In allen Versuchseinstellungen erfolgt zunächst eine kontinuierliche Begasung mit Stickstoff für 15 min, um zu testen, ob eine Senkung des Sauerstoffpartialdrucks erreicht werden kann.

Anschließend erfolgt ein Begasungsstopp für 45 min, um zu bestimmen, ob der verringerte Sauerstoffpartialdruck im aktuellen Versuchsaufbau gehalten wird.

Bei Setting 1 (Abb. 6 A) wird über die Vorbegasung mit 0,5 L/min und 1,0 L/min ein Sauerstoffpartialdruck von 275 mbar erreicht. Eine Vorbegasung mit 0,02 L/min zeigt kaum Veränderungen des Sauerstoffpartialdrucks. Es besteht ein signifikanter Unterschied von 0,5 L/min bzw. 1,0 L/min im Verhältnis zu 0,02 L/min, während sich die Senkung durch eine Begasung von 0,5 L/min und 1,0 L/min nicht signifikant unterscheidet.

Bei Setting 2 (Abb. kann eine maximale Senkung 6 B) des Sauerstoffpartialdrucks auf 100 mbar mit einer Begasung von 0,5 L/min und 1 L/min erreicht werden, was signifikant im Vergleich zum Startzeitpunkt ist. Eine 0,02 L/min führt zu einer Begasung mit leichten Senkung des Sauerstoffpartialdrucks auf 290 mbar, was signifikant zum Startzeitpunkt ist. Im Vergleich zeigt sich ein signifikanter Unterschied von 0,5 L/min und 1,0 L/min zu 0,02 L/min. Nach dem Begasungsstopp kommt es unter allen Bedingungen zum Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks.

In Setting 3 zeigt sich ein ähnliches Bild (Abb. 6 C). Der Sauerstoffpartialdruck sinkt kongruent bei 0,02 L/min auf 290 mbar und bei 0,5 L/min auf 100 mbar. Beim Begasungsvolumen von 1,0 L/min kann sogar ein Sauerstoffpartialdruck von 90 mbar erreicht werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass für optimale hypoxische Bedingungen eine Stickstoffzufuhr von 0,5 L/min ausreicht, um den Sauerstoffpartialdruck signifikant zu senken.

Im direkten Vergleich (Abb. 6 D) zeigt sich, dass bei gleicher Begasung in Setting 2 und 3 ein signifikant ( $p \le 0.05$ ) niedrigerer Partialdruck erreicht wird, als bei Setting 1. Für weitere Folgeversuche wird daher das Setting 2 ausgewählt, da es einerseits eine signifikante ( $p \le 0.05$ ) Senkung des Sauerstoffpartialdrucks bewirkt und andererseits vom Gasfluss physiologischer ist als das Setting 3.

Nach dem Begasungsstopp kommt es bei allen Settings und Begasungsmengen zum erneuten Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks. Dies lässt vermuten, dass ohne kontinuierliche Stickstoffzufuhr ein Gasaustausch des Systems mit der Außenluft stattfindet, wodurch der Stickstoff entweder das System verlässt und/oder Sauerstoff in das System aus der Außenluft eindringt.



Abb. 6: Einfluss der Begasungseinstellungen auf den Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck (in mbar) wurde gegen die Laufzeit (in h) aufgetragen. Dargestellt ist der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks in Abhängigkeit der zugeführten Gasvolumina in drei unterschiedlichen Versuchseinstellungen. A: "Setting 1" - Begasung über Oxygenierungskammer, n = 3; B: "Setting 2" – Begasung über Herzklappenkammer oben, n = 3; C: "Setting 3" - Begasung über Herzklappenkammer unten, n = 3; D: "Setting 1-3" - im Vergleich mit 1,0 L/min. Die verwendeten Gasvolumina sind farblich gekennzeichnet. Schwarz = 0,02 L/min, dunkelgrau = 0,5 L/min, grau = 1,0 L/min. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt des Begasungsstopps. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, 2-Way-ANOVA. \*: p ≤ 0,05 zum Zeitpunkt null. \$: p ≤ 0,05 von 0,5 L/min bzw. 1,0 L/min zu 0,02 L/min.

### 5.1.2 Einfluss des Begasungsvolumens und des Druckes

Anschließend werden unterschiedliche Fluss- und Druckverhältnisse untersucht. Dazu wird der Sauerstoffpartialdruck durch Begasung mit 0,5 L/min auf 100 mbar gesenkt und der Sauerstoffpartialdruck über 1,5 h bei einer kontinuierlichen Stickstoffzufuhr mit unterschiedlichen Volumina gemessen (Abb. 7 A). Hierbei zeigt sich bei einer Dauerbegasung mit Stickstoff von 0,1 L/min, 0,2 L/min und 0,4 L/min ab einer halben Stunde ein konstanter Sauerstoffpartialdruck, der über die Zeit hinweg unverändert bleibt. Das Begasungsvolumen von 0,4 L/min erreicht einen Sauerstoffpartialdruck von 90 mbar, 0,2 L/min 110 mbar und 0,1 L/min 140 mbar. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede von 0,4 L/min zu 0,2 und zu 0,1 L/min und ein signifikanter Unterschied von 0,2 L/min zu 0,1 L/min. In Abb. 7 B werden die gleichen Versuchsbedingungen bei einem Druck von 0 mbar untersucht. Es zeigt sich im Vergleich zu Abb. 7 A kein Unterschied des Sauerstoffpartialdrucks unter niedrigen Druckverhältnissen. Daraus lässt sich ableiten, dass unterschiedliche Druckverhältnisse keinen Einfluss auf den Sauerstoffpartialdruck haben. Für weitere Versuchssettings wird ein Druck von 107 mbar gewählt.



Abb. 7: Einfluss des Begasungsvolumens und Drucks auf den Sauerstoffpartialdruck

Der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks (in mbar) über die Zeit (in h) ist in Abhängigkeit der zugeführten Gasvolumina bei einem Druck von 107 mbar (A) und unter niedrigen Druckverhältnissen 0 mbar (B) dargestellt, jeweils n = 3. Die verwendeten Gasvolumina sind farblich gekennzeichnet. Schwarz = 0,1 L/min, dunkelgrau = 0,2 L/min, grau = 0,4 L/min. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, 2-Way-ANOVA. \*:  $p \le 0,05$  zum Zeitpunkt null. \$:  $p \le 0,05$  von 0,2 L/min bzw. 0,4 L/min zu 0,1 L/min. #:  $p \le 0,05$  von 0,2 L/min zu 0,4 L/min.

### 5.1.3 Einfluss der Pumpenumdrehungszahl

Um den Einfluss der Pumpenumdrehungszahl zu untersuchen, werden Pumpenumdrehungen von 5, 10, 15, 20 und 50 rpm getestet (Abb. 8). Die Pumpe, die an das System des Bioreaktorkammersystems angeschlossen ist, erzeugt einen pulsatilen Fluss. Dieser ist notwendig, um durch Scherstress das Öffnen und Schließen der Aortenklappe wie im lebenden Organismus zu imitieren. Zum Startzeitpunkt beträgt der Sauerstoffpartialdruck 100 mbar in allen Bedingungen. Grafik A zeigt den Sauerstoffpartialdruck über 1,5 Stunden bei 5 rpm gegenüber 50 rpm und Grafik B zusätzlich die Sauerstoffpartialdruckkurven

aller untersuchten Bedingungen. Die Pumpenumdrehung hat hierbei keinen signifikanten Einfluss auf den Sauerstoffpartialdruck.



Abb. 8: Einfluss der Pumpenumdrehungszahl auf den Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck (in mbar) wird gegen die Laufzeit (in h) aufgetragen. In Grafik A ist der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks bei einer Pumpenumdrehung von 5 und 50 rpm dargestellt (n = 3; Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). In Grafik B ist der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks bei einer Pumpenumdrehung von 5 – 50 rpm dargestellt, Mittelwerte von n = 3, auf Fehlerbalken wurde der Übersicht halber verzichtet. Die verwendeten Pumpenumdrehungen sind farblich gekennzeichnet. Schwarz = 5 rpm, dunkelgrau = 10 rpm, grau = 15 rpm, hellgrau = 20 rpm, weiß = 50 rpm. Statistische Analyse mit 2-Way-ANOVA.

### 5.1.4 Einfluss des Schlauchmaterials

Neben den für den Bioreaktorlauf gewählten Parametern ist das Material selbst eine mögliche Quelle für Gasaustausch mit der Umgebung. Daher werden die Silikonschläuche, mit denen das Bioreaktormodell etabliert wurde, mit weniger gasdurchlässigen Kautschukschläuchen verglichen. Der Sauerstoffpartialdruck wird auf circa 100 mbar herunterreguliert und anschließend die Gaszufuhr komplett gestoppt und beobachtet, über welches Schlauchsystem am besten ein niedriger Sauerstoffpartialdruck im System gehalten werden kann. In Abb. 9 A wird in beiden Systemen sichtbar, dass der Sauerstoffpartialdruck ansteigt. Nach 1,5 h stagnieren beide Kurvenverläufe des Sauerstoffpartialdruck zwischen 250 mbar und 270 mbar. Hier sind keine signifikanten Unterschiede sichtbar. Die beiden unteren Grafiken stellen einen vergrößerten Ausschnitt der oberen Grafik dar. Grafik B veranschaulicht den Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks zwischen den Schlauchsystemen innerhalb der ersten 2,5 Stunden. Dabei zeigt sich in den ersten 1,25 Stunden ein signifikanter Unterschied ( $p \le 0.05$ ) des Sauerstoffpartialdrucks zwischen den Silikon- und Kautschukschläuchen. Im Bioreaktorsystem mit dem Silikonschlauch ist der Stickstoffverlust anfangs höher als im System mit dem Kautschukschlauch. Danach jedoch stagniert in beiden Systemen die Sauerstoffpartialdruckkurve und es gibt keinen signifikanten Unterschied mehr. Grafik C veranschaulicht in einem vergrößerten Ausschnitt von Grafik A, wie der Sauerstoffpartialdruck zwischen der fünften und zehnten Stunde konstant in beiden Systemen gehalten wird. Mit den Silikonschläuchen liegt der Sauerstoffpartialdruck bei ungefähr 290 mbar und mit den Kautschukschläuchen bei circa 270 mbar, es besteht kein signifikanter Unterschied. Daraus lässt sich ableiten, dass die Verwendung unterschiedlicher Schlauchsysteme den Gasaustausch zwar nicht dauerhaft verhindern kann, jedoch einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Gasaustauschs hat.



Abb. 9: Einfluss des Schlauchmaterials auf den Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck (in mbar) wurde gegen die Laufzeit (in h) aufgetragen. A: Der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks über die Zeit wurde ohne Gaszufuhrbei einem Startpartialdruck von 100 mbar in zwei verschieden Schlauchsystemen mit Silikon (grau) und Kautschuk (schwarz) für 20 Stunden gemessen. B: Vergrößerte Darstellung des Zeitabschnitts 0 – 2,5 Stunden in C: Vergrößerter Darstellung des Zeitabschnitts 5 – 10 Stunden , jew. n = 3. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, 2-Way-ANOVA. \$:  $p \le 0,05$  (Kautschuk zu Silikon).

# 5.1.5 Fazit zur Kultivierung unter Hypoxie

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das ideale Bioreaktorsetting zur Kultivierung der Aortenklappenkonduits unter Hypoxie bei einem Druck von 107 mbar, Temperatur von 37°C, und einer Pumpenumdrehung von 50 rpm liegt. Für die Gaszufuhr wird eine initiale Begasung mit 0,5 L/min Stickstoff-Zufluss für circa 15 min verwendet, bis der Sauerstoffpartialdruck auf 100 mbar gesunken ist. Anschließend wird kontinuierlich mit einem Gemisch von 0,2 L/min Stickstoff und 0,02 L/min CO<sub>2</sub> begast. Bei diesen Konditionen liegt der pH Wert stabil bei 7,35 (siehe Tabelle 3).

Hypoxiebioreaktor	
Luft-Zufluss	0
CO <sub>2</sub> - Zufluss	0,02 L/min
N <sub>2</sub> - Zufluss	0,2 L/min
Druck	107 mbar
рН	7,35
Temperatur	37°C
Pumpe	50 rpm

Tabelle 3: Parameter-Einstellung Bioreaktorsystem unter Hypoxie

Beim Aufbau des Bioreaktorsystems hat die Position der Gaszufuhr und das Material der verwendeten Schläuche einen signifikanten Effekt auf die Senkung des Sauerstoffpartialdrucks. Optional erweist sich dabei die Begasung am oberen Ende der Herzklappenkammer und die Verwendung von Kautschukschläuchen für das Schlauchsystem. Die beiden verwendeten Schlauchtypen führen unter den oben genannten Bedingungen zu leichter bzw. starker Hypoxie, deren Auswirkung auf die Aortenklappe nachfolgend untersucht wird.

# 5.2 Expression von Hif-1α-Zielgenen im Bioreaktormodell

Um zu untersuchen, ob die gewählten Versuchsbedingungen zu einer Aktivierung von Hypoxie-Signalwegen führen, werden Aortenklappenkonduits unter Normoxie und Hypoxie entweder nach Setting 1 (Begasung mit Druckluft, Gaszufluss über die Oxygenierungskammer, Silikonschläuche) oder nach Setting 2 (Begasung mit Stickstoff, Gaszufluss über die obere Seite der Herzklappenkammer, Silikon und Kautschukschlauch) kultiviert. Die Kultivierung in Setting 2 findet bei kontinuierlicher Begasung mit 0,2 L/min Druckluft bzw. Stickstoff und 0,02 L/min CO<sub>2</sub>, einem Druck von 107 mbar, einer Temperatur von 37°C, einem pH von 7,35 und einer Pumpenumdrehung von 50 rpm über 72 h statt.

Nach erfolgreicher Bioreaktorkultivierung wird das gewonnene Gewebe auf molekularbiologischer Ebene und histologisch untersucht.

### 5.2.1 PCR-Analyse der VEGF-, SLC2A1-, CA9-Expression im Setting 1

Zunächst wird die Expression der Hif-1a-Zielgene (VEGF, SLC2A1, CA9) in ovinen Aortenklappentaschen nach Inkubation im Bioreaktorsystem unter (n=4) Normoxie und Hypoxie (n=3) bei Begasung über die Oxygenierungskammer und Verwendung von Silikonschläuchen (Setting 1) untersucht. Dies entspricht den Standardbedingungen früherer Arbeiten [59, 60]. Es soll evaluiert werden, ob die Senkung des Sauerstoffpartialdrucks unter hypoxischen Bedingungen für eine Hochregulation von VEGF, SLC2A1 bzw. CA9 ausreicht. Weder für VEGF (Abb. 10 A) noch für SLC2A1 (Abb. 10 B) oder CA9 (Abb. 10 C) zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Kultivierungsbedingungen.



Abb. 10: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Genexpression von VEGF (A), SLC2A1 (B) und CA9 (C) bei Begasung über die Oxygenierungskammer mit Silikonschläuchen (Setting 1, 72h Kultivierung, siehe Abb. 5 A)

Die Begasung erfolgte mit Druckluft (Normoxie, n=4) oder Stickstoff (Hypoxie, n =3) n = 3. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kultivierungskonditionen (Mann-Whitney-U-Test).

### 5.2.2 PCR-Analyse der VEGF-, SLC2A1-Expression im Setting 2

Als nächstes wird die Expression der Hif-1α-Zielgene VEGF und SLC2A1 nach Kultivierung im Setting 2 (Begasung über oberes Ende der Herzklappenkammer, Silikonschläuche) durchgeführt. Auch hier wird überprüft, ob die Senkung des Sauerstoffpartialdrucks unter Stickstoffzufluss ausreicht, um eine Hochregulation von VEGF bzw. SLC2A1 zu erreichen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der VEGF- oder SLC2A1-Expression.

Eine PCR-Analyse der kultivierten Proben mit Kautschukschläuchen ist aufgrund der geringen Ausbeuten bei der RNA-Extraktion nicht möglich.



Abb. 11: PCR-Analyse der Genexpression von VEGF, SLCA1 im Bioreaktor Setting 2, 72h Kultivierung, Silikonschläuche

A: VEGF-Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach  $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kultivierungskonditionen, n = 3. B: SLC2A1-Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach  $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kultivierungskonditionen, n = 3. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, Mann-Whitney-U-Test.

# 5.3 Histomorphologische Untersuchungsergebnisse der kultivierten Aortenklappen

Die Morphologie der Aortenklappentaschen unter den gewählten Versuchsbedingungen mit Normoxie und Hypoxie im Bioreaktor wird untersucht und mit einem statischen 3D-Spannmodell verglichen. Verwendet werden die allgemein verbreiteten Färbeverfahren der Histologie. Diese Methoden dienen zur Färbung der Gewebeschichten und Strukturen und objektiven Feststellung morphologischer Veränderungen oder Beständigkeit.

### 5.3.1 HE-Färbung Bioreaktor

12 veranschaulicht die Hämatoxylin-Eosin-Färbung von kultivierten Abb. Aortenklappentaschen über 72 Stunden im Bioreaktormodell unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Histologisch zeigt die Kultivierung der Aortenklappentaschen über 72 Stunden unter Normoxie in allen Settings (Setting 1 [n = 4], Setting 2 [n= 3]) keine signifikanten Unterschiede. Die Gewebeintegrität und die Dreischichtigkeit der Gewebeschichten aus den Laminae fibrosa, spongiosa und ventricularis bleibt unter Normoxie erhalten und unverändert. Unter hypoxischen Verhältnissen bleibt die Gewebeintegrität und Dreischichtigkeit in Setting 1 (n = 4) und Setting 2 mit Silikonschlauch (n = 3) ebenfalls erhalten. Dagegen geht im Setting 2 mit Kautschukschlauch (n = 3) unter Hypoxie die Gewebeintegrität verloren.





Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Aortenklappentaschen nach 3 Tagen Kultivierung unter Normoxie (oberes Feld) und unter Hypoxie (unteres Feld) im Bioreaktor. A, D: Setting 1 mit Silikonschlauch, Begasung über Oxygenierungskammer; B, E: Setting 2 mit Silikonschlauch, Begasung über oberen Herzklappenkammeranschluss; C, F Setting 2 mit Kautschukschlauch, Begasung über oberen Herzklappenkammeranschluss. Repräsentative Darstellung von vier verschiedenen Präparaten in Setting 1 und drei verschiedenen Präparaten in Setting 2. Rot = Kollagen, blau = Zellkern. Maßstäbe = 100 µm.

### 5.3.2 Movat-Pentachrom-Färbung Bioreaktor

Zur Analyse der Dreischichtigkeit wurde nach Kultivierung im Bioreaktor eine Movat-Pentachrom-Färbung durchgeführt (Abb. 13) Histologisch zeigt die Kultivierung der Aortenklappentaschen über 72 Stunden unter Normoxie in allen Settings (Setting 1 n = 4, Setting 2 n= 3) keine Unterschiede und die Gewebeintegrität und die Dreischichtigkeit der Gewebeschichten aus den *Laminae fibrosa, spongiosa* und *ventricularis* zeigen keine Veränderungen. Unter hypoxischen Verhältnissen zeigt die Gewebeintegrität und Dreischichtigkeit in Setting 1 (n = 4) und Setting 2 mit Silikonschlauch (n = 3) keine Veränderungen. Dagegen geht im Setting 2 mit Kautschukschlauch (n = 3) unter Hypoxie die Gewebeintegrität verloren und weist in allen Schichten eine zerstörte Gewebearchitektur auf.





Pentachrom-Färbung von Aortenklappentaschen nach 3 Tagen Kultivierung unter Normoxie (oberes Feld) und unter Hypoxie (unteres Feld) im Bioreaktor. A, D: Setting 1 mit Silikonschlauch, Begasung über Oxygenierungskammer; B, E: Setting 2 mit Silikonschlauch, Begasung über oberen Herzklappenkammeranschluss; C, F Setting 2 mit Kautschukschlauch, Begasung über oberen Herzklappenkammeranschluss. Repräsentative Darstellung von vier verschiedenen Präparaten in Setting 1 und drei verschiedenen Präparaten in Setting 2. Schwarz = Zellkerne, elastische Fasern, gelb = Kollagen, grün = Glykosaminoglykane, intensiv rot = Fibrin, rot = Muskulatur. Maßstäbe = 100 µm.

### 5.3.3 HE-Färbung 3D-Spannmodell

Zum Vergleich wird histologisch Gewebe von Aortenklappen eines 3D-Spannmodells untersucht, in welchem die Hochregulation von HIF-1α gegeben ist. Dieses Vergleichs-Gewebe stammt aus einem weiteren Projekt der Arbeitsgruppe, welches bisher noch nicht publiziert wurde. Dort wurde die durch Hypoxie veränderte Expression von Hif-1a Zielgenen mittels semi-quantitativer RT-PCR nachgewiesen (unpublizierte Daten von Sarah Bandar, Arbeitsgruppe Niazy).

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Übersichtsfärbung der Schichten der Aortenklappentaschen und eine Darstellung morphologischer Veränderungen möglich. Verglichen werden ovine Aortenklappentaschen (n = 6), die im 3D-Spannmodell unter drei verschiedenen Bedingungen unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>), Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) und Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) mit degenerativen Faktoren (ß-Glycerolphosphat + Calciumchlorid) für jeweils sieben und vierzehn Tagen kultiviert wurden.

In Abb. 14 sind die drei Schichten der Aortenklappentaschen aus den *Laminae fibrosa, spongiosa* und *ventricularis* sichtbar dargestellt. Das acidophile Eosin färbt das Zytoplasma, die Mitochondrien und das Kollagen rot und das basophile Hämatoxylin die Zellkerne blau. Die Gewebeschichten sind dabei rot gefärbt und weisen unregelmäßig verteilte, blau gefärbte Zellkerne auf. Die *Laminae fibrosa* und *ventricularis* weisen aufgrund ihrer höheren Zelldichte eine verstärkte Farbintensität auf. Die *Lamina spongiosa* ist zellärmer und aufgrund der lockeren Struktur heller gefärbt und weist Aussparungen auf.

In allen Bedingungen sind die Gewebeintegrität und die Dreischichtigkeit aus den Laminae fibrosa, spongiosa und ventricularis nach sieben und vierzehn Tagen erhalten. Auffällig ist eine Zunahme der Taschendicke unter allen drei Kultivierungsbedingungen nach vierzehn Tagen im Vergleich zu den Taschen nach sieben Tagen Kultivierung. Die Gewebevermehrung ist vor allem in der Lamina spongiosa sichtbar. Im Vergleich zur Bioreaktorkultivierung (siehe Abschnitt 5.3.1) zeigt sich, dass im statischen Modell die Gewebeintegrität auch unter Hypoxie für einen längeren Zeitraum erhalten bleibt, während in der 2 dynamischen Kultivierung im Bioreaktor unter Setting mit Kautschukschläuchen Gewebeschäden auftreten.



Abb. 14: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Aortenklappen im 3D-Spannmodell

Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Aortenklappentaschen nach 7 Tagen (oberes Feld) und nach 14 Tagen Kultivierung (unteres Feld) im 3D-Spannmodell. A, D: Normoxische Bedingung (21% O<sub>2</sub>); B, E: Hypoxische Bedingung (1% O<sub>2</sub>); C, F: Hypoxische Bedingung (1% O<sub>2</sub>) mit degenerativen Faktoren bestehend aus ß-Glycerolphosphat und Calciumchlorid. Repräsentative Darstellung von sechs verschiedenen Präparaten. Rot = Kollagen, blau = Zellkern. Maßstäbe = 100  $\mu$ m.

### 5.3.4 Movat-Pentachrom-Färbung 3D-Spannmodel

Die drei Bindegewebsschichten der ovinen Aortenklappentaschen weisen unterschiedlich hohe Anteile der extrazellulären Matrix auf. Die Movat-Pentachrom-Färbung ermöglicht die Differenzierung dieser Bindegewebskomponenten. Zellkerne und elastische Fasern erscheinen schwarz, Muskulatur rot, kollagenes und retikuläres Bindegewebe gelb, Glykosaminoglykane grün und Fibrin intensiv rot. Die Fibrosa ist eine kollagenreiche Bindegewebsschicht und erscheint bei der Movat-Pentachrom-Färbung gelb. Die *Spongiosa*, als lockere Bindegewebsschicht, enthält Glykosaminoglykane und erscheint blaugrün. Die *Ventricularis* wird durch den erhöhten Anteil an elastischen Fasern und kollagenem Bindegewebe gelbschwarz gefärbt.

Verglichen werden ovine Aortenklappentaschen (n = 6), die im 3D-Spannmodell unter drei verschiedenen Bedingungen unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>), Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) und Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) mit degenerativen Faktoren (ß-Glycerolphosphat +

Calciumchlorid) für jeweils sieben und vierzehn Tagen kultiviert werden (Abb. 15).

Sowohl bei einwöchiger als auch bei zweiwöchiger Kultivierung ist die Gewebeintegrität erhalten und die Dreischichtigkeit in allen Bedingungen gegeben. Die *Lamina fibrosa* ist gelb, die *Lamina spongiosa* blaugrün und die *Lamina ventricularis* ist gelbschwarz in allen Versuchsgruppen gefärbt. In den jeweiligen Schichten zeigen sich somit keine Veränderungen am Anteil der Zellkomponenten. Es fällt auf, dass es zu einer Zunahme der *Lamina spongiosa* nach vierzehn Tagen im Vergleich zu sieben Tagen Kultivierung kommt und die Taschendicke zunimmt.



Abb. 15: Movat-Pentachrom-Färbung der Aortenklappen im 3D-Spannmodell

Movat-Pentachrom-Färbung von Aortenklappentaschen nach 7 Tagen Kultivierung (oberes Feld) und nach 14 Tagen Kultivierung (unteres Feld) im 3D-Spannmodell. A, D: Normoxische Bedingung (21% O<sub>2</sub>); B, E: Hypoxische Bedingung (1% O<sub>2</sub>); C, F: Hypoxische Bedingung (1% O<sub>2</sub>) mit degenerativen Faktoren bestehend aus ß-Glycerolphosphat und Calciumchlorid. Repräsentative Darstellung von sechs verschiedenen Präparaten. Schwarz = Zellkerne, elastische Fasern, gelb = Kollagen, grün = Glykosaminoglykane, intensiv rot = Fibrin, rot = Muskulatur. Maßstäbe = 100 µm.

# 6 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Methode eines voll automatisierten, computergesteuerten Bioreaktorsystems unter hypoxischen Bedingungen etabliert und charakterisiert werden. Das hierfür verwendete ovine Herzklappengewebe konnte erfolgreich in dem System kultiviert werden und mit einem statischen Modell verglichen werden.

Die Kultivierung im Bioreaktor wurde anschließend mittels eines pulsatilen Flusses des Kulturmediums zunächst unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurden der pH, der Druck, die Temperatur und der Sauerstoffpartialdruck eingestellt. Es erfolgte die Durchführung mehrerer Optimierungsschritte zur bedarfsgerechten Einstellung aller gewünschten Parameter für eine Kultivierung unter Hypoxie.

Im Folgenden werden nun die verwendeten Methoden, die damit erzielten Ergebnisse und die möglichen Perspektiven des Systems diskutiert.

## 6.1 Beurteilung der Optimierungen und des Versuchsablaufs

Es ist bekannt, dass es sich bei der CAVD um einen aktiven Prozess handelt. Die Ursachen sind multifaktorieller Genese, die im Zusammenspiel die charakteristischen, zellmorphologischen Veränderungen hervorrufen [12].

Hierfür stehen verschiedene Methoden zur näheren Untersuchung zur Verfügung. *In vitro* Messungen bilden die Klappenveränderungen bei physiologischer zyklischer Belastung nicht vollständig ab [61, 62]. Daher sind alternative Modellsysteme erforderlich, die die physiologischen Bedingungen während des Öffnens und Schließens der Aortenklappe durch eine pulsatile Strömung widerspiegeln. In dieser Arbeit spielt maßgeblich der Bioreaktor als *ex vivo* Modell eine wichtige Rolle. Dieser eröffnet die Möglichkeit, im Gegensatz zu statischen *in vitro* Modellen, weitere Einflussfaktoren zu untersuchen. Dazu gehört vor allem der mechanische Scherstress [63, 63].

Bioreaktoren, die einen pulsatilen Fluss durch eine intakte Aortenklappe erzeugen, sind hauptsächlich im Zusammenhang mit Tissue Engineering bekannt und werden daher in Experimenten mit Tissue-Engineering-Bioprothesen oder dezellularisierten Konduits eingesetzt [65, 66].

In derzeitigen Studien existieren verschiedene Bioreaktormodelle zur Kultivierung und Untersuchung von intaktem biologischem Gewebe [67].

Engler et al. entwickelten ein Bioreaktorsystem zur Untersuchung des Sauerstoffverbrauchverhaltens ganzer Rattenlungen [68]. Ähnlich dem hiesigen Bioreaktorsystem befindet sich das Gewebe im Bioreaktor, der über Schläuche Oxygenator und Pumpsystem verbunden ist. Über mit einem das Oxygenatorelement erfolgt die Sauerstoffanreicherung des Mediums, welche mit Hilfe des Pumpsystems zum Lungensystem im Bioreaktor zum Sauerstoffverbrauch weitergeleitet wird. Neben dem grundsätzlich ähnlichen Aufbau sind zwei große Unterschiede aufzuzählen. Es handelt sich um ein Modell. welches sich in einem Inkubator befindet. wobei die Temperaturregulation indirekt über den Inkubator erfolgt. Zum anderen erfolgt der Gasaustauch über den Oxygenator mit der Inkubatorluft bzw. bei Hypoxie durch Entfernen des Sauerstoffkreislaufs, Verschließen der Luftfilter und Austausch aller Silikonschläuche durch PharMed-Schläuche mit geringer Sauerstoffdurchlässigkeit. Die Verwendung von gasundurchlässigeren Schläuchen wird im Bioreaktorsystem in dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

Sucosky et al. entwickelten ein ex vivo Bioreaktorsystem unter dem Gesichtspunkt des Scherstresses auf kardiovaskuläres Gewebe [69]. Hierbei wird das Gewebe auf eine Kegel-Platte mit Medium eingebettet, wo ein rotierender Servomotor mit Geschwindigkeit Scherspannungsschwankungen erzeugt. Überzeugend ist die lange Kultivierungsdauer von 120 h und die Kultivierung von neun Gewebeproben gleichzeitig. Im Gegensatz zum Bioreaktor erfolgt in der vorliegenden Arbeit keine kontinuierliche Perfusion des Gewebes, da es durchgehend im gleichen Medium eingebettet ist. Zudem findet keine strenge Temperaturregulation über Sonden oder Heizdrähte statt. Der Gasaustausch findet hier mit der Umgebungsluft über Löcher in einem Flansch statt. In einem ex vivo Modell von Kruithof et al. werden Mäuseherzen in eine Perfusionskammer eingenäht und unterschiedlichen biochemischen und hämodynamischen Reizen ausgesetzt. Auch in diesem Modell ist der große Unterschied die Begasung und Temperaturregulation, die extern durch einen Inkubator übernommen wird [70]. Um die Auswirkung niedriger Sauerstoffwerte im Rahmen von Hypoxie auf das Klappen- und Zellverhalten zu beurteilen, haben die Arbeitsgruppen Swaminathan et al. und Sapp et al. eine ex vivo Kultur nach

ähnlichem Aufbau durchgeführt. Hierbei wurden porcine Aorten- und Mitralklappen verwendet, die Segel bzw. Taschen an 6-Well-Platten befestigt und in einem Inkubator kultiviert [71, 72]. Der Inkubator sorgt von außen für eine hypoxische Umgebung durch einen verminderten Sauerstoffgehalt in der Umgebungsluft.

Das in dieser Arbeit verwendete Bioreaktorsystem wurde bereits zur Untersuchung von Aortenklappentaschen unter normoxischen Bedingungen etabliert [59, 60].

Ein Ziel dieser Arbeit ist es die Rolle von Hypoxie in der CVAD zu untersuchen und zu etablieren.

Standardmäßig werden in der Zellkultur und für kleinere Bioreaktoren Hypoxie-Inkubatoren genutzt, die die Sauerstoffkonzentration durch das automatische Zuführen von Gasmengen in Form von Stickstoff regulieren [73-75]. Dies ermöglicht eine zuverlässige Steuerung und Messung der untersuchten Gaslevel ohne große Schwankungen.

Bisher basieren nur sehr wenige Studiendesigns zur Untersuchung von Hypoxie auf der Verwendung von Bioreaktoren. Besondere Herausforderung dieser Arbeit ist der Gasaustausch des Bioreaktors mit der Umgebungsluft über Schläuche und Anschlussstellen. Im Gegensatz zu vielen anderen Bioreaktoren befindet sich dieser nicht in einer Hypoxiekammer bzw. einem Inkubator, sondern als geschlossenes System im Raum [69, 70, 76].

Ausgangspunkt der Untersuchungen am Bioreaktor sind zunächst die Optimierungsprozesse. Diese dienen zur Festlegung eines Settings zur Kultivierung der Aortenklappentaschen unter hypoxischen Bedingung mit einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck. Primäres Ziel bei allen Optimierungen der Versuchsabläufe ist die Senkung des Sauerstoffpartialdrucks im System. Hierbei spielt die Beibehaltung der physiologischen Parameter eine wichtige Rolle. Um ein optimales System für hypoxische Bedingungen aufzustellen, werden sowohl der allgemeine Aufbau des Schlauchsystems als auch die Pumpenumdrehungszahl, der Druck und das notwendige Begasungsvolumen näher untersucht.

Im ersten Schritt wird der Aspekt Begasung im Bioreaktorsystem untersucht. Hierfür wird der Sauerstoffpartialdruck unter Zugabe von Stickstoff gemessen

(siehe Abschnitt 5.1.1). In dem rechnergesteuerten Bioreaktorsystem erfolgt die Begasung unter normoxischen Bedingungen bisher automatisiert über die Begasungskammer. Bei den Messungen wird ein durchschnittlicher Sauerstoffpartialdruck von 400 mbar, umgerechnet 300 mmHg, gemessen. Definitionsgemäß besteht eine arterielle Hypoxie beim Menschen bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 70 mmHg [77].

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein Gasaustausch in dem System unter Standardaufbau und automatisierter Begasung nicht ausreicht, um Hypoxie zu generieren.

Die größte Herausforderung stellt die Suche nach einem optimalen Versuchssetting dar, bei dem ein niedriger Sauerstoffpartialdruck unter Hinzugabe eines definierten Stickstoffvolumens erzielt wird. Es ist zum einen festzustellen, dass einerseits höhere Stickstoffdosen notwendig sind, um den Sauerstoffpartialdruck zu senken. Zum anderen können signifikant niedrigere Sauerstoffpartialdrücke unter direkter Hinzugabe des Stickstoffs in das Medium über die Herzklappenkammer, statt über die Oxygenierungskammer, erzielt werden. Am Ende können zwei Begasungssettings eine signifikante Senkung des Sauerstoffpartialdrucks von unter 110 – 90 mbar (entspricht 82,5 – 67,5 mmHg) erreichen. Hier erfolgt die Begasung entweder oberhalb oder unterhalb der Herzklappenkammer. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit beim Zusammenbau, der besseren Dichtigkeit der Begasungsstellen im System und dem physiologischeren Gasfluss wird das Setting mit der Begasung über den oberen Anschluss der Herzklappenkammer ausgewählt.

Nachdem der Aufbau des Bioreaktors und das Gasvolumenverhältnis von Stickstoff zu Kohlenstoffdioxid zum Erreichen von Hypoxie festgelegt wurden, wird ein Belüftungsprotokoll für die schnelle Herabsenkung des Sauerstoffpartialdrucks zu Beginn etabliert. Der Druck im System hält sich allein durch die Belüftung im System konstant. Die restlichen Parameter wie Temperatur, pH und Flüssigkeitsdurchfluss bleiben unverändert im Vergleich zum etablierten System unter Normoxie, um physiologische Bedingungen zu gewährleisten. Es wird ein Bioreaktorsetting etabliert, in dem die Hypoxie-Level (82,5 – 67,5 mmHg) vergleichbar mit arterieller Hypoxie im Menschen sind.

### 6.2 Der Einfluss von Hypoxie auf die Genexpression

Ziel der Arbeit ist es den Einfluss von Hypoxie auf Aortenklappentaschen in einem ex vivo Modell, dem Bioreaktor, zu etablieren, untersuchen und mit einem statischen Modell, dem 3D-Spannmodell zu vergleichen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Aortenklappe permanent Spannung und Druckschwankungen ausgesetzt. Bei vorhandenen Risikofaktoren kommt es pathophysiologisch zum Umbau infolge einer Fibrosierung durch Kollagensynthese und bei Fortschreiten zu Verkalkungen. Die hämodynamische Beanspruchung der Klappe durch den Blutfluss und das Öffnen und Schließen führen zur Gewebsschädigung mit konsekutivem Umbau. Infolgedessen kommt es zur veränderten Genexpression und vermehrten Freisetzung von prodegenerativen Markern [11, 52-55, 78].

Es wird die Expression von bekannten Hif-1a-Zielgenen VEGF, SLC2A1 und CA9 in der CAVD analysiert, um die Expression unter Hypoxie zu untersuchen. VEGF, ein zentraler Faktor der Neovaskularisation, wird durch Hif-1α reguliert, der unter chronisch pathologischen Bedingungen die Fibrose fördern kann und eine Rolle bei der chondrogenen Differenzierung von Fibroblasten und Chondrozyten spielt. Sowohl VEGF als auch Hif-1 $\alpha$  sind in degenerierten, menschlichen Aortenklappen deutlich hochreguliert und ihre Expression erfolgt vorwiegend an den Stellen der Verkalkung [71, 73, 79]. Hif-1α erhöht die Expression des vom SLC2A1-Gen kodierten Glukosetransporters (GLUT-1) [80, 81]. GLUT-1 ist in erster Linie am Glukosetransport durch die Zellmembran beteiligt, sodass Glukose in die Zellen eindringen und zur Energiegewinnung genutzt werden kann. Studien konnten nachweisen, dass bei erhöhtem Hypoxielevel eine Veränderung der Stoffwechselprozesse stattfindet. Hierbei kommt es zur Aktivierung der Glykolyse mit Hochregulation des GLUT-1-Gens zur Erhöhung der Glukoseaufnahme und Bereitstellung von Energie unter hypoxischen Bedingungen [82, 83]. Zudem erhöht Hif-1α die Expression der Carboanhydrase 9 (CA9) [84-86]. CA9 ist in humanen atherosklerotischen Plaques exprimiert [87]. Ein Zusammenhang mit der CAVD ist bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit dient CA9 primär als Hif-1α- Zielgen.

Eine Aktivierung der entsprechenden Marker gibt Hinweise auf die Aktivierung des Hif-1α-Signalwegs. In der Literatur wurde beschrieben, dass die oben genannten Marker eine essenzielle Rolle bei Hypoxie spielen. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF, SLC2A1 und CA9 unter Hypoxie aktiviert werden und zu morphologischen Gewebeveränderungen führen [88, 89]. Frühere Arbeiten oder andere Daten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass unter statischen Bedingungen in einem 3D-Spannmodell Hypoxie mit einer Hochregulation der hier untersuchten Hypoxiemarker VEGF, SLC2A1, CA9 einhergeht. (unbublizierte Daten von Sarah Bandar, Arbeitsgruppe Niazy)

Es konnte gezeigt werden, dass die Hypoxie-assoziierten Gene in den Aortenklappentaschen nach Kultivierung im Bioreaktor unter hypoxischen Bedingungen, nicht vermehrt exprimiert sind. Ein Grund dafür kann die nicht ausreichende Senkung des Sauerstoffpartialdrucks sein. Zudem kann möglicherweise die Kultivierungsdauer von drei Tagen im Bioreaktorsystem nicht ausreichend sein, um die Expression der Hif-1α Gene zu aktivieren. In den Aortenklappentaschen, die im Bioreaktor mit Hypoxie und Kautschukschläuchen kultiviert wurden, waren die Ausbeuten bei der RNA Extraktion gering und daher keine Analyse mittels semi-quantitativer RT-PCR möglich. Dies weist auf Zellschäden durch die Kombination aus Scherstress und zu starker Hypoxie hin.

## 6.3 Der Einfluss von Hypoxie auf die Degeneration von nativen, ovinen Aortenklappentaschen

### 6.3.1 Aufbau der Aortenklappentaschen und Differenzierung unter Hypoxie

Der Einfluss von Hypoxie auf Aortenklappentaschen wird in dieser Arbeit anhand der histologischen Färbung näher untersucht. Die bekannten histologischen Färbemethoden HE- und Movat-Pentachrom-Färbung dienen zur Beurteilung der Zellmorphologie, Gewebeschichten und -struktur unter Hypoxie und Normoxie.

An den kultivierten Aortenklappen unter statischen Bedingungen (3D-Spannmodell) unter Normoxie und Hypoxie im Brutschrank konnte in der HE- und Movat-Pentachrom-Färbung gezeigt werden, dass die Gewebeintegrität erhalten bleibt. Die Dreischichtigkeit aus den Laminae fibrosa, spongiosa und ventricularis ist vorhanden. Es fällt auf, dass es zu einer Zunahme der Lamina spongiosa nach vierzehn Tagen im Vergleich zu sieben Tagen Kultivierung sowohl unter Normoxie und Hypoxie kommt und die Taschendicke zunimmt. Dies konnte bereits in anderen Publikationen gezeigt werden. Im Rahmen der CAVD wurden die meisten Kollagenfaserveränderungen in der Spongiosa gefunden, wo die Anzahl der Kollagenfasern um mehr als das Zweifache anstieg. Dementsprechend nahmen auch die Faserbreite und – dichte zu [60, 90]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Hypoxie eine Schlüsselrolle beim Umbau der ECM spielt, indem sie den Elastin- und Kollagenstoffwechsel reguliert [79]. In der HE- und Movat-Pentachrom-Färbung zeigen sich zwischen den kultivierten Aortenklappen im Bioreaktor unter Normoxie und Hypoxie mit Silikonschläuchen keine Unterschiede. Die Gewebeintegrität mit ihrer Dreischichtigkeit bleibt erhalten und die Zelldichtigkeit bleibt gleich. Dies weist zunächst darauf hin, dass das Bioreaktormodell biokompatibel für Aortenklappentaschen ist und zur Kultivierung genutzt werden kann. Die morphologischen Veränderungen, wie sie im 3D-Spannmodell der Fall sind, können nach Bioreaktorkultivierung nicht beobachtet werden. Dies könnte an der kürzeren Kultivierungsdauer im Vergleich zum 3D-Spannmodell liegen. Darüber hinaus wäre es möglich, dass die Hypoxie unter diesem Versuchssetting nicht ausreicht, um Gewebeveränderungen hervorzurufen, wie es unter statischen Bedingungen der Fall ist.

Im Gegensatz dazu zeigt sich in der HE- und Movat-Pentachrom-Färbung eine Gewebsdestruktion unter hypoxischen Bedingungen unter Verwendung von Kautschukschläuchen. Es ist anzunehmen, dass in diesem Versuchssetting die Kombination aus Hypoxie und Scherstress zu Zelluntergang führt. Dies würde auch erklären, warum keine RNA Isolation und somit semi-quantitative RT-PCR Analysen aus dem Gewebe möglich gewesen sind. Andere Arbeitsgruppen, die mit Hypoxie in statischen Modellen gearbeitet haben, haben bis dato keine derartigen Gewebedestruktionen beschrieben [72, 91].

Es ist zu vermuten, dass die Gewebeschädigung durch die potenziell hypoxischen Versuchsbedingungen in Kombination mit Scherstress zustande kommt. Perspektivisch handelt es sich hierbei um einen interessanten Gesichtspunkt, da Hypoxie und Scherstress einen Einfluss auf die Gewebestruktur zu haben scheinen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das kultivierte Gewebe aus dem Bioreaktor im Vergleich zum 3D-Spannmodell keine strukturellen Veränderungen der Gewebeschichten in der histologischen Beurteilung und auch keine Aktivierung des Hif-1α Signalweges auf molekularer Ebene zeigt. Somit lässt es sich nicht zur weiteren Untersuchung der Fragestellung des Einflusses von Hypoxie in einem ex vivo Modell auf die CAVD nutzen. Die Kultivierung von Aortenklappentaschen im Bioreaktor mit Kautschukschläuchen unter hypoxischen Bedingungen gibt Indizien, dass extrem niedrige Sauerstoffkonzentrationen in Kombination mit Scherstress zur Überlastung des Gewebes führen. Weitere Optimierungen wären notwendig, um diesen Mechanismus näher zu untersuchen.

Die Anwendung einer Verlängerung der Kultivierungszeit und größerer Stichprobenzahlen sollte angestrebt werden, um eine bessere Aussagekraft bezüglich Signifikanzen und Unterschieden zu treffen. Hier wären weiterführende Studien sinnvoll, die von längerer Dauer sind. Außerdem sollte das Setting unter Verwendung von Kautschukschläuchen weiter optimiert werden, um die Ursachen der Gewebedegeneration durch die Kombination von Hypoxie und mechanischem Stress genauer untersuchen zu können.

### 6.4 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit konnte das Potential und gleichzeitig die Herausforderung der Kultivierung von Aortenklappen in einem *ex vivo* Modell unter hypoxischen Bedingungen herausstellen. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass mit Hilfe des Bioreaktormodells eine Gewebekultivierung unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck möglich ist.

Anhand der histologischen Beurteilung ist festzustellen, dass die Gewebestruktur und Zellmorphologie erhalten geblieben sind. Dies spricht für eine Biokompatibilität unter Scherstress und vermindertem Sauerstoffpartialdruck unter Stickstoffzufuhr. Im Vergleich zur statischen Kultivierung im 3D-Spannmodell fällt in diesem Kontext die Kultivierungsform positiv auf, da sie wichtige und zusätzliche Einflussfaktoren untersuchen kann.

Es konnte keine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression des Hif-1α-Signalwegs unter Hypoxie erzielt werden als Ausdruck für eine nicht ausreichende Senkung des Sauerstoffpartialdrucks im System.

Eine Möglichkeit für die mikroskopisch nachgewiesenen destruierten Aortenklappentaschen kann eine fehlende Biokompatibilität des Gewebes in Zusammenspiel mit Hypoxie und biomechanischen Faktoren in Verbindung mit den Kautschukschläuche sein.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen starker Hypoxie, biomechanischen Zuständen und einer Beeinträchtigung des Aortenklappengewebes besteht.

# 7 Verzeichnisse

7.1 Tabellenverzeichnis	
Tabelle 1: Parameter-Einstellung	24
Tabelle 2: Reaktionsansatz qRT-PCR	29
Tabelle 3: Parameter-Einstellung Bioreaktorsystem unter Hypoxie	37

# 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Symbolische Übersicht über Hif-1α Signalweg4
Abb. 2: 3D-Spannmodell
Abb. 3: Übersicht des gesamten Bioreaktors
Abb. 4: Aortenkonduit präpariert 22
Abb. 5: Schematische Übersicht über das computergesteuerte
Bioreaktorsystem mit pulsierendem Fluss
Abb. 6: Einfluss der Begasungssettings auf den Sauerstoffpartialdruck
Abb. 7: Einfluss des Begasungsvolumens und Drucks auf den
Sauerstoffpartialdruck
Abb. 8: Einfluss der Pumpenumdrehungszahl auf den Sauerstoffpartialdruck. 35
Abb. 9: Einfluss des Schlauchmaterials auf den Sauerstoffpartialdruck
Abb. 10: semiquantitative RT-PCR-Analyse der Genexpression von VEGF (A),
SLCA1 (B) und CA9 (C) bei Begasung über die Oxygenierungskammer (Setting
1, 72h Kultivierung)
Abb. 11: PCR-Analyse der Genexpression von VEGF, SLCA1 im Bioreaktor
Setting 2, 72h Kultivierung 40
Abb. 12: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Aortenklappen im Bioreaktor
Abb. 13: Movat-Pentachrom-Färbung der Aortenklappen im 3D-Spannmodell 42
Abb. 14: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Aortenklappen im 3D-Spannmodell 44
Abb. 15: Movat-Pentachrom-Färbung der Aortenklappen im 3D-Spannmodell 45

### 7.3 Literaturverzeichnis

- Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2015) Innere Organe, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage. Prometheus, LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke, Erik Schulte, Udo Schumacher ; Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Peeters FECM, Meex SJR, Dweck MR, Aikawa E, Crijns HJGM, Schurgers LJ, Kietselaer BLJH. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment. Eur Heart J. 2018 Jul 21;39(28):2618-2624.
- Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. 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 Oct 18;124(16):1783-91.
- Aikawa E, Libby P. A Rock and a Hard Place: Chiseling Away at the Multiple Mechanisms of Aortic Stenosis. Circulation. 2017;135(20):1951-1955.
- Lerman DA, Prasad S, Alotti N. Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. Eur Cardiol. 2015 Winter;10(2):108-112.
- Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. N Engl J Med. 1999 Jul 15;341(3):142-7.
- Dutta P, Lincoln J. Calcific Aortic Valve Disease: a Developmental Biology Perspective. Curr Cardiol Rep. 2018 Mar 8;20(4):21.
- Small A, Kiss D, Giri J, Anwaruddin S, Siddiqi H, Guerraty M, Chirinos JA, Ferrari G, Rader DJ. Biomarkers of Calcific Aortic Valve Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 Apr;37(4):623-632.
- Freeman, R.V.; Otto, C.M. Spectrum of calcific aortic valve disease: Pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. Circulation 2005, 111, 3316–3326,

- Coffey S, Cox B, Williams MJ. The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis. J Am Coll Cardiol. 2014 Jul 1;63(25 Pt A):2852-61.
- 11. Schnitzler JG, Ali L, Groenen AG, Kaiser Y, Kroon J. Lipoprotein(a) as Orchestrator of Calcific Aortic Valve Stenosis. Biomolecules. 2019 Nov 21;9(12):760.
- 12. Liu X, Xu Z. Osteogenesis in calcified aortic valve disease: From histopathological observation towards molecular understanding. Prog Biophys Mol Biol. 2016 Nov;122(2):156-161.
- Katsi V, Magkas N, Antonopoulos A, Trantalis G, Toutouzas K, Tousoulis
  D. Aortic valve: anatomy and structure and the role of vasculature in the degenerative process. Acta Cardiol. 2021 Jun;76(4):335-348
- 14. Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, Bogdanova M, Kostareva A, Stensløkken KO, Fiane A, Vaage J. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. J Am Heart Assoc. 2017 Sep 14;6(9):e006339.
- 15. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. Circ Res. 2011 May 27;108(11):1392-412.
- 16. Coffey S, Cox B, Williams MJ. Lack of progress in valvular heart disease in the pre-transcatheter aortic valve replacement era: increasing deaths and minimal change in mortality rate over the past three decades. Am Heart J. 2014 Apr;167(4):562-567.e2.
- 17. Akin I, Nienaber CA. Is there evidence for statins in the treatment of aortic valve stenosis? World J Cardiol. 2017 Aug 26;9(8):667-672.
- Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. N Engl J Med 2008;359:1343–56.
- 19. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, et al. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. Circulation 2010;121:306–14.
- 20. Assmann A, Horstkötter K, Munakata H, Schiffer F, Delfs C, Zwirnmann K, Barth M, Akhyari P, Lichtenberg A. Simvastatin does not diminish the

in vivo degeneration of decellularized aortic conduits. J Cardiovasc Pharmacol. 2014 Oct;64(4):332-42.

- 21. Yamamoto K, Yamamoto H, Yoshida K, Kisanuki A, Hirano Y, Ohte N, Akasaka T, Takeuchi M, Nakatani S, Ohtani T, Sozu T, Masuyama T. Prognostic factors for progression of early- and late-stage calcific aortic valve disease in Japanese: the Japanese Aortic Stenosis Study (JASS) Retrospective Analysis. Hypertens Res. 2010 Mar;33(3):269-74.
- 22. Rosenhek R, Rader F, Loho N, Gabriel H, Heger M, Klaar U, Schemper M, Binder T, Maurer G, Baumgartner H. Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. Circulation. 2004 Sep 7;110(10):1291-5.
- 23. Choi B, Lee S, Kim SM, Lee EJ, Lee SR, Kim DH, Jang JY, Kang SW, Lee KU, Chang EJ, Song JK. Dipeptidyl Peptidase-4 Induces Aortic Valve Calcification by Inhibiting Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling in Valvular Interstitial Cells. Circulation. 2017 May 16;135(20):1935-1950.
- 24. Goody PR, Hosen MR, Christmann D, Niepmann ST, Zietzer A, Adam M, Bönner F, Zimmer S, Nickenig G, Jansen F. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020 Apr;40(4):885-900.
- Clark CR, Bowler MA, Snider JC, Merryman WD. Targeting Cadherin-11 Prevents Notch1-Mediated Calcific Aortic Valve Disease. Circulation. 2017 Jun 13;135(24):2448-2450.
- 26. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 May;21(5):817-24.
- 27. Côté N, El Husseini D, Pépin A, Bouvet C, Gilbert LA, Audet A, Fournier D, Pibarot P, Moreau P, Mathieu P. Inhibition of ectonucleotidase with ARL67156 prevents the development of calcific aortic valve disease in warfarin-treated rats. Eur J Pharmacol. 2012 Aug 15;689(1-3):139-46.
- 28. Bouchareb R, Côté N, Marie-Chloé-Boulanger, Le Quang K, El Husseini D, Asselin J, Hadji F, Lachance D, Shayhidin EE, Mahmut A, Pibarot P, Bossé Y, Messaddeq Y, Boudreau D, Marette A, Mathieu P. Carbonic

anhydrase XII in valve interstitial cells promotes the regression of calcific aortic valve stenosis. J Mol Cell Cardiol. 2015 May;82:104-15.

- Myasoedova VA, Ravani AL, Frigerio B, Valerio V, Moschetta D, Songia P, Poggio P. Novel pharmacological targets for calcific aortic valve disease: Prevention and treatments. Pharmacol Res. 2018 Oct;136:74-82.
- 30. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP 3rd, Gentile F, Jneid H, Krieger EV, Mack M, McLeod C, O'Gara PT, Rigolin VH, Sundt TM 3rd, Thompson A, Toly C. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. Circulation. 2021 Feb 2;143(5):e35-e71.
- 31. Beckmann A, Meyer R, Lewandowski J, Markewitz A, Blaßfeld D, Böning A. German Heart Surgery Report 2022: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. Thorac Cardiovasc Surg. 2023 Jun 16.
- 32. S. Šušak, L. Velicki, D. Popović, I. Burazor Surgical valve replacement (bioprosthetic vs. mechanical E. Aikawa (Ed.), Calcific Aortic Valve Disease, InTech, Rijeka, Croatia (2013)
- 33. lung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, Vahanian A. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. Eur Heart J. 2003 Jul;24(13):1231-43.
- 34. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, Capodanno D, Conradi L, De Bonis M, De Paulis R, Delgado V, Freemantle N, Gilard M, Haugaa KH, Jeppsson A, Jüni P, Pierard L, Prendergast BD, Sádaba JR, Tribouilloy C, Wojakowski W; ESC/EACTS Scientific Document Group. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. Eur Heart J. 2022 Feb 12;43(7):561-632.
- 35. Emery RW, Emery AM, Krogh C, Shake JG, Holter AR, Blake DP, Raikar GV. The St. Jude Medical cardiac valve prosthesis: long-term follow up of

patients having double valve replacement. J Heart Valve Dis. 2007 Nov;16(6):634-40.

- 36. Desai ND, Merin O, Cohen GN, Herman J, Mobilos S, Sever JY, Fremes SE, Goldman BS, Christakis GT. Long-term results of aortic valve replacement with the St. Jude Toronto stentless porcine valve. Ann Thorac Surg. 2004 Dec;78(6):2076-83; discussion 2076-83.
- 37. Saksena D, Muralidharan S, Mishra YK, Kanhere V, Mohanty BB, Srivastava CP, Mange J, Puranik M, Nair MP, Goel P, Srivastava P, Krishnan RM, Nambala S, Raja V. Anticoagulation Management in Patients with Valve Replacement. J Assoc Physicians India. 2018 Jan;66(1):59-74.
- 38. Head SJ, Çelik M, Kappetein AP. Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement. Eur Heart J. 2017 Jul 21;38(28):2183-2191.
- 39. YangThang, "Mechanical Versus Bioprosthetic Valve Replacement in Valvular Heart Disease: A Systematic Review" (2011) School of Physician Assistant Studies. Paper 240.
- 40. Rodriguez-Gabella T , Voisine P , Puri R , et al . Aortic bioprosthetic valve durability incidence, mechanisms, predictors, and management of surgical and transcatheter valve degeneration. J Am Coll Cardiol 2017;70:1013– 28.
- 41. Makkar RR, Fontana G, Jilaihawi H, Chakravarty T, Kofoed KF, De Backer O, Asch FM, Ruiz CE, Olsen NT, Trento A, Friedman J, Berman D, Cheng W, Kashif M, Jelnin V, Kliger CA, Guo H, Pichard AD, Weissman NJ, Kapadia S, Manasse E, Bhatt DL, Leon MB, Søndergaard L. Possible Subclinical Leaflet Thrombosis in Bioprosthetic Aortic Valves. N Engl J Med. 2015 Nov 19;373(21):2015-24.
- 42. Egbe AC, Pislaru SV, Pellikka PA, Poterucha JT, Schaff HV, Maleszewski JJ, Connolly HM. Bioprosthetic Valve Thrombosis Versus Structural Failure: Clinical and Echocardiographic Predictors. J Am Coll Cardiol. 2015 Dec 1;66(21):2285-2294.
- 43. Tully A, Chowdhury YS. Bioprosthetic Stented Pericardial Porcine Aortic Valve Replacement. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 24, 2023.

- 44. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Mol Pharmacol. 2006 Nov;70(5):1469-80.
- 45. Stolze IP, Mole DR, Ratcliffe PJ. Regulation of HIF: prolyl hydroxylases. Novartis Found Symp. 2006;272:15-25; discussion 25-36.
- 46.Lee JW, Ko J, Ju C, Eltzschig HK. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. Exp Mol Med. 2019 Jun 20;51(6):1-13
- 47. Lin Q, Cong X, Yun Z. Differential hypoxic regulation of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha. Mol Cancer Res. 2011 Jun;9(6):757-65.
- 48. Buckley DL, Van Molle I, Gareiss PC, Tae HS, Michel J, Noblin DJ, Jorgensen WL, Ciulli A, Crews CM. Targeting the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1α interaction. J Am Chem Soc. 2012 Mar 14;134(10):4465-8.
- 49. Jiang, BH, E. Rue, GL Wang, R. Roe und GL Semenza. 1996. Dimerisierung, DNA-Bindung und Transaktivierungseigenschaften des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1. J. Biol. Chem. 271 : 17771-17778
- 50. Semenza, GL, PH Roth, HM Fang und GL Wang. 1994. Transkriptionelle Regulation von Genen, die glykolytische Enzyme codieren, durch Hypoxie-induzierbaren Faktor 1. J. Biol. Chem. 269 : 23757–23763
- 51. Wang, GL und GL Semenza. 1993. Charakterisierung des Hypoxieinduzierbaren Faktors 1 und Regulation der DNA-Bindungsaktivität durch Hypoxie. J.Biol. Chem. 268 : 21513–21518
- 52. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature. 1992 Oct 29;359(6398):843-5.
- 53.Perrotta I, Moraca FM, Sciangula A, Aquila S, Mazzulla S. HIF-1α and VEGF: Immunohistochemical Profile and Possible Function in Human Aortic Valve Stenosis. Ultrastruct Pathol. 2015 May;39(3):198-206.
- 54. Tirpe AA, Gulei D, Ciortea SM, Crivii C, Berindan-Neagoe I. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6140. Published 2019 Dec 5.
- 55. Qiang J, Zhu XW, He J, et al. miR-34a Regulates the Activity of HIF-1a and P53 Signaling Pathways by Promoting GLUT1 in Genetically
Improved Farmed Tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) Under Hypoxia Stress. *Front Physiol*. 2020;11:670. Published 2020 Jun 16.

- Tafreshi NK, Lloyd MC, Bui MM, Gillies RJ, Morse DL. Carbonic anhydrase IX as an imaging and therapeutic target for tumors and metastases. Subcell Biochem. 2014;75:221-54.
- 57. Svastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zaťovicová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. FEBS Lett. 2004 Nov 19;577(3):439-45.
- 58. Weber A, Pfaff M, Schöttler F, Schmidt V, Lichtenberg A, Akhyari P. Reproducible In Vitro Tissue Culture Model to Study Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease: Comparative Analysis to Valvular Interstitials Cells. Biomedicines. 2021 Apr 26;9(5):474.
- 59. Niazy N, Barth M, Selig JI, Feichtner S, Shakiba B, Candan A, Albert A, Preuß K, Lichtenberg A, Akhyari P. Degeneration of Aortic Valves in a Bioreactor System with Pulsatile Flow. Biomedicines. 2021 Apr 23;9(5):462.
- 60. Selig JI, Boulgaropoulos J, Niazy N, Ouwens DM, Preuß K, Horn P, Westenfeld R, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M. Crosstalk of Diabetic Conditions with Static Versus Dynamic Flow Environment-Impact on Aortic Valve Remodeling. Int J Mol Sci. 2021 Jun 28;22(13):6976.
- 61. Lei Y, Masjedi S, Ferdous Z. A study of extracellular matrix remodeling in aortic heart valves using a novel biaxial stretch bioreactor. J Mech Behav Biomed Mater. 2017 Nov;75:351-358.
- 62. Metzler SA, Waller SC, Warnock JN. Quantitative Characterization of Aortic Valve Endothelial Cell Viability and Morphology In Situ Under Cyclic Stretch. Cardiovasc Eng Technol. 2019 Mar;10(1):173-180.
- 63. Shu L, Yuan Z, Li F, Cai Z. Oxidative stress and valvular endothelial cells in aortic valve calcification. Biomed Pharmacother. 2023 Apr 26;163:114775.
- 64. Dayawansa NH, Baratchi S, Peter K. Uncoupling the Vicious Cycle of Mechanical Stress and Inflammation in Calcific Aortic Valve Disease. Front Cardiovasc Med. 2022 Mar 9;9:783543.

- 65. Amadeo F, Boschetti F, Polvani G, Banfi C, Pesce M, Santoro R. Aortic valve cell seeding into decellularized animal pericardium by perfusion-assisted bioreactor. J Tissue Eng Regen Med. 2018 Jun;12(6):1481-1493.
- Chen J, Zhang D, Wu LP, Zhao M. Current Strategies for Engineered Vascular Grafts and Vascularized Tissue Engineering. Polymers (Basel). 2023 Apr 24;15(9):2015.
- 67. Yan G, Liu Y, Xie M, Shi J, Qiao W, Dong N. Experimental and computational models for tissue-engineered heart valves: a narrative review. Biomater Transl. 2021 Dec 28;2(4):361-375
- Engler AJ, Le AV, Baevova P, Niklason LE. Controlled gas exchange in whole lung bioreactors. J Tissue Eng Regen Med. 2018 Jan;12(1):e119e129.
- 69. Sucosky P, Padala M, Elhammali A, Balachandran K, Jo H, Yoganathan AP. Design of an ex vivo culture system to investigate the effects of shear stress on cardiovascular tissue. J Biomech Eng. 2008 Jun;130(3):035001.
- 70. Kruithof BP, Lieber SC, Kruithof-de Julio M, Gaussin V, Goumans MJ. Culturing Mouse Cardiac Valves in the Miniature Tissue Culture System. J Vis Exp. 2015 Oct 19;(105):e52750.
- 71. Swaminathan G, Krishnamurthy VK, Sridhar S, Robson DC, Ning Y, Grande-Allen KJ. Hypoxia Stimulates Synthesis of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Aortic Valve Disease. Front Cardiovasc Med. 2019 Oct 29;6:156.
- 72. Sapp MC, Krishnamurthy VK, Puperi DS, Bhatnagar S, Fatora G, Mutyala N, Grande-Allen KJ. Differential cell-matrix responses in hypoxiastimulated aortic versus mitral valves. J R Soc Interface. 2016 Dec;13(125):20160449.
- 73. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. J Vis Exp.2011 Aug 12;(54):2899.
- 74. Qian L, Ren S, Xu Z, Zheng Y, Wu L, Yang Y, Wang Y, Li J, Yan S, Fang Z. Qian Yang Yu Yin Granule Improves Renal Injury of Hypertension by Regulating Metabolic Reprogramming Mediated by HIF-1α/PKM2 Positive Feedback Loop. Front Pharmacol. 2021 Jun 7;12:667433.
- 75.Madan E, Parker TM, Pelham CJ, Palma AM, Peixoto ML, Nagane M, Chandaria A, Tomás AR, Canas-Marques R, Henriques V, Galzerano A,

Cabral-Teixeira J, Selvendiran K, Kuppusamy P, Carvalho C, Beltran A, Moreno E, Pati UK, Gogna R. HIF-transcribed p53 chaperones HIF-1α. Nucleic Acids Res. 2019 Nov 4;47(19):10212-10234.

- 76. Campillo N, Falcones B, Montserrat JM, Gozal D, Obeso A, Gallego-Martin T, Navajas D, Almendros I, Farré R. Frequency and magnitude of intermittent hypoxia modulate endothelial wound healing in a cell culture model of sleep apnea. J Appl Physiol (1985). 2017 Nov 1;123(5):1047-1054.
- 77. Larsen R. Respiratorische Insuffizienz: Pathophysiologie und Zeichen.Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege. 2016 Jun 14:709–15.German.
- 78. Fu B, Wang J, Wang L, Wang Q, Guo Z, Xu M, Jiang N. Integrated proteomic and metabolomic profile analyses of cardiac valves revealed molecular mechanisms and targets in calcific aortic valve disease. Front Cardiovasc Med. 2022 Oct 13;9:944521.
- 79. Di Vito A, Donato A, Presta I, Mancuso T, Brunetti FS, Mastroroberto P, Amorosi A, Malara N, Donato G. Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives. Int J Mol Sci. 2021 Jan 18;22(2):913.
- 80. Csiki DM, Ababneh H, Tóth A, Lente G, Szöőr Á, Tóth A, Fillér C, Juhász T, Nagy B Jr, Balogh E, Jeney V. Hypoxia-inducible factor activation promotes osteogenic transition of valve interstitial cells and accelerates aortic valve calcification in a mice model of chronic kidney disease. Front Cardiovasc Med. 2023 Jun 2;10:1168339.
- 81. Gholami S, Chamorro-Petronacci C, Pérez-Sayáns M, Suárez Peñaranda J, Longatto-Filho A, Baltazar F, Afonso J. Immunoexpression profile of hypoxia-inducible factor (HIF) targets in potentially malignant and malignant oral lesions: a pilot study. J Appl Oral Sci. 2023 May 15;31:e20220461.
- 82. Yang S, Yan T, Wu H, Xiao Q, Fu HM, Luo J, Zhou J, Zhao LL, Wang Y, Yang SY, Sun JL, Ye X, Li SJ. Acute hypoxic stress: Effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of HIF-1alpha and GLUT-1 genes in largemouth bass (Micropterus salmoides). Fish Shellfish Immunol. 2017 Aug;67:449-458.

- 83. Choi YK. A positive circuit of VEGF increases Glut-1 expression by increasing HIF-1α gene expression in human retinal endothelial cells. Arch Pharm Res. 2017 Dec;40(12):1433-1442.
- 84. Chafe SC, Lou Y, Sceneay J, Vallejo M, Hamilton MJ, McDonald PC, Bennewith KL, Möller A, Dedhar S. Carbonic anhydrase IX promotes myeloid-derived suppressor cell mobilization and establishment of a metastatic niche by stimulating G-CSF production. Cancer Res. 2015 Mar 15;75(6):996-1008.
- 85. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. Cancer Res. 2000 Dec 15;60(24):7075-83.
- 86. Pastorekova S, Ratcliffe PJ, Pastorek J. Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia. BJU Int. 2008 Jun;101 Suppl 4:8-15.
- 87. Demandt JAF, Dubois LJ, van Kuijk K, Zaťovičová M, Jin H, Parkkila S, van der Laan SW, Jelenska L, Mees BME, Reutelingsperger CPM, Cleutjens KBJM, van der Kallen CJH, Schalkwijk CG, van Greevenbroek MMJ, Biessen EAL, Pasterkamp G, Pastoreková S, Stehouwer CDA, Sluimer JC. The hypoxia-sensor carbonic anhydrase IX affects macrophage metabolism, but is not a suitable biomarker for human cardiovascular disease. Sci Rep. 2021 Jan 11;11(1):425.
- 88. Kujan O, Siddiqui I, Lee C, Idrees M, Shearston K, Farah CS. Automated immunohistochemical quantification of hypoxia biomarkers shows correlation with dysplastic epithelial changes. J Oral Pathol Med. 2023 Mar 12.
- Li XZ, Xiong ZC, Zhang SL, Hao QY, Gao M, Wang JF, Gao JW, Liu PM. Potential ferroptosis key genes in calcific aortic valve disease. Front Cardiovasc Med. 2022 Aug 8;9:916841.
- Hutson HN, Marohl T, Anderson M, Eliceiri K, Campagnola P, Masters KS. Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture. PLoS One. 2016 Sep 29;11(9):e0163858.

91. Salim MT, Villa-Roel N, Vogel B, Jo H, Yoganathan AP. HIF1A inhibitor PX-478 reduces pathological stretch-induced calcification and collagen turnover in aortic valve. Front Cardiovasc Med. 2022 Nov 7;9:1002067.

## 8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während des Promotionsvorhabens unterstützt und begleitet haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari, meinem Doktorvater und Leiter der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie, danke ich für die stetige Unterstützung, Beratung und Diskussion bei inhaltlichen und methodischen Fragen und fachliche Expertise während des gesamten Projektes.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Margriet Ouwens, meiner Co-Betreuerin, möchte ich danken für die Betreuung dieser Arbeit, wegweisenden Denkanregungen und dem Teilen von Forschungswissen auf ihrem Themengebiet.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg, Direktor der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf, möchte ich danken, dass ich die Arbeiten im Labor der experimentellen Chirurgie durchführen durfte.

Frau Dr. rer. nat. Naima Niazy, meiner wissenschaftlichen Betreuerin, bin ich von tiefem Herzen zu Dank verpflichtet. Ich danke für die immerwährende Unterstützung, zahlreichen Hilfestellungen bei der Lösung von Problemen, vielen produktiven Gesprächen und ihrer entscheidenden Rolle bei dem Fortschritt dieses Projektes.

Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth danke ich für die ausführliche labortechnische Einarbeitung und die persönliche und professionelle Unterstützung.

Frau Dr. rer. nat. Jessica I. Selig danke ich ebenfalls für ihre wertvollen Erfahrungen und Hilfestellung bei der RNA-Isolation.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung bedanken. Danke Gisela Müller, Sarah Bandar, Hajar Abu-Nahia, Sophia Grupp und Joana Boulgaropoulos als treue Wegbegleiter in dieser Zeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen lieben Freunden bedanken, die mir jederzeit zur Seite standen, ein offenes Ohr gehabt haben und mir Rückhalt gegeben haben. Danke für eure Liebe, Kraft und Motivation, welche diese Arbeit erst möglich gemacht haben.