

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

Einfluss der Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR $\gamma$ )-  
Aktivierung auf die Degeneration biologischer Prothesen in adipösen Ratten mit  
einer Hypercholesterinämie

Dissertation

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

vorgelegt von  
Vanessa Anna Winnicki  
2024

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

gez.

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Dr. med. Christian Jung

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Assmann AK, Winnicki V, Sugimura Y, Chekhoeva A, Barth M, Assmann A, Lichtenberg A, Akhyari P (2023) Impact of PPAR-gamma activation on the durability of biological heart valve prostheses in hypercholesterolaemic rats. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 63:ezad005

## ZUSAMMENFASSUNG

Die degenerative Aortenklappenerkrankung betrifft große Teile der Bevölkerung und verursacht, besonders in späteren Stadien, schwerwiegende Symptome. Bei hoher Sterblichkeit erfordert sie dann häufig einen operativen Herzklappenersatz. Biologische Herzklappenprothesen haben viele Vorteile gegenüber mechanischen Modellen, ihre Haltbarkeit ist aber durch fortschreitende degenerative Prozesse limitiert. Die Degeneration bioprothetischer Klappen beruht auf aktiven pathobiologischen Prozessen, die eine Gewebetransformation, Kalzifizierung und Inflammation umfassen. Dies sind Komponenten, die ebenso zu einer Atherosklerose und Nativklappendegeneration beitragen. Begünstigend wirken hier eine Hypercholesterinämie und Übergewicht. Die Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) beeinflusst die Expression zahlreicher Gene und reduziert nachweislich das Fortschreiten der Atherosklerose. Ebenso gibt es Hinweise für dessen hemmenden Effekt auf die Nativklappendegeneration. Der Einfluss auf die Bioprothesendegeneration ist bislang jedoch unbekannt.

In dieser Arbeit soll der Einfluss des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon auf die Degeneration von klappentragenden Konduits in adipösen Ratten mit einer Hypercholesterinämie untersucht werden. Dazu nutzten wir ein etabliertes Modell der heterotopen infrarenalen Implantation. Kryokonservierte allogene klappentragende Aortenkonduits (AoC) aus Sprague-Dawley-Ratten wurden in 40 Wistar-Ratten implantiert, die fettreiches Futter erhielten. Eine Versuchsgruppe wurde mit Pioglitazon behandelt ( $n = 20$ , Gruppe PIO) und mit der entsprechenden unbehandelten Gruppe ( $n = 20$ , Kontrollgruppe C) verglichen. Nach 4 oder 12 Wochen wurden die AoCs echokardiographisch untersucht und explantiert. Histologische und immunhistologische Untersuchungen sowie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden durchgeführt.

Erwartungsgemäß erhöhte die fettreiche Kost nach 4 und 12 Wochen das Gesamtcholesterin und nach 12 Wochen das Körpergewicht signifikant. Die Tiere der Gruppe PIO wiesen nach 4 und 12 Wochen eine signifikant geringere Insuffizienz der implantierten Aortenklappe auf. Außerdem entwickelten diese eine geringere Intima-Hyperplasie nach 4 und 12 Wochen. Auch die Intima-Kalzifizierung war in Gruppe PIO nach 12 Wochen signifikant verringert. Die Media-Kalzifizierung zeigte keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich. Die inflammatorische und chondro-osteogene Aktivität war im Explantatgewebe beider Gruppen vergleichbar.

Es konnte gezeigt werden, dass eine systemische Aktivierung von PPAR $\gamma$  die Intima-Hyperplasie und Kalzifizierung kryokonservierter AoCs bei adipösen, hypercholesterinämischen Ratten reduziert. Ebenso wirkt es der funktionellen Beeinträchtigung der Klappenimplantate entgegen. Weitergehende Untersuchungen könnten den potenziellen Nutzen einer Pioglitazon-Medikation bei Allograft-Empfängern unterstreichen.

## SUMMARY

Degenerative aortic valve disease affects large parts of the population and causes severe symptoms, especially in later stages. High mortality then often requires surgical heart valve replacement. Biological prosthetic heart valves have many advantages over mechanical models, but their durability is limited due to progressive destruction processes. The destruction of bioprosthetic valves is driven by an active pathobiological process involving tissue transformation, calcification, and inflammation. These are components that also contribute to atherosclerosis and native valve degeneration. In this regard, hypercholesterolemia and obesity have a promoting effect. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) affects the expression of numerous genes and has been shown to reduce the progression of atherosclerosis. Furthermore, there is evidence for its inhibitory effect on and native valve degeneration. However, its influence on bioprosthesis degeneration is presently unknown.

In this study, we aim to investigate the effect of the PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone on the degeneration of valve-bearing bioprostheses in obese, hypercholesterolemic rats. For this purpose, we used an established model of heterotopic infrarenal implantation. Cryopreserved allogenic valve-bearing aortic conduits (AoC) from Sprague-Dawley rats were implanted into 40 Wistar rats fed a high-fat diet. An experimental group was treated with pioglitazone ( $n = 20$ , group PIO) and compared with the corresponding untreated group ( $n = 20$ , control group C). After 4 or 12 weeks, AoCs were echocardiographically examined and explanted. Histological and immunohistological examinations as well as polymerase chain reaction (PCR) were performed.

As expected, the high-fat diet increased total cholesterol after 4 and 12 weeks and body weight after 12 weeks. Animals in the PIO group had significantly less insufficiency of the implanted aortic valve at 4 and 12 weeks. In addition, they developed less intimal hyperplasia at 4 and 12 weeks. Intimal calcification was also significantly reduced in group PIO at 12 weeks. Media calcification showed no significant differences in group comparison. Detected inflammatory and chondro-osteogenic activity was comparable in the tissue of both groups.

Systemic PPAR $\gamma$ -activation was shown to reduce intimal hyperplasia and subsequent calcification of cryopreserved allografts in obese, hypercholesterolemic rats, thereby counteracting functional impairment of the valve implant. Further studies could underline the potential benefit of pioglitazone medication in allograft recipients.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>AI</b>	Aortenklappeninsuffizienz	<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>AoC</b>	Klappentragendes Aortenkonduit	<b>p</b>	Signifikanzwert, <i>probabilitas</i>
<b>BMP2</b>	Knochenmorphogenetisches Protein 2, <i>bone morphogenetic protein 2</i>	<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
<b>C</b>	Kontrollgruppe	<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>	<b>pH</b>	Potential des Wasserstoffs, <i>potentia Hydrogenii</i>
<b>cdDNA</b>	komplementäre DNA,	<b>PIO</b>	Pioglitazon-Futtergruppe
<b>C<sub>t</sub></b>	Zyklus-Schwelle, <i>cycle threshold</i>	<b>PPAR</b>	Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol	<b>qPCR</b>	Quantitative Echtzeit-PCR
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser	<b>RAGE</b>	Rezeptor für fortgeschrittene Glykationsendprodukte, <i>Receptor for advanced glycosylation end-products</i>
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
<b>EtOH</b>	Ethanol	<b>RPL13a</b>	Ribosomales Protein L13A
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykane	<b>RUNX2</b>	Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2
<b>HDL</b>	Lipoprotein hoher Dichte, <i>high density lipoprotein</i>	<b>SD</b>	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin	<b>Syn3</b>	Syndecan-3
<b>HF</b>	Fettreiches Futter, <i>high-fat-Futter</i>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>HLA</b>	Histokompatibilitäts-Antigen	<b>TZD</b>	Thiazolidindione
<b>IE/kg</b>	Internationale Einheiten pro Kilogramm	<b>VTI I</b>	systolisches Geschwindigkeits-Zeit-Integral [cm], <i>velocity time integral I</i>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$	<b>VTI II</b>	diastolisches Geschwindigkeits-Zeit-Integral [cm], <i>velocity time integral II</i>
<b>IL-6</b>	Interleukin-6	<b>vWF</b>	von-Willebrand-Faktor
<b>IMR</b>	Intima-Media-Ratio	<b>ZETT</b>	zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
<b>LDL</b>	Lipoprotein niedriger Dichte, <i>low density lipoprotein</i>	<b><math>\alpha</math>SMA</b>	$\alpha$ -Glattmuskel-Aktin, <i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
<b>mg/kg</b>	Milligramm pro Kilogramm		
<b>min</b>	Minute(n)		
<b>ml</b>	Milliliter		
<b>mRNA</b>	Boten-RNA, <i>messenger-RNA</i>		
<b>n</b>	Anzahl		
<b>nm</b>	Nanometer		
<b>OCN</b>	Osteocalcin		

## INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY .....	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	III
INHALTSVERZEICHNIS .....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die degenerative Aortenklappenerkrankung .....	1
1.1.1 Definition .....	1
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie .....	1
1.2 Herzklappenprothesen .....	2
1.2.1 Unterscheidung .....	2
1.2.2 Auswahl der Herzklappenprothese.....	3
1.3 Degeneration biologischer Herzklappenprothesen .....	5
1.3.1 Epidemiologie .....	5
1.3.2 Risiko- und Einflussfaktoren.....	5
1.3.3 Adipositas und Hypercholesterinämie als Risikofaktor .....	6
1.3.4 Pathogenese.....	6
1.4 PPAR und Prothesendegeneration .....	9
1.4.1 Peroxisom-Proliferator-Aktivierende-Rezeptoren .....	9
1.4.2 Klinische Anwendung und Effekte von PPAR $\gamma$ -Agonisten.....	10
1.4.3 Wirkmechanismus von PPAR $\gamma$ -Agonisten .....	12
1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit .....	14
2 MATERIAL UND METHODEN .....	15
2.1 Material .....	15
2.1.1 Gebrauchswaren und Substanzen.....	15
2.1.2 Lösungen .....	16
2.1.3 Antikörper .....	17
2.1.4 Software .....	17
2.1.5 Geräte .....	17
2.1.6 Herstellerverzeichnis.....	18
2.2 Methodik.....	19
2.2.1 Studienaufbau.....	19
2.2.2 Versuchstiere und Haltung .....	20
2.2.3 Gewinnung und Konservierung des Implantates.....	20
2.2.4 Induktion einer Aortenklappen-Insuffizienz .....	21
2.2.5 Implantation der klappentragenden Aortenkonduits .....	21
2.2.6 Explantation und Aufbereitung .....	22
2.2.7 Erhebung von Körpergewicht und Blutwerten.....	23

2.2.8	Echokardiographische Untersuchungen .....	24
2.3	Anfertigung und Auswahl der histologischen Präparate .....	24
2.4	Klassische histologische Färbungen .....	25
2.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	25
2.4.2	Intima-Media-Ratio .....	25
2.4.3	Von-Kossa-Färbung .....	26
2.4.4	Von-Kossa-Kalzifizierungsscore .....	27
2.4.5	Alizarinrot-S-Färbung .....	27
2.4.6	Movat-Pentachrom-Färbung .....	28
2.4.7	Auswertungsprozess .....	29
2.5	Immunhistologische Färbungen .....	29
2.5.1	Färbeprozess .....	29
2.5.2	Auswertungsprozess .....	31
2.5.3	vWF- & $\alpha$ SMA-Score .....	31
2.5.4	Quantitative Analyse der CD3- & CD68-Färbung .....	32
2.5.5	Syndecan-3 .....	32
2.6	Molekularbiologische Techniken .....	33
2.6.1	RNA-Isolation und -Quantifizierung .....	33
2.6.2	cDNA-Synthese .....	34
2.6.3	Quantitative Echtzeit-PCR .....	34
2.7	Statistik .....	35
2.8	Eigenanteil der durchgeführten Methodik und Etablierungsarbeit .....	35
3	ERGEBNISSE .....	36
3.1	Adipositas und Hypercholesterinämie im Rattenmodell .....	36
3.2	Blutglukose und ergänzende Blutplasma-Analysen .....	38
3.3	Ergebnisse der Echokardiographie .....	41
3.4	Intima-Hyperplasie der klappentragenden Aortenkonduits .....	42
3.5	Kalzifizierung der klappentragenden Aortenkonduits .....	44
3.6	Chondrogene und osteogene Prozesse .....	45
3.7	Inflamationsprozesse .....	48
4	DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN .....	50
4.1	Implantationsmodell in adipösen, hypercholesterinämischen Ratten .....	51
4.2	Reduzierte Intima-Hyperplasie durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung .....	52
4.3	Reduzierte Intima-Kalzifizierung durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung .....	53
4.4	Inflamationsprozesse bei antidegenerativer PPAR $\gamma$ -Aktivierung .....	55
4.5	Limitationen der Arbeit .....	57
4.6	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	58
5	DANKSAGUNG .....	59
6	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS .....	60

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1: Schema der heterotopen Implantation.....	19
Abb. 2: Implantation eines klappentragenden Aortenkonduits .....	22
Abb. 3: Aufteilung eines klappentragenden Aortenkonduits nach Explantation .....	23
Abb. 4: Erhebung der Intima-Media-Ratio .....	26
Abb. 5: vonKossa-Score in Bildern .....	27
Abb. 6: Gewichtszunahme im Beobachtungszeitraum .....	36
Abb. 7: Gewicht im Gruppenvergleich .....	37
Abb. 8: Gesamtcholesterin im Gruppenvergleich .....	38
Abb. 9: Blutglukose im Gruppenvergleich .....	39
Abb. 10: Blutfettwerte im Gruppenvergleich.....	39
Abb. 11: Triglyceride im Vergleich mit Normalkost-Tierkollektiv.....	40
Abb. 12: Plasmakreatinin und -harnsäure im Gruppenvergleich .....	40
Abb. 13: Echokardiographische Ergebnisse Nativklappe .....	41
Abb. 14: Echokardiographische Ergebnisse Nativklappe und Klappenimplantat.....	42
Abb. 15: Intima-Hyperplasie des Aortenkonduits.....	43
Abb. 16: $\alpha$ SMA- und vWF-Expression im Bereich der Intima .....	43
Abb. 17: Intima- und Media-Kalzifizierung des Aortenkonduits im Gruppenvergleich .....	44
Abb. 18: Histologisch sichtbare Unterschiede der Kalzifizierung im Aortenkonduit.....	45
Abb. 19: Chrondrogene Aktivität im Gruppenvergleich.....	46
Abb. 20: Expression von Genen der osteo-chrondrogenen Transformation .....	47
Abb. 21: CD3-Expression im Gruppenvergleich .....	48
Abb. 22: CD68-Expression im Gruppenvergleich .....	49
Abb. 23: Expression Inflammations-assoziiierter Gene.....	50

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Gebrauchswaren und Substanzen.....	15
Tabelle 2: Lösungen.....	16
Tabelle 3: Antikörper .....	17
Tabelle 4: Software .....	17
Tabelle 5: Geräte.....	17
Tabelle 6: Herstellerverzeichnis.....	18
Tabelle 7: Zeitlicher Studienverlauf.....	20
Tabelle 8: Von-Kossa-Score in Worten .....	27
Tabelle 9: Übersicht immunhistologischer Färbemethoden und Antikörper .....	30
Tabelle 10: vWF- & $\alpha$ SMA-Score .....	31
Tabelle 11: Syndecan-3-Score .....	33
Tabelle 12: qPCR Primersequenzen.....	34

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die degenerative Aortenklappenerkrankung

### 1.1.1 Definition

Die Aortenklappe übernimmt als Pforte zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta eine zentrale Rolle im Blutkreislauf. Funktionseinschränkungen der Herzklappen können viele Symptome hervorrufen sowie die Lebensqualität und Lebensdauer erheblich einschränken [1–3]. Diese Funktionseinschränkungen können durch angeborene oder erworbene Herzklappenerkrankungen bedingt sein. Zu den Erkrankungen der Aortenklappe zählen die Stenose, die Insuffizienz und deren Kombination [4, 5]. Im Rahmen einer Stenose hypertrophieren und versteifen die Klappentaschen, sodass der Blutfluss durch eine reduzierte Öffnungsfläche behindert wird [6]. Bei der Insuffizienz verlieren die Klappentaschen den dichten Kontakt zueinander, sodass ein retrograder Blutfluss (Regurgitation) durch die Klappe entsteht [6]. Der fehlregulierte Blutfluss durch eine stenosierte oder insuffiziente Herzklappe resultiert schließlich in einer Druck- bzw. Volumenbelastung des Herzens und einer Minderdurchblutung des Körpers:

Bei einer stenosierten Aortenklappe muss der linke Ventrikel den Kammerdruck erhöhen, um den erhöhten Abflusswiderstand (Nachlast) zu überwinden und den systemischen Blutdruck erhalten zu können. Die so entstehende Druckbelastung vermittelt wiederum einen myokardialen Wachstumsreiz mit konzentrischer Linksherzhypertrophie [7]. Diese mindert die myokardiale Dehnbarkeit und reduziert damit das diastolische Füllungsvolumen (Vorlast). Mangels ausreichender Vorlast kann es in einem zweiten Schritt zu einer Beeinträchtigung der systolischen Funktion kommen, was in der o.g. systemischen Minderdurchblutung mündet [7, 8].

Bei insuffizienter Aortenklappe führt der undichte Klappenschluss während der Diastole zur linksventrikulären Regurgitation [6]. Die damit wirkende Volumenbelastung triggert eine exzentrische Linksherzhypertrophie, die schließlich auch zur Beeinträchtigung der systolischen Funktion führt [7].

### 1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Das Risiko eine Herzklappenerkrankung zu entwickeln betrifft insbesondere ältere Menschen und verdoppelt sich mit jedem Lebensjahrzehnt [9, 7, 10]. Das Durchschnittsalter der Gesellschaft steigt stetig und damit auch die Bedeutung dieses Krankheitsbildes [11]. Aortenklappenstenosen machen mit ca. 43 % den größten Anteil aller Herzklappen-

erkrankungen aus [9]. Sie werden hauptsächlich durch eine Kalzifizierung des Klappengewebes verursacht [12]. Wesentlich seltenere Ursachen für eine Stenose der Aortenklappe sind das rheumatische Fieber oder kongenitale Fehlbildungen [13, 14]. Die verkalkende Aortenklappenstenose beruht nicht auf einer rein passiven Kalkablagerung, sondern ist vielmehr das Resultat eines aktiven pathobiologischen Prozesses [15–17]. Teilkomponenten dieses Prozesses sind eine chronische Inflammation [18–20], aktive Kalzifizierung [17, 21–26], Ablagerung von Lipoproteinen [27–29] und oxidativer Stress [30–32].

Neben dem hohen Lebensalter [10, 33] sind unter anderem folgende klinische Faktoren mit der Entstehung oder Progression einer verkalkenden Aortenklappenerkrankung assoziiert: männliches Geschlecht [10, 34, 35], Nikotinkonsum [10, 34–36], Hypertension [10, 33, 34, 36], Übergewicht [36], Diabetes [34, 37, 38] sowie das metabolische Syndrom [38]. Auch Veränderungen der Blutfettwerte gelten als Risikofaktoren, nämlich hohe Serumspiegel von Gesamtcholesterin [33, 36, 37, 39], Lipoprotein(a) [10] und Lipoprotein niedriger Dichte (LDL) [10, 34, 40] sowie niedrige Serumspiegel des Lipoproteins hoher Dichte (HDL) [34].

An nicht-rheumatischen Aortenklappenerkrankungen starben im Jahr 2019 allein in Deutschland 10.875 Menschen, was etwa 1,2 % aller Todesfälle in diesem Jahr ausmachte [41, 42]. Aufgrund der hohen Mortalität einer hochgradigen Aortenklappenstenose und des Mangels an Alternativen ist in den meisten Fällen ein rasches operatives Eingreifen erforderlich. Der Herzklappenersatz ist heutzutage eine Standardprozedur der Herzchirurgie und nach dem Bypass der zweithäufigste kardiovaskuläre Eingriff in Deutschland [43]. Etwa 65 % der isolierten Klappeneingriffe werden allein in Aortenposition durchgeführt [44].

## **1.2 Herzklappenprothesen**

### **1.2.1 Unterscheidung**

Beim Herzklappenersatz werden zwei Hauptarten von Prothesen unterschieden: mechanische Herzklappen aus nicht-biologischem Material (z. B. Metall, Carbon, Kunststoff) und biologische Herzklappen, die vollständig oder zum Teil aus menschlichem oder tierischem Gewebe bestehen [45–47].

Hinsichtlich ihres Materials werden verschiedene Kategorien von biologischen Herzklappen unterschieden; nämlich Xenografts, Autografts und Allografts [13]. Xenografts bestehen aus tierischem Gewebe, wie z. B. Aortenklappen vom Schwein oder Rinderperikard [13]. Sie

werden entweder gerüstlos implantiert oder befestigt an ein stabilisierendes, formgebendes Stentgerüst aus Kunststoff oder Metall [48]. Um deren Stabilität zu erhöhen und deren Antigenität zu verringern, werden diese z. B. mit Glutaraldehyd chemisch vorbehandelt [49].

Autografts und Allografts bestehen aus menschlichem Gewebe, wobei es sich bei Autografts um körpereigenes Gewebe und bei Allografts um Spendergewebe handelt [13, 48]. Als Autograft kann eine gesunde, patienteneigene Herzklappe dienen, die operativ an eine andere Klappenposition verlagert wird: Im Rahmen der Ross-Operation wird zunächst die patienteneigene Pulmonalklappe an die Stelle der erkrankten Aortenklappe transplantiert und die entfernte Pulmonalklappe anschließend durch eine fremde menschliche Spenderklappe ersetzt [13, 48]. Eine neuere Möglichkeit ist die Herstellung einer autologen Herzklappe aus patienteneigenen Zellen, die nach der Entnahme auf ein Gerüst transplantiert werden [50]. Als Gerüst dient hier beispielsweise ein synthetisch hergestelltes, biologisch abbaubares Polymergerüst in Form einer Herzklappe, auf dem die Zellen anhaften, wachsen und schließlich ein intaktes Gewebe bilden [51, 52]. Allografts sind Herzklappen verstorbener Spenderinnen und Spender, die vor der Implantation auf unterschiedliche Weise vorbehandelt werden können: Als Goldstandard gilt hier die Technik der Kryokonservierung, deren Anwendung zu einer besseren Haltbarkeit des Implantates führt [53, 54]. Deren limitierte Verfügbarkeit begründet die häufige Verwendung anderer biologischer Herzklappenvarianten.

### **1.2.2 Auswahl der Herzklappenprothese**

Mechanische und biologische Herzklappenprothesen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihres Materials, sondern zeigen auch eine abweichende Haltbarkeit, Thrombogenität und unterschiedliche hämodynamische Eigenschaften [45]. Bei der Wahl der Prothesenart werden deshalb verschiedene Faktoren berücksichtigt. Neben der Präferenz und dem Alter der Betroffenen spielen die Lebenserwartung, Komorbiditäten und die Indikation bzw. Kontraindikation für eine Antikoagulation eine Rolle [1, 55].

Mechanische Herzklappenprothesen unterliegen keinen Degenerationsprozessen und müssen nur selten komplikationsbedingt ausgetauscht werden [56, 57]. Dies äußert sich in einer sehr geringen Re-Operationsrate von weniger als 10 % nach 15 Jahren [58]. Aus diesem Grund wird bei jungen PatientInnen bevorzugt eine mechanische Herzklappenprothese ausgewählt [1, 55]. Nachteil ist zum Einen das erhöhte thromboembolische Risiko, welches eine lebenslange Antikoagulation erforderlich macht

und zum Anderen das damit erhöhte Blutungsrisiko [59]. Begünstigend auf das thromboembolische Risiko wirken erstens die Thrombogenität der künstlichen Klappenoberfläche, zweitens prothesenbedingte Blutstromveränderungen und drittens Scherstress mit nachfolgender Hämolyse, Endothelverletzungen, Thrombozytenaktivierung sowie Freisetzung thromboembolischer Faktoren [60]. Das Zusammenspiel dieser Faktoren begünstigt die Entstehung zerebraler und peripherer Thromboembolien. Um dieses Risiko zu verringern, folgt der Implantation einer mechanischen Herzklappe die lebenslange Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten [1]. Hierbei wird entsprechend der vorgesehenen Wirkung ein erhöhtes Blutungsrisiko in Kauf genommen, welches in Blutungskomplikationen münden kann: Häufig beschrieben wurden zerebrale, gastrointestinale sowie urogenitale Blutungen [61]. Thromboembolische Ereignisse und Blutungskomplikationen durch die Antikoagulation sind wesentliche Gründe für eine Re-Operation [62, 63].

Biologische Herzklappenprothesen bergen im Gegenzug ein geringeres Risiko für die Entstehung von Thromben, sodass eine Antikoagulation nicht notwendig ist [1]. Wesentlicher Nachteil ist eine fortschreitende Gewebedegeneration, die ihre Haltbarkeit limitiert und nach etwa 5 - 15 Jahren eine erneute Operation erfordert [46, 59, 64–68]. Da diese Degeneration bei jungen PatientInnen besonders schnell voranschreitet, wird der Einsatz von biologischen Herzklappenprothesen erst ab dem 60. - 65. Lebensjahr empfohlen [1, 64–66, 69]. Als Grund für die beschleunigte Degeneration in jungem Alter wird eine verstärkte immunologisch vermittelte Reaktion des Empfängers diskutiert: In jungem Alter treten höhere Konzentrationen relativ unspezifischer CD5+B-Zellen auf, die vermehrt das Prothesengewebe infiltrieren und eine immunvermittelte Degeneration vermitteln könnten [69]. Auch eine höhere körperliche Aktivität und die damit einhergehende Erhöhung des mechanischen Stresses auf die biologische Herzklappenprothese bietet einen möglichen Erklärungsansatz für den genannten Zusammenhang [70].

## **1.3 Degeneration biologischer Herzklappenprothesen**

### **1.3.1 Epidemiologie**

Mit der Forschung und Weiterentwicklung biologischer Herzklappenprothesen konnte deren Haltbarkeit in den letzten Jahren verlängert werden. In einer Langzeitbeobachtung über 15 Jahre waren neue Modelle biologischer Aortenklappenprothesen signifikant länger haltbar als deren Vorgänger: Während 61 % Patienten mit älteren Prothesenmodellen erneut operiert werden mussten, waren es in der Vergleichsgruppe nur 55 % [58]. Trotz dieser Fortschritte müssen aber weiterhin etwa 30 - 40 % der Betroffenen im üblichen Patientenkollektiv (> 60 Jahre) innerhalb von 15 Jahren erneut operiert werden [58, 71].

### **1.3.2 Risiko- und Einflussfaktoren**

Die Gewebedegeneration ist die Hauptursache für das Versagen biologischer Herzklappenprothesen und die häufigste Indikation für eine Re-Operation [72, 73]. Der wichtigste pathogenetische Prozess ist dabei die Kalzifizierung der Klappentaschen [74, 75]. Im Rahmen dieses Prozesses versteift das Gewebe, was zu einer Klappenstenose oder zu Einrissen mit nachfolgender Klappeninsuffizienz führen kann [74]. Zu den Einflussfaktoren der Klappenkalzifizierung gehören grundsätzlich der Empfänger-Metabolismus, natürliche Co-Faktoren und Inhibitoren, mechanische Einflüsse sowie die Struktur des Implantates [74].

Risikofaktoren von PatientInnenenseite sind ein junges Alter [58, 66, 76], Nikotinabusus [58, 77], Hypertension [10, 78, 79], Hypercholesterinämie [77, 80], Hypertriglyceridämie [77], Diabetes [77, 81] und ein vorliegendes metabolisches Syndrom [81]. Diese überschneiden sich mit den Risikofaktoren der Atherosklerose [77] und der Nativklappendegeneration [10, 33–39]. Darüber hinaus wird die Degeneration biologischer Herzklappenprothesen begünstigt durch eine Hypertrophie [58] und schlechte Pumpfunktion [82] des linken Ventrikels sowie eine chronische Niereninsuffizienz [76, 81, 83].

Zu den Risikofaktoren seitens des Implantates gehört unter anderem eine Vorbehandlung mit Glutaraldehyd, die bei biologischen Herzklappenprothesen tierischen Ursprungs (Xenografts) üblich ist [84, 85]. Diese begünstigt die Gewebekalzifizierung, wird aber in Kauf genommen um die Antigenität des Implantates zu verringern und dessen chemische Stabilität zu erhöhen [74, 75, 84, 85]. Darüber hinaus spielen einwirkende mechanische Kräfte eine Rolle: Die Implantate verkalken bevorzugt an Stellen, die intensiven

mechanischen Verformungen unterworfen sind, wie beispielweise den Flexionspunkten der Herzklappen [46, 86, 87].

### **1.3.3 Adipositas und Hypercholesterinämie als Risikofaktor**

Die Adipositas und die Hypercholesterinämie sind Teilkomponenten des sogenannten metabolischen Syndroms [88, 89]. Dieses bezeichnet die Kombination mehrerer Faktoren, die unter anderem als Risikofaktoren für die Degeneration biologischer Herzklappenprothesen gelten: Neben Adipositas und Dyslipidämie (z. B. Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie, niedriges HDL-Cholesterin), zählen hierzu ein erhöhter Blutdruck und eine erhöhte Nüchtern glukose [88, 90–92]. In der westlichen Weltbevölkerung wird die Prävalenz des metabolischen Syndroms auf etwa 25 % geschätzt [88, 93]. Diese ist, analog zur Prävalenz von Herzklappenerkrankungen, stark altersabhängig und insbesondere bei älteren Menschen erhöht [93, 94]. Bei weltweit zunehmendem Übergewicht ist die Tendenz außerdem steigend [95, 96]. Das metabolische Syndrom ist mit einer erhöhten Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und Todesfälle assoziiert [97, 98]. Es begünstigt die Kalkbildung in der nativen Aortenklappe [99] und die schnellere Progression einer Aortenklappenstenose [100]. Es ist außerdem ein unabhängiger Risikofaktor für die schnelle Degeneration biologischer Herzklappenprothesen und die Verschlechterung der hämodynamischen Prothesenfunktion [81]. Als häufiger, aber gleichzeitig modifizierbarer Faktor stellt das metabolische Syndrom ein wichtiges Ziel bei der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Neben strikten Lebensstilmodifikationen könnten bei PatientInnen mit biologischen Herzklappenprothesen also auch pharmakologische Ansätze sinnvoll sein, die in Schlüsselmechanismen des metabolischen Syndroms eingreifen.

### **1.3.4 Pathogenese**

Laut verschiedener Studien beruht die Degeneration biologischer Herzklappenprothesen auf aktiven Mechanismen, die im Gewebe stattfinden. Zu den bisher nachgewiesenen Prozessen gehören im Wesentlichen die Kalzifizierung [75, 101], Inflammation bzw. Immunabstoßung [102–104] und die Ablagerung von Lipoproteinen [105]. Im Folgenden wird der Zusammenhang zwischen den zuvor aufgeführten Risikofaktoren, den daraus angestoßenen Degenerationsprozessen und dem schließlich auftretenden Klappenversagen erläutert.

Kalzifizierungen biologischer Herzklappenprothesen beruhen auf einem aktiv regulierten Prozess, der von zellulären Komponenten oder Strukturproteinen der extrazellulären Matrix

(Kollagen, Elastin) im Prothesengewebe ausgeht [46, 87, 101, 106, 107]. Das zentrale Ereignis bei der initialen zellulären Kalzifizierung ist höchstwahrscheinlich die Reaktion von Kalzium aus dem Plasma mit organischem Phosphat (in Phospholipiden der Zellmembran) geschädigter Zellen im Prothesengewebe [46, 87, 106]. Die Zellschädigung wird durch eine chemische Vorbehandlung mit Glutaraldehyd (bei Xenografts) bzw. Autolyse, Ischämie oder anderweitige Traumata hervorgerufen [46, 87, 106]. Damit verlieren die Zellen ihre Fähigkeit, Kalzium mithilfe energieabhängiger Pumpen aus dem Zellinneren zu entfernen [46, 101, 108]. Das Resultat sind hohe Kalzium-Konzentrationen, die eine Bildung und das Wachstum von Kalziumphosphatkristallen begünstigen [109].

Darüber hinaus spielt das Ungleichgewicht von Kalzifizierungsaktivatoren und -hemmern eine Rolle: Diese werden unter anderem in Knochenzellen (Osteoblasten, Osteoklasten) exprimiert und greifen regulierend in deren Migration, Differenzierung und Adhäsion ein [110]. Osteoblasten ihrerseits produzieren Hydroxylapatit, ein hydroxyliertes Kalziumphosphatsalz, welches sie bei der Knochenbildung in die Kollagenmatrix einlagern [111]. Der Nachweis der o.g. Matrixproteine in kalzifizierten biologischen Herzklappen spricht für das Wirken eines aktiv regulierten Prozesses und legt den Schluss nahe, dass deren Expression eine heterotope Ossifikation fördern [112].

Das Immunsystem spielt eine bedeutsame Rolle bei der Degeneration biologischer Herzklappenprothesen. Dies konnte in diversen Studien am Menschen [104, 113, 114] und in Tierversuchen [75, 103, 115, 116] gezeigt werden: Überbleibsel vorhandener zellgebundener Antigene lösen eine humorale und zelluläre Immunreaktion des Empfängerorganismus aus, mit nachfolgender Gewebekalzifizierung bzw. -zerstörung [54, 75, 115, 117]. Bei Allografts handelt es sich um das Histokompatibilitäts-Antigen HLA [117], bei Xenografts um  $\alpha$ -Gal-Epitope [118].

Hinweisend auf die Beteiligung humoraler Immunreaktionen ist der Nachweis spenderspezifischer Antikörper gegen HLA-I und -II bei Allograft-Empfängern [104, 113, 117]. Hinweisend auf die Beteiligung einer zellulären Immunantwort ist der Nachweis von Entzündungszellen in zerstörtem bioprothetischem Herzklappengewebe [102, 119–121], nämlich T-Lymphozyten [75, 104, 113–116], B-Lymphozyten [114] und Makrophagen [75, 115].

Ursächlich für die Prothesendegeneration sind in diesem Zusammenhang T-Zell-vermittelte Reaktionen auf die Antigene des Spenders [113]: Die Antigene werden initial von T-Zellen

gebunden und als körperfremd identifiziert. Abhängig vom präsentierten Antigentyp folgen unterschiedliche Reaktionen: So triggern auf der einen Seite HLA-I-Antigene die Aktivierung CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen mit nachfolgender Zerstörung der Fremdzellen durch Proteinfreisetzung (u.a. Zytokine, Perforin) [122]. Auf der anderen Seite triggern HLA-II-Antigene die Aktivierung CD4-positiver T-Helferzellen, die wiederum B-Zellen zur Bildung antigenspezifischer Immunglobulin-G (IgG)-Antikörper anregen und Makrophagen zur Phagozytose [122]. Endstrecke der Aktivierungskaskade ist die Zerstörung der Zielzelle durch Apoptose oder Effektorzellen (z.B. Makrophagen, natürliche Killerzellen) [122].

Um die beschriebene Antigenität zu hemmen, werden Xenografts chemisch vorbehandelt [47]. Mittel der Wahl ist hierbei eine Fixierung mit Glutaraldehyd: Diese führt zur Quervernetzung von Kollagenfasern, sodass zellgebundene Antigene maskiert werden [47]. Dieser Fixierungsvariante birgt allerdings den Nachteil verbleibender freier Aldehyde auf der Zelloberfläche, die als Bindungsstellen für Kalzium und Phosphat wiederum eine Gewebekalzifizierung fördern [87, 123].

Auch die Ablagerung von Lipoproteinen trägt zur Degeneration biologischer Herzklappenprothesen bei. So zeigte sich in humanen Nativklappen eine Koinzidenz von Lipoprotein-Ablagerungen und kalzifizierten Klappenarealen [27, 28]. Im Prothesengewebe abgelagertes LDL kann ausgelöst durch reaktive Sauerstoffspezies oxidieren und degenerative Prozesse anstoßen [105, 124]. Oxidiertes LDL fördert in Klappenfibroblasten die Freisetzung von Matrixvesikeln, die als Ausgangsort einer frühen Kalzifizierung gelten [15]. Außerdem bietet oxidiertes LDL, unter dem Einfluss inflammatorischer Zytokine, die Grundlage für eine Osteoblastendifferenzierung wandlungsfähiger Klappen-Interstitialzellen [25, 26]. Wie oben beschrieben, exprimieren Osteoblasten nachfolgend osteoblastische Marker (u. a. Osteocalcin) und vermitteln eine Gewebekalzifizierung durch die Produktion von Hydroxylapatit [111, 125, 126]. Dieses findet sich aber auch in kalzifiziertem Arterienewebe [127, 128] und Herzklappengewebe [125], was den Einfluss von Osteoblasten auf die kardiovaskuläre Degeneration impliziert.

## 1.4 PPAR und Prothesendegeneration

### 1.4.1 Peroxisom-Proliferator-Aktivierende-Rezeptoren

Die Hemmung der zuvor beschriebenen Degenerationsprozesse könnte die Haltbarkeit biologischer Herzklappenprothesen verlängern. Ein neuerer Ansatz ist die pharmakologische Aktivierung des sogenannten Peroxisom-Proliferator-Aktivierenden-Rezeptors- $\gamma$ .

Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren (PPAR) sind eine Familie von Kernrezeptoren, die durch die Bindung von Liganden aktiviert werden [129, 130]. Sie sind eine Untergruppe der Kernrezeptor-Superfamilie, zu der 48 Steroidrezeptoren zählen [129–132]. In der PPAR-Familie werden drei Isoformen unterschieden: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  bzw.  $\delta$  und PPAR $\gamma$  [130]. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung [133–138], Ligandenspezifität [139] und Funktion [139].

PPAR $\alpha$  findet sich hauptsächlich in Leber, Niere, Herz, Muskeln und Gefäßwänden [137]; PPAR $\beta/\delta$  in Haut, Gehirn- und Fettgewebe [138]. PPAR $\gamma$  findet sich überwiegend in Fettgewebe und wird durch verschiedene Fettsäuren und Fettsäuremetabolite aktiviert [140, 136]. Er spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der Adipogenese, Fettsäuresynthese und im Energiehaushalt [134, 135, 140–143]. Darüber hinaus findet sich PPAR $\gamma$  aber auch in Gefäßwänden, Makrophagen sowie im Gewebe des Pankreas und vieler anderer Organe [133–135]. In der Gefäßwand wird PPAR $\gamma$  von Endothel- und Glattmuskelzellen exprimiert [133, 134] und betrifft somit Zellen, die an Gefäßpathologien beteiligt sind. Die vorliegende PPAR $\gamma$ -Expression in Makrophagen legt deren mögliche Beteiligung im aktiven Prozess der Prothesendegeneration nahe, da diese Entzündungszellen in degeneriertem bioprothetischem Herzklappengewebe zahlreich nachgewiesen wurden [75, 116, 115, 133, 134].

Unabhängig vom Ort des Wirkens regulieren alle PPAR die lokale Genexpression, angestoßen durch die Bindung spezifischer Liganden [130, 137]. Nach der Ligandenbindung werden die Rezeptoren in den Zellkern transportiert, verändern dort ihre Struktur und regulieren die Transkription von Genen [134, 144–146]. Beteiligt sind außerdem Co-Aktivatoren-Proteine die nach der Strukturveränderung mit dem PPAR-Liganden-Komplex interagieren können [134]. PPAR-Liganden unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Interaktion mit Co-Aktivatoren-Proteinen [147], was die beobachteten Unterschiede der biologischen Antwort erklärt [130, 137, 148]. Über die so vermittelte Zielgen-Regulation beeinflussen PPAR den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel, Wachstum und Differenzierung von

Zellen, Apoptose, Neovaskularisierung sowie die Immunantwort des Organismus [139, 149].

PPAR $\gamma$  nimmt eine Sonderrolle im Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel ein, da er nach Aktivierung die Insulinsensitivität des Körpers aufrecht erhält [150]. Dies leistet dieser Rezeptor, indem er für eine angemessene Sekretion von Adipozytokinen (z. B. Adiponectin und Leptin) sorgt, die als Vermittler der peripheren Insulinwirkung agieren [151, 152]. Außerdem reguliert er Gene, die bei der Freisetzung, Speicherung und dem Transport von Fettsäuren (u. a. Fettsäuretransporter FATP, Lipoproteinlipase) mitwirken [141, 143, 153–157]. Auch Gene die eine Glukoseaufnahme in Skelettmuskel und Fettgewebe vermitteln (z. B. Glukosetransporter GLUT4), gehören zu den Regulationszielen [158, 159]. Die Aktivierung von PPAR $\gamma$  verbessert metabolische Kennzahlen, wie HDL- und LDL-Cholesterin, insbesondere von Typ 2 DiabetikerInnen [160].

PPAR $\gamma$  beeinflusst auf verschiedenen Wegen aber auch die kardiovaskuläre Kalzifizierung: Indem er ausgewählte Zielgene in Endothelzellen reguliert, schützt er vor der Entwicklung einer Atherosklerose [161–165] und wirkt anti-inflammatorisch [166, 167]. Verschiedene Studien lassen vermuten, dass PPAR $\gamma$  indirekt die Osteoblastenexpression reguliert: In PPAR $\gamma$ -insuffizienten *knock-out*-Mäusen war die osteoblastische Differenzierung multipotenter Vorläuferzellen und damit die Knochenbildung erhöht [168]. Seine Hemmung erhöhte außerdem die osteoblastische Differenzierung embryonaler Stammzellen *in-vitro* [168, 169]. Da Osteoblasten Kalziumphosphatsalze in Geweben einlagern, sind sie wichtige Promotoren der kardiovaskulären Kalzifizierung [111].

Zusammengefasst ist eine Fehlregulation von PPAR $\gamma$  also mit der Entwicklung von Übergewicht, Typ 2 Diabetes und Atherosklerose assoziiert. Dies macht PPAR $\gamma$  zu einem vielversprechenden pharmakologischen Ziel bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen bzw. der Modulation von Risikofaktoren der kardiovaskulären Degeneration.

#### **1.4.2 Klinische Anwendung und Effekte von PPAR $\gamma$ -Agonisten**

Die pharmakologische Modulation von PPARs gehört bereits seit vielen Jahren zum klinischen Alltag. PPAR $\alpha$ -Agonisten (Statine) werden zur Lipidsenkung eingesetzt. PPAR $\gamma$ -Agonisten werden als Glitazone oder Thiazolidindione (TZD) bezeichnet und dienen hauptsächlich der Behandlung von Typ 2 DiabetikerInnen und PatientInnen mit gestörter Glukosetoleranz. Zu dieser Gruppe zählen u.a. die Wirkstoffe Pioglitazon und Rosiglitazon [138]. Im Wesentlichen erhöhen sie die Insulinsensitivität des Körpers und werden deshalb

auch als *Insulin-Sensitizer* bezeichnet [170–174]. In verschiedenen klinischen Studien senkten TZD damit stets wichtige Stoffwechselfparameter im Blut: hierzu gehören die Nüchtern glukose und postprandiale Glukose, freie Fettsäuren sowie meist auch die Insulinkonzentration [170–179]. Der Einfluss auf die Blutfettwerte unterscheidet sich zwischen den unterschiedlichen TZD-Wirkstoffen [180]. Studien zeigen allerdings, dass Pioglitazon die Blutspiegel von Triglyceriden und LDL senkt, während es das HDL erhöht [180–183]. Eine Meta-Analyse bestätigte die positive Wirkung von Pioglitazon auf die Blutglukose- und Lipidparameter, bei gleichzeitig guter Verträglichkeit [160].

Eine mangelnde Insulinsensitivität (Insulinresistenz) peripherer Gewebe erhöht die Inzidenz von myokardialen Infarkten und Tod [184]. Darüber hinaus ist sie ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer frühen Restenose nach koronarer Stentimplantation [185]. Der kompensatorisch erhöhte Insulinspiegel stellt seinerseits einen unabhängigen Risikofaktor für die ischämische Herzkrankheit dar [186]. In experimentellen Modellen verstärkte eine Hyperinsulinämie die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen [187, 188]. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Verbindung zwischen Insulinresistenz auf der einen Seite und myokardialen Infarkten und Re-Stenosen *gestenteter* Gefäße auf der anderen Seite.

Im Gegensatz dazu zeigte eine Meta-Analyse von 19 Studien, dass eine Pioglitazon-Therapie zu einer signifikanten Reduktion von Myokardinfarkt, Schlaganfall und Tod führt [189]. Wird im Zuge einer koronaren Gefäßstenosierung ein Stent implantiert, so erhält Pioglitazon den Interventionserfolg: Eine Meta-Analyse von sechs randomisierten kontrollierten Studien zeigte, dass es bei Typ 2 DiabetikerInnen die Rate der *In-Stent*-Restenose reduziert und eine erneute Revaskularisierung somit seltener notwendig wird [190]. Auch bei Betroffenen ohne Diabetes konnte ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden [191, 192].

Neben den oben genannten Gefäßpathologien reduziert Pioglitazon auch Degenerationsprozesse in der nativen Herzklappe. In hypercholesterinämischen Tiermodellen konnte echokardiographisch nachgewiesen werden, dass Pioglitazon die Verschlechterung der Aortenklappenfunktion verlangsamt [193, 194]. Begleitend bewirkte es eine Reduktion von Kalzifizierung, Lipidablagerungen, Entzündungsaktivität, Apoptose und oxidativem Stress im Aortenklappengewebe [193, 194].

### 1.4.3 Wirkmechanismus von PPAR $\gamma$ -Agonisten

TZD vermitteln die zuvor beschriebenen Effekte indem sie PPAR $\gamma$  aktivieren und somit die Expression von mehr als 100 Genen regulieren [195].

Über eine Steigerung der Insulinwirkung vermitteln sie eine vermehrte Glukoseaufnahme in Adipozyten, Hepatozyten sowie Skelettmuskelzellen und somit einen Abfall der postprandialen Glukosespiegel [171, 196–200]. Unterstützend hemmen sie in der Leber die Gluconeogenese [201, 202] und erhalten die Funktion von insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas [203–205]. Dies erklärt die beschriebenen TZD-vermittelten Wirkungen auf Glukose- und Insulinspiegel im Blut.

Ein weiterer Mechanismus ist die Förderung der Fettsäurespeicherung im Fettgewebe, bei gleichzeitiger Fettmobilisation aus anderen Insulin-sensitiven Geweben [196–198, 206]. Dies verringert die Blutspiegel freier Fettsäuren und macht Glukose stattdessen zum wesentlichen Brennstoff-Substrat [207]. Der so erhöhte Glukosebedarf peripherer Gewebe steigert auf direktem Wege die Insulinsensitivität. Außerdem werden Leber, Skelettmuskel und pankreatische  $\beta$ -Zellen vor dem schädigenden Einfluss hoher Fettsäure-konzentrationen geschützt [138, 208]. Es ist wichtig zu erwähnen, dass eine TZD-Therapie die Fettsäurespeicherung nicht in allen Fettdepots gleichermaßen erhöht: beobachtet wurde eine Zunahme des subkutanen Fettdepots [138, 172, 178] bei gleichzeitiger Abnahme [172] oder Konstanz [178] des viszeralen Fettdepots. Dies ist bedeutsam, da TZD somit jenes Fettdepot verringern können, das im Zusammenhang zwischen Übergewicht und Typ 2 Diabetes eine Rolle spielt [209]. Die häufig beobachtete Gewichtszunahme bei TZD-Therapie [171–173, 178, 210] ist also nicht zwingend mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert. Teilweise wird die Gewichtszunahme bei TZD-Therapie auch der Nebenwirkung einer Ödembildung zugeschrieben [138].

Die Pioglitazon-vermittelte Reduktion von Myokardinfarkten [189] lässt sich durch dessen anti-atherogenen Eigenschaften erklären [211–213]. Die häufigste Ursache für Myokardinfarkte ist ein koronarer Gefäßverschluss, hervorgerufen durch die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque [214]. Die Atherosklerose ist wiederum eine Erkrankung der Intima-Gefäßschicht, die durch Lipidablagerungen, Gewebeverdickung (Intima-Hyperplasie) und eine chronische Entzündung charakterisiert ist [215]. Pioglitazon reduziert Lipidablagerungen, indem es möglicherweise den Cholesterin-Efflux in Makrophagen fördert [216]. Darüber hinaus hemmt es die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen und wirkt so der Intima-Hyperplasie entgegen [217]. In

Tiermodellen konnte eine TZD-vermittelte Reduktion der Intima-Hyperplasie nach balloninduzierter Gefäßverletzung nachgewiesen werden [218, 219].

Die koronare *In-Stent*-Restenose ist ebenfalls auf eine Intima-Hyperplasie zurückzuführen und tritt bevorzugt bei PatientInnen mit Typ 2 Diabetes auf [220–224]. Eine Vielzahl von klinischen Studien und Tierversuchsmodellen deutet darauf hin, dass Pioglitazon ebendiesen Prozess hemmt [190–192, 225–233]. Teilweise war dieser Effekt auch bei unveränderten Lipid- und Glukosewerten nachweisbar [190, 230]. Folglich ist die Reduktion der Intima-Hyperplasie nicht durch den Einfluss von Pioglitazon auf den Glukosestoffwechsel bedingt, sondern durch die Einflussnahme in andere biologische Prozesse. Ursächlich könnte hier die Pioglitazon-vermittelte Hemmung lokaler Entzündungswege sein: Studien wiesen in diesem Kontext eine reduzierte Genexpression der inflammatorischen Biomarker *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) und *transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) nach [231, 233]. Ebenso zeigte sich eine reduzierte Infiltration mit Monozyten und Makrophagen [232]. Außerdem erhöht eine TZD-Therapie die Anzahl endothelialer Vorläuferzellen, fördert so eine Endothelialisierung und könnte so die Entwicklung einer *In-Stent*-Restenose reduzieren [234]. Ein anti-thrombotischer [235–237] und pro-apoptotischer Effekt [238] von Pioglitazon könnte ebenfalls zu einer geringeren Intima-Hyperplasie beitragen.

Die Pioglitazon-vermittelte Reduktion von Schlaganfällen [189, 239] scheint ebenfalls auf anti-proliferativen und anti-inflammatorischen Effekte zu beruhen: Pioglitazon verringerte die Intima-Media-Dicke der *Arteria carotis* [211], die als klinischer Vorhersagewert für kardiovaskuläres Risiko und Schlaganfälle gilt [240, 241]. Assoziiert war diese Pioglitazon-vermittelte Verringerung der Gewebe-Hyperplasie mit einer Reduktion des C-reaktiven Proteins und des Makrophagen-Chemoattraktorproteins-1, die zu den inflammatorischen Biomarkern zählen [211].

In nativen Aortenklappen hypercholesterinämischer Mäuse konnte eine Pioglitazon-vermittelte Reduktion von Lipid- und Kalkablagerungen beobachtet werden [193]. Gleichzeitig zeigte sich eine reduzierte Genexpression verschiedener pro-kalzifizierender und pro-inflammatorischer Gene [193], nämlich des Knochenmorphogenetischen Proteins 2 (BMP2), des Runt-verwandten Transkriptionsfaktors 2 (RUNX2), Osteocalcin (OCN) und Interleukin-6 (IL-6). Die Reduktion von Lipidablagerungen reduziert den schädlichen Einfluss oxidierter Lipide, die ihrerseits Hauptauslöser von Kalzifizierung und Inflammation sind [15, 242]. Diesen Erkenntnissen zufolge wirkt Pioglitazon der Nativklappendegeneration entgegen.

## 1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die Atherosklerose sowie die Degeneration von Nativklappen und biologischen Herzklappenprothesen beruhen auf sehr ähnlichen aktiv regulierten Gewebeprozessen. Beteiligt sind Gewebe-Hyperplasie, Kalzifizierung und Inflammation. Bekannt ist, dass eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  die Degeneration nativer Aortenklappen inhibiert. Unbekannt ist hingegen, ob dieser Effekt auch in biologischen Aortenklappenprothesen wirkt.

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob die PPAR $\gamma$ -Aktivierung bei Vorliegen der o. g. Risikofaktoren die Degeneration klappentragender Aortenkonduits (AoCs) beeinflussen kann.

Hierbei sollen insbesondere folgende Fragen beantwortet werden:

1. Reduziert die PPAR $\gamma$ -Aktivierung die Verschlechterung der Klappenfunktion?
2. Reduziert die PPAR $\gamma$ -Aktivierung die Intimahyperplasie in Bioprothesen?
3. Reduziert die PPAR $\gamma$ -Aktivierung die Kalzifizierung von Bioprothesen?
4. Reduziert die PPAR $\gamma$ -Aktivierung chondro-osteogene Prozesse in Bioprothesen?
5. Reduziert die PPAR $\gamma$ -Aktivierung die inflammatorische Aktivität in Bioprothesen?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde ein Modell der heterotopen Implantation bei adipösen und hypercholesterinämischen Ratten angewendet. Dieses bildet 1.) die hämodynamische Belastung der Bioprothese und 2.) den Einfluss gängiger metabolischer Risikofaktoren beim menschlichen Herzklappenersatz nach.

Neben einem fettreichen Spezialfutter erhielt die Versuchsgruppe den Wirkstoff Pioglitazon, um pharmakologisch PPAR $\gamma$  zu aktivieren. Analysiert wurden die klappentragenden Aortenkonduits mithilfe von Echokardiographie, klassisch-histologischen und immunhistologischen Methoden sowie der qPCR.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gebrauchswaren und Substanzen

Tabelle 1: Gebrauchswaren und Substanzen

<b>Material/Substanz</b>	<b>Hersteller, Artikelnummer</b>
96-Well Mikrotiterplatten	Carl Roth GmbH & Co. KG
Aceton	Merck KGaA, 1.00013.2500
Albumin-Fraktion-V	Carl Roth GmbH & Co. KG, 8076.3
Alcianblau	Sigma-Aldrich, A5268-25G
Alizarinrot-S	Carl Roth GmbH & Co. KG, 0348.2
Ammoniak-Lösung, 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, CP17.1
Blutzucker-Teststreifen	Roche Diabetes Care Deutschland GmbH
Brilliant Crocein R	Waldeck GmbH & Co. KG, 1B-109
Carprofen	Norbrook Laboratories Ltd, 2503-90
Chloroform	Sigma-Aldrich, C2432-500ML
DAPI	Carl Roth GmbH & Co. KG, 6335.1
Deckgläser	Engelbrecht GmbH, K12450
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, 276855
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, 4984.3
Einbettmedium (KP-CryoCompound)	VWR International GmbH, 1620-C
Einschlussmittel (Leica CV Ultra)	Leica Biosystems Nussloch GmbH, 070937891
Einschlussmittel (ROTI Histokitt II)	Carl Roth GmbH & Co. KG, T160.1
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, 236489-100G
Eosin B	Sigma-Aldrich, 861006
Essigsäure, 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, 6755.2
Ethanol, 100 %	VWR International GmbH, 85033.360
Fettstift (Dako-Pen)	Agilent Technologies, S2002
Formaldehyd-Lösung, 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, 4979.1
Formaldehyd-Lösung, 4 % (ROTI Histofix)	Carl Roth GmbH & Co. KG, P087.3
GoTaq qPCR Master Mix	Promega GmbH, A6002
Hämatoxylin (Shandon Gill 3)	Thermo Fisher Scientific, 6765009
Heparin	B. Braun Melsungen AG, 204 7217
Isofluran-Sauerstoff-Gemisch; 2-2,5 %	Actavis, 3401722
Isopentan	Carl Roth GmbH & Co. KG, 3927.2
Jod	Carl Roth GmbH & Co. KG, 7935.1
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, HN02.3
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, 3904.1
Kaliumiodid	Carl Roth GmbH & Co. KG, 8491.1
Kältebeständige Röhrchen	VWR International GmbH, 479-1262
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, N069.1
Kunststoff-Formen für Histologie	Medite Medical GmbH, 48-6303-00
Natriumcarbonat	Merck KGaA, 1.06392.1000
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, HN00.3
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, 72049-250G
Objekträger 76 x 26 x 2 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, 0810000
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich, P4006-250G
Pikrinsäure	VWR International GmbH, 84512.260
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Quiagen GmbH, 205313
Rattenfutter mit 34,6 % Fett	ssniff Spezialdiäten GmbH, D12492
Rattenfutter mit Pioglitazon	ssniff Spezialdiäten GmbH
RNeasy Mini Kit	Quiagen GmbH, 74106
Safran du Gâtanais	Waldeck GmbH & Co. KG, 5A-394

Salzsäure 37 %	Merck KGaA, 1.00317.1000
Säurefuchsin	Carl Roth GmbH & Co. KG, T128.1
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, 9370.1
SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, 11733046
Triton X-100	Sigma-Aldrich, T9284
TRIzol	Sigma-Aldrich, 93289
Tween20	Merck KGaA, 655205
Xylol	VWR International GmbH, 28975.325

## 2.1.2 Lösungen

**Tabelle 2: Lösungen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Albumin-Fraktion-V-Lösung, 1 %	0,25 g Albumin-Fraktion-V 25 ml Tween-20-Lösung; 0,1 %
Albumin-Fraktion-V-Lösung, 5 %	10 g Albumin-Fraktion-V 200 ml Tween-20-Lösung; 0,1 %
Alcianblau-Lösung, 1 %	2 g Alcianblau 200 ml dH <sub>2</sub> O
Alizarin-Lösung, 2 %	2 g Alizarinrot-S 80 ml dH <sub>2</sub> O
Alkalische Alkohol-Lösung	360 ml EtOH, 96 % 40 ml Ammoniak-Lösung, 30 %
Alkoholische Hämatoxylin-Lösung, 2%	10 g Hämatoxylin 500 ml EtOH, 96 %
Alkoholische Safran-Lösung	12 g Safran du Gâtanais 200 ml EtOH, 100%
Bouin's-Lösung	300 ml Pikrinsäure 100 ml Formaldehyd-Lösung, 37 % 20 ml Essigsäure, 100 %
Brilliant Crocein R-Lösung	4 g Brilliant Crocein R 398 ml dH <sub>2</sub> O
Eisenchlorid-Lösung	12,4 g Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat 500 ml dH <sub>2</sub> O 5 ml Salzsäure, 37 %
Eosin-B-Lösung	1 g Eosin 100 ml dH <sub>2</sub> O 100 ml EtOH, 100% 200 µl Essigsäure, 100 %
Essigsäure, 1 %	5 ml Essigsäure, 100 % 495 ml dH <sub>2</sub> O
Essigsäure, 5 %	10 ml Essigsäure, 100 % 190 ml dH <sub>2</sub> O
Jod-Lösung	10 g Jod 20 g Kaliumiodid 500 ml dH <sub>2</sub> O
Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung	50 ml Formaldehyd-Lösung, 37 % 10 g Natriumcarbonat 150 ml dH <sub>2</sub> O
Natriumthiosulfat-Lösung, 5 %	10 g Natriumthiosulfat 200 ml dH <sub>2</sub> O
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,78 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

	1000 ml dH <sub>2</sub> O pH-Einstellung auf 7,4 mit Salzsäure, 37 %
Phosphorwolframsäure, 5 %	25 g Phosphorwolframsäure 500 ml dH <sub>2</sub> O
Säurefuchsin	0,5 g Säurefuchsin 497,5 ml dH <sub>2</sub> O 2,5 ml Essigsäure, 100 %
Silbernitrat-Lösung, 5 %	10 g Silbernitrat 200 ml dH <sub>2</sub> O
Triton-X-Lösung; 0,25 %	500 µl Triton-X-100 200 ml PBS
Tween-20-Lösung; 0,1 %	750 µl Tween20 750 ml PBS

dH<sub>2</sub>O: destilliertes Wasser, EtOH: Ethanol, g: Gramm, KCl: Kaliumchlorid, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Kaliumhydrogenphosphat, ml: Milliliter, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, NaCl: Natriumchlorid, PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, µl: Mikroliter.

### 2.1.3 Antikörper

**Tabelle 3: Antikörper**

Antikörper	Artikelnummer	Hersteller
Alexa Fluor 488 (anti-Kaninchen)	A11070	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor 546 (anti-Maus)	A-11003	Thermo Fisher Scientific
Anti-CD3 (Kaninchen)	C7930	Sigma-Aldrich
Anti-CD68 (Maus)	ab31630	Abcam
Anti-Syn3 (Kaninchen)	ab63932	Abcam
Anti-vWF (Kaninchen)	A0082	Agilent Technologies
Anti-αSMA (Maus)	A5228	Sigma-Aldrich

CD: cluster of differentiation, Syn3: Syndecan-3, vWF: von-Willebrand-Faktor, αSMA: α-Glattmuskel-Aktin

### 2.1.4 Software

**Tabelle 4: Software**

Software	Hersteller
Excel 2011	Microsoft Corporation
ImageJ 1.52p	Wayne Rasband, National Institutes of Health
Leica Application Suite 3.8	Leica Microsystems GmbH
Prism 6.01	GraphPad Software Inc.
StepOne-Software 2.3	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.5 Geräte

**Tabelle 5: Geräte**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsmessgerät	BioPhotometer plus	Eppendorf AG
Durchlichtmikroskop	DM 2000, 331009-102010	Leica Camera AG
Echokardiographiegerät	Philips HDX11	Philips GmbH
Echtzeit-PCR-System	StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific
Fluoreszenzlampe	EL6000	Leica Microsystems GmbH
Gefriermikrotom	CM 1950	Leica Camera AG
Homogenisator	MICCRA D-8	MICCRA GmbH
Mikroskopkamera	DFC425 C, 505374710	Leica Microsystems GmbH
Thermocycler	T3000	Biometra GmbH
Zentrifuge	5804R	Eppendorf AG

## 2.1.6 Herstellerverzeichnis

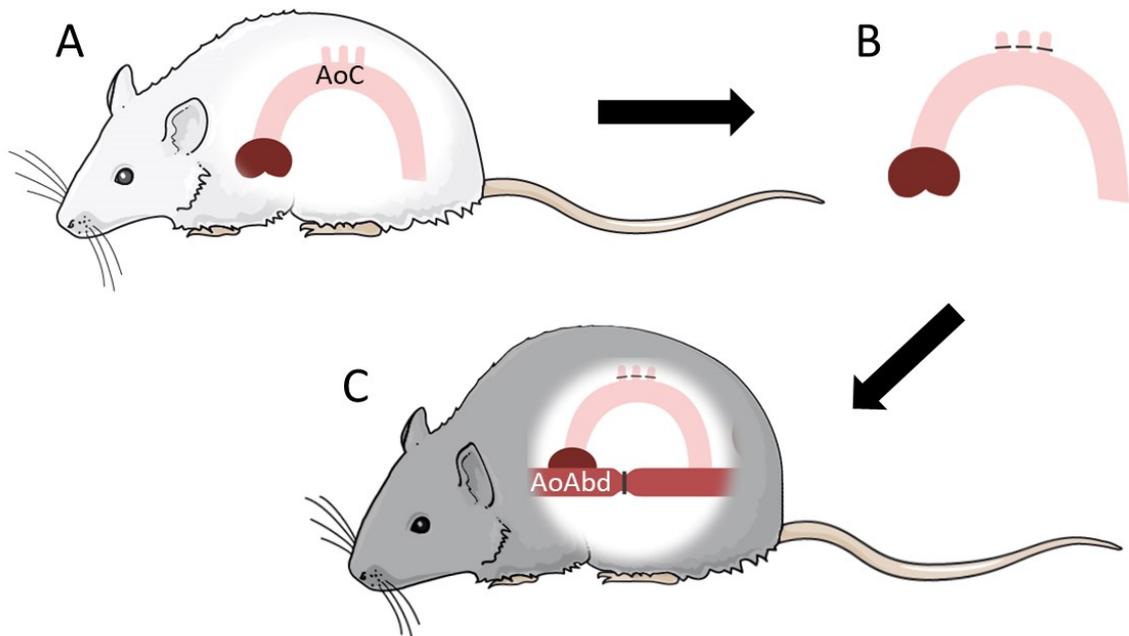
Tabelle 6: Herstellerverzeichnis

<b>Hersteller</b>	<b>Hauptsitz</b>
Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
Actavis	Luxemburg, Luxemburg
Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Engelbrecht GmbH	Edermünde (Besse), Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
GraphPad Software Inc.	San Diego, USA
Janvier Labs	Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nußloch, Deutschland
Leica Camera AG	Wetzlar, Deutschland
Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Medite Medical GmbH	Hannover, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA
Norbrook Laboratories Ltd	Newry, Vereinigtes Königreich
Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Philips GmbH	Hamburg, Deutschland
Promega GmbH	Walldorf, Deutschland
Quiagen GmbH	Hilden, Deutschland
Roche Diabetes Care Deutschland GmbH	Mannheim, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest, Deutschland
Tecan Austria GmbH	Grödig/Salzburg, Österreich
Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
VWR International GmbH	Radnor, Pennsylvania, USA
Waldeck GmbH & Co. KG	Münster, Deutschland
Wayne Rasband, National Institutes of Health	Bethesda, Maryland, USA

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Studienaufbau

Um die Degeneration klappentragender AoCs im Kontext einer Adipositas und Hypercholesterinämie zu untersuchen, wurde ein operatives Ratten-Tiermodell verwendet. Alle Tiere erhielten ein fetthaltiges Spezialfutter (34,6 % Fett) und wurden der heterotopen Implantation eines klappentragenden AoCs zugeführt (Abb. 1).



**Abb. 1: Schema der heterotopen Implantation**

Explantation eines klappentragenden Aortenkonduits (AoC) aus einer Sprague-Dawley-Ratte (A) und infrarenale Implantation dieses Explantates (B) an die abdominelle Aorta (AoAbd) einer adipösen, hypercholesterinämischen Wistar-Ratte (C). AoAbd: abdominelle Aorta, AoC: klappentragendes Aortenkondukt. Diese Abbildung wurde unter Verwendung einer Servier Medical Art Vorlage erstellt, die unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported Lizenz steht.

Um den Effekt der PPAR $\gamma$ -Aktivierung zu untersuchen, wurde eine Versuchsgruppe mit Pioglitazon (75 mg/kg Futter) behandelt (Gruppe PIO,  $n=20$ ) und mit der entsprechenden unbehandelten Gruppe (Kontrollgruppe C,  $n=20$ ) verglichen (Tabelle 7). Zur Erfolgskontrolle des Versuchsmodells wurden echokardiographische und laborchemische Untersuchungen durchgeführt. Nach 4 oder 12 Wochen wurden die AoCs abschließend echokardiographisch untersucht und explantiert (Tabelle 7). Um die degenerativen Prozesse zu analysieren, wurden nach der Explantation verschiedene klassisch-histologische und immunhistologische Färbemethoden ( $n=8$  je Gruppe) sowie die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR,  $n=12$  je Gruppe) angewendet.

**Tabelle 7: Zeitlicher Studienverlauf**

<b>Gruppe</b>	<b>Woche -3</b>	<b>Woche -2</b>	<b>Tag 0</b>	<b>Woche 4</b>	<b>Woche 12</b>
<b>PIO</b>	HF	AI + PIO	Impl. AoC	Expl. PIO <sub>4</sub>	Expl. PIO <sub>12</sub>
<b>C</b>	HF	AI	Impl. AoC	Expl. C <sub>4</sub>	Expl. C <sub>12</sub>

AI: Induktion der Aortenklappeninsuffizienz, AoC: Klappentragendes Aortenkonduit, Expl: Explantation, HF: Fettreiches Futter (34,6 % Fett), Impl: Implantation, PIO: Futterzusatz Pioglitazon (75 mg/kg Futter).

### 2.2.2 Versuchstiere und Haltung

Alle Interventionen und Operationen wurden von Frau Dr. med. Anna Kathrin Assmann durchgeführt und erfolgten auf der Grundlage des genehmigten Tierversuchsantrag vom 27.07.2017, mit dem Aktenzeichen 84-02.04.2017.A182.

Untersucht wurden insgesamt 40 Versuchstiere. Es handelte sich ausschließlich um erwachsene männliche Tiere mit einem Gewicht von 200 - 250 g. Um eine allogene Transplantationssituation zu schaffen, wurden zwei verschiedene Rattenstämme gewählt. Als Implantatspender dienten Sprague-Dawley-Ratten ( $n = 40$ ), als Implantatempfänger Wistar-Ratten ( $n = 40$ ). Die Spendertiere wurden von der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf (Deutschland) bezogen, die Empfängertiere von der Firma Janvier Labs.

Die Tiere wurden unter festgelegten Bedingungen gehalten, auf Grundlage der *Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere*. Die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme erfolgte *ad libitum*. Alle Tiere erhielten ein Spezialfutter mit einem Fettanteil von 34,6 %. Diese Fütterung wurde drei Wochen vor der Implantation begonnen (Tabelle 7).

### 2.2.3 Gewinnung und Konservierung des Implantates

Als Implantat dienten AoCs aus Sprague Dawley-Ratten ( $n = 40$ ). Deren Gewinnung erfolgte angelehnt an das zuvor publizierte Vorgehen von Assmann et al. [243].

Für die Organentnahme wurden die Spendertiere mit einer inhalativen Überdosierung von Isofluran getötet. Nach einer intravenösen Antikoagulation mit Heparin (300 IE/kg Körpergewicht) wurde der Kreislauf daraufhin mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) perfundiert. Im Anschluss wurde die Aortenklappe mit der gesamten Aorta entnommen, die Koronararterien ligiert und die supraaortalen Gefäßabgänge mit Clips verschlossen. Das

Präparat wurde anschließend in Dimethylsulfoxid getaucht, schonend eingefroren und bis zur Implantation bei einer Temperatur von -80 °C konserviert.

#### **2.2.4 Induktion einer Aortenklappen-Insuffizienz**

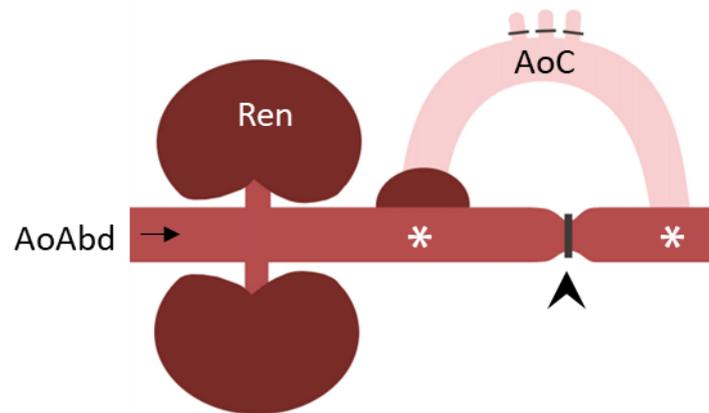
Um eine möglichst physiologische hämodynamische Belastung des künftigen Implantats nachzubilden, wurde bei den Empfänger-Ratten zwei Wochen vor der Implantation eine Insuffizienz der nativen Aortenklappe (AI) induziert [244]. Aus dieser AI-Induktion resultiert während der Diastole ein retrograder Blutfluss durch die native Klappe und die Aorta *descendens*. Dieser Pendelfluss in der Aorta *descendens* hat zur Folge, dass bei der anschließend implantierten Klappe die Klappenfunktion, also das Öffnen und Schließen, gewährleistet wird. Ohne diesen Pendelfluss würde die implantierte Klappe durch den nur in eine Richtung weisenden Fluss permanent offenstehen. Diese Prozedur erfolgte unter einer inhalativen Allgemeinanästhesie mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (2 - 2,5 %) und einer subkutan applizierten Analgesie mit Carprofen (5 mg/kg/Tag). Nach Eröffnung der A. carotis communis wurde eine Kunststoffkanüle retrograd bis zur Klappenebene vorgeschoben, um die Taschen der Aortenklappe unter echokardiographischer Kontrolle mit einem Führungsdraht zu perforieren [244, 245].

Im Rahmen der AI-Induktion wurde für spätere Analysen jedem Tier 1 ml Blut entnommen. Dieses wurde über 20 Minuten bei 4 °C und bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das Blutplasma im Anschluss abpipettiert. Die Lagerung des Blutplasmas erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei einer Temperatur von -80 °C.

#### **2.2.5 Implantation der klappentragenden Aortenkonduits**

Die Implantation des AoC in die Empfänger-Ratten wurde zwei Wochen nach der AI-Induktion durchgeführt, wie bereits beschrieben [246]. Die Prozedur erfolgte analog zur initialen Organentnahme unter Anästhesie und Analgesie (s. Abschnitt 2.2.4) sowie unter intravenöser Antikoagulation mit Heparin (300 IE/kg Körpergewicht). Über eine mediale Laparotomie wurde initial die Aorta dargestellt. Anschließend wurde die Aorta infrarenal geklemmt und distal davon an zwei Stellen inzidiert. Im Bereich der Inzisionsstellen erfolgte dann die proximale und distale Anastomosierung des Implantates (Abb. 2). Die Dichtigkeit der Anastomose wurde jeweils durch eine kurze Reperfusion überprüft. Um einen ausschließlichen Blutfluss durch das Implantat herzustellen, wurde die native Aorta zwischen den beiden Anastomosen ligiert (Abb. 2). Postoperativ erfolgte eine

echokardiographische Kontrolle des Implantates, um die Funktionalität der Klappe sicher zu stellen. Nach der Intervention wurden die Tiere für 4 oder 12 Wochen beobachtet.



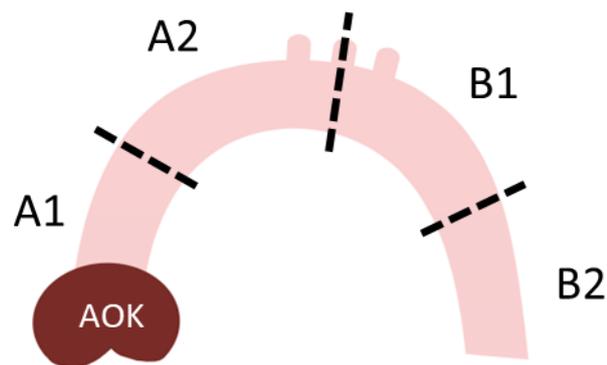
**Abb. 2: Implantation eines klappentragenden Aortenkonduits**

Infrarenale beidseitige Anastomosierung (\*) des AoCs einer Sprague-Dawley-Ratte an die abdominale Aorta einer Wistar-Ratte. AoAbd: abdominale Aorta, AoC: klappentragendes Aortenkonduit, Pfeilspitze: unterbundene AoAbd, Ren: rechte Niere.

**2.2.6 Explantation und Aufbereitung**

Die terminale Explantation des AoC erfolgte nach dem Beobachtungszeitraum von 4 oder 12 Wochen ebenfalls unter Anästhesie und Analgesie (s. Abschnitt 2.2.4). Intraoperativ wurde analog zur AI-Induktion 1 ml Blut entnommen, um laborchemische Untersuchungen vornehmen zu können (s. Abschnitt 2.2.4).

Vorbereitend auf die histologischen Färbungen wurde das Lumen des Explantates mit heparinisierte, phosphatgepufferte Salzlösung gespült und in vier Regionen gleicher Größe aufgeteilt (Abb. 3). Die Bezeichnung dieser Regionen erfolgte systematisch von proximal nach distal: beginnend mit der klappentragenden Region A1, gefolgt von A2 (Aorta ascendens), B1 (Aorta descendens) und B2 (Aorta descendens mit distaler Anastomose).



**Abb. 3: Aufteilung eines klappentragenden Aortenkonduits nach Explantation**

Explantataufteilung in vier Regionen. A1: Aorta *ascendens* mit Aortenklappe, A2: Aorta *ascendens* und Aortenbogen mit Gefäßabgängen, AOK: Aortenklappe, B1: Aorta *descendens*, B2: Aorta *descendens* mit distaler Anastomose.

Diese Explantatregionen wurden in Kunststoff-Formen positioniert und mit einem speziellen Kryo-Einbettmedium umschlossen. Daraufhin wurde Isopentan mit flüssigem Stickstoff herabgekühlt und die Explantatregionen über 30 Sekunden darin eingetaucht und damit schockgefroren. Anschließend wurden diese bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die Analyse mittels qPCR wurden die Explantate hingegen im Ganzen belassen und in kältebeständige Röhrchen überführt. Daraufhin wurden die geschlossenen Röhrchen über 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff eingetaucht und die Explantate damit schockgefroren. Auch diese Explantate wurden bis zur Weiterverarbeitung bei einer Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.7 Erhebung von Körpergewicht und Blutwerten

Das Körpergewicht der Tiere wurde zum Zeitpunkt der AI-Induktion, Implantation, wöchentlich bis zu Explantation und bei der Explantation gemessen.

Darüber hinaus wurde eine Reihe von Blutwerten erhoben, das Gesamtcholesterin, HDL, LDL, Triglyceride, Kalzium, Kreatinin und Harnsäure. Außerdem wurden Spontanwerte der Blutglukose gemessen. Die Erhebung der Glukose- und Blutplasmawerte erfolgte zum Zeitpunkt der AI-Induktion und Explantation. Die Blutglukosewerte wurden mit Teststreifen von *Accu-Chek* bestimmt. Die Messung der Plasmawerte erfolgte durch das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Deutschland).

### **2.2.8 Echokardiographische Untersuchungen**

Wie zuvor beschrieben, erfolgten echokardiographische Untersuchungen zum Zeitpunkt der AI-Induktion, Implantation und Explantation.

Nach der AI-Induktion und Implantation wurden diese durchgeführt, um den Insuffizienz-Schweregrad der nativen Aortenklappe zu erheben. Im Falle der Implantation wurde außerdem die Dichtigkeit der implantierten Klappe als Ausgangspunkt überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Blutflussgeschwindigkeit über den Zeitraum der Systole (Geschwindigkeits-Zeit-Integral I, kurz VTI-I) und Diastole (VTI-II) jeweils in der nativen Aorta *ascendens* und *descendens* gemessen. Anschließend wurde der Quotient dieser beiden Werte (VTI-II / VTI-I) berechnet, wobei Werte von 0,5 bis 0,7 einer AI-Grad II bzw. III entsprechen [244]. Tiere mit einem AI-Grad der nativen Aortenklappe von II-III wurden in den Versuch eingeschlossen.

Um die Dichtigkeit der implantierten Klappen zu überprüfen, wurde mithilfe des beschriebenen Quotienten der gegenläufige diastolische Fluss überprüft: Dessen intermittierendes Verschwinden distal der implantierten Klappe wurde als Beweis für einen vollständigen diastolischen Schluss der Klappe angesehen. Während dieser Verlaufsuntersuchungen (zum Zeitpunkt der Explantation nach 4 oder 12 Wochen) wurde das Auftreten eines gegenläufigen diastolischen Flusses distal der implantierten Klappe als Zeichen dafür interpretiert, dass die betreffende Klappe eine Insuffizienz entwickelt hatte. Um das Ausmaß der Klappeninsuffizienz zu bestimmen, wurde der Quotient aus dem VTI-I distal und proximal des implantierten AoC gebildet (VTI-I post-AoC / VTI-I prä-AoC).

### **2.3 Anfertigung und Auswahl der histologischen Präparate**

In Vorbereitung auf die (immun)histologischen Färbungen wurden die Explantatregionen bei -20 °C mit einem Gefriermikrotom geschnitten. Es wurde eine Schnittdicke von 5 µm und eine axiale Schnittführung gewählt. Schnitte aus der Klappenregion (Region A1) wurden möglichst unter Einbezug aller drei Klappentaschen angefertigt. Es wurden je zwei Explantatschnitte auf einen Objektträger aufgenommen, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

## **2.4 Klassische histologische Färbungen**

### **2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

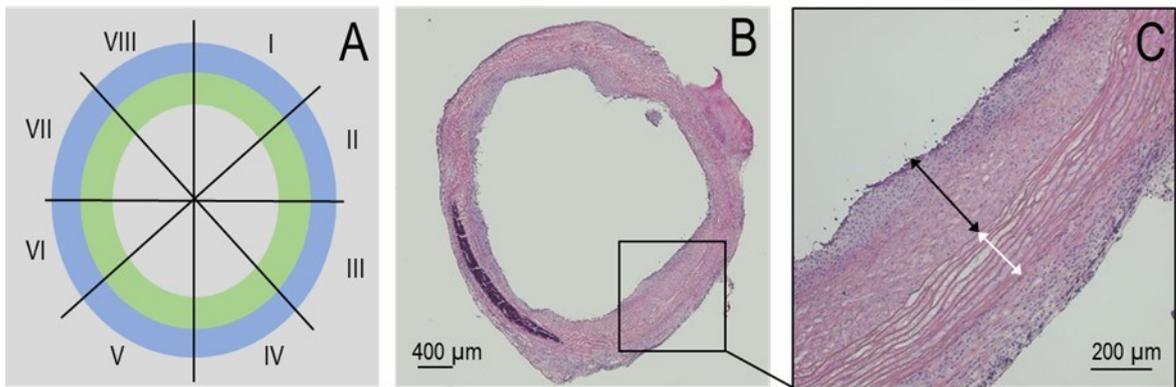
Die Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung ist eine Übersichtsfärbung nach Wissozky [247], die eine Kern- und Plasmafärbung kombiniert. Zellplasmaproteine und Kollagene werden durch Eosin rot angefärbt, die Desoxyribonukleinsäure (DNA) in den Zellkernen kommt durch Hämatin (Oxidationsprodukt des Hämatoxylin) blau zur Darstellung [248].

Es wurden je drei Schnitte aus jeder Region (A1 bis B2) aller Tiere gefärbt. Beginnend wurden die Schnitte für eine Minute mit Hämatoxylin gefärbt und daraufhin für jeweils eine Minute mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O), 5%iger Essigsäure und erneut dH<sub>2</sub>O gespült. Danach wurden diese für zwei Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und für eine Minute in 70%igem Ethanol (EtOH) gespült. Die Kernfärbung erfolgte über 15 Minuten mit einer gefilterten Eosin-B-Lösung. Schließlich wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (1 x 70%iges-, 2 x 96%iges-, 2 x 100%iges EtOH) für je eine Minute entwässert. Zuletzt wurden diese zweimal für eine Minute in Xylol getaucht, luftgetrocknet und mit dem Einschlussmittel *ROTI Histokitt II* bedeckt.

### **2.4.2 Intima-Media-Ratio**

Um die Intima-Hyperplasie der Explantate zu vergleichen, wurde die Intima-Media-Ratio (IMR) angewendet, angelehnt an das zuvor publizierte Vorgehen von Assmann et al. [245]. Die Analysen erfolgten an zusammengesetzten Bildern von HE-gefärbten Schnitten, in 100-facher Vergrößerung. Es wurden alle Tiere mit ihren Regionen A2 bis B2 in die Analysen aufgenommen. Analysiert wurden drei Schnitte je Region. Die Region A1 aus diesen Analysen ausgeschlossen, da sich in der Klappenregion statt der Intima- und Mediaschicht Klappentaschen finden, die am Klappenanulus befestigt sind.

Mithilfe der Software *Image J 1.52p* wurde je die Dicke von Intima und Media senkrecht zur Gefäßwand ausgemessen (Abb. 4C). Hierzu wurden die Gefäßschnitte in acht gleich große Messareale unterteilt (Abb. 4A) und der Quotient aus der Intima-Dicke und der Media-Dicke gebildet. Schließlich wurden die so ermittelten IMR-Werte zu Mittelwerten des Gesamtschnittes zusammengefasst. Unter Einbezug aller analysierten Schnitte wurden zuletzt IMR-Mittelwerte für die Tiere der Versuchsgruppe PIO und der Kontrollgruppe C im jeweiligen Beobachtungszeitraum von 4 oder 12 Wochen bestimmt.



**Abb. 4: Erhebung der Intima-Media-Ratio**

Schematische Aufteilung eines Gefäßschnittes (A, B) in acht Messareale (I-VIII) und die Messung der Intima-Dicke (schwarzer Doppelpfeil) und Media-Dicke (weißer Doppelpfeil) nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (C). Vergrößerung: 100-fach. Grün: Intima, blau: Media. µm: Mikrometer

### 2.4.3 Von-Kossa-Färbung

Die von-Kossa-Färbung wurde angewendet, um Kalzifizierungen in den Explantaten nachzuweisen. Diese Färbemethode nach von Kóssa [249] erlaubt den indirekten Nachweis von Kalziumionen durch die Darstellung von Kalziumkarbonaten und -phosphaten [248]. Verkalkte Areale stellen sich schwarz dar, Zellkerne rot [248].

Es wurden je drei Schnitte aus jeder Region (A1 bis B2) aller Tiere gefärbt und stets eine Positivkontrolle (stark verkalkter Gewebeschnitt) mitgeführt. Zunächst wurden die Schnitte für acht Minuten in Aceton getaucht, welches auf -20 °C temperiert war. Danach wurden diese über fünf Minuten luftgetrocknet und zwei Sekunden in dH<sub>2</sub>O getaucht. Es folgte eine Inkubation über 15 Minuten mit 5%iger Silbernitrat-Lösung. Gleichzeitig wurden die Explantatschnitte mit intensivem Licht (1500 Lumen) bestrahlt, um die Silberionen in metallisches Silber zu reduzieren. Daraufhin wurden die Explantatschnitte dreimal über drei Minuten mit frischem dH<sub>2</sub>O gespült. Die überschüssigen Silberionen wurden über zwei Minuten in Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung reduziert. Nach zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser erfolgte eine Fixierung für fünf Minuten in 5%iger Natriumthiosulfat-Lösung, gefolgt von weiteren 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Nach drei Minuten in dH<sub>2</sub>O folgten die kontrastierende Kernfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat über zehn Minuten und weitere drei Minuten in dH<sub>2</sub>O. Schließlich wurden die Schnitte über eine aufsteigende Ethanolreihe (je 2 min in 50%igem, 70%igem-, 90%igem-, 100%igem EtOH) und zweimal fünf Minuten in Xylol entwässert. Zuletzt wurden diese luftgetrocknet und mit dem Einschlussmittel *ROTI Histokitt II* bedeckt.

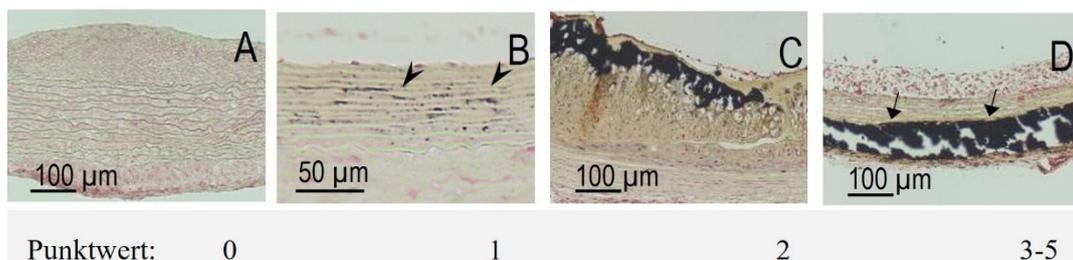
#### 2.4.4 Von-Kossa-Kalzifizierungsscore

Um den Grad der Kalzifizierung in den Explantaten beurteilen und vergleichen zu können, wurde angelehnt an Assmann et al. ein angepasster von-Kossa-Score angewendet [245]. Die Analysen erfolgten an zusammengesetzten Gesamtbildern von-Kossa-gefärbter Explantatschnitte, in 100-facher Vergrößerung. Es wurden alle Tiere mit ihren Regionen A1 bis B2 in die Analysen aufgenommen. Aus jeder Region wurden je drei Schnitte beurteilt. Vorbereitend wurden die Gefäßschnitte in vier gleich große Quadranten unterteilt nach einem festen Schema durchnummeriert (I-IV).

Je Quadrant, getrennt für Intima und Media, erfolgte die Zuteilung eines Punktwertes anhand des zuvor festgelegten Scores (Tabelle 8, Abb. 4). Aus den Punktwerten der vier Quadranten wurde eine Summe des Gesamtschnittes gebildet. Die Summenwerte der drei beurteilten Gesamtschnitte wurden jeweils in einen Mittelwert zusammengefasst.

**Tabelle 8: Von-Kossa-Score in Worten**

Punktwert	Beschreibung
0	kein sichtbarer Kalk
1	punktförmiger Mikrokalk
2	Flächige Kalzifizierung, braune Verfärbungen
3	Kalkscholle <50 % der Quadrantenfläche
4	Kalkscholle 50-75 % der Quadrantenfläche
5	Kalkscholle >75 % der Quadrantenfläche



**Abb. 5: vonKossa-Score in Bildern**

Lichtmikroskopische Aufnahmen von Explantatschnitten nach vonKossa-Färbung (A-D). Vergrößerung: 100-fach. Pfeilspitzen, punktförmiger Mikrokalk; schwarze Pfeile, Kalkscholle.

#### 2.4.5 Alizarinrot-S-Färbung

Die Alizarinrot-S-Färbung wurde ebenso wie die vonKossa-Färbung angewendet, um Kalzifizierungen in den Explantaten nachzuweisen. Diese Färbemethode nach Dahl dient jedoch dem direkten Nachweis von Kalziumablagerungen im Gewebe [250]. Der Farbstoff Alizarinrot-S lagert sich an Kalzium an und stellt sich orange-rot dar [248]. Es wurde ein Explantatschnitt aus jeder Region (A1 bis B2) aller Tiere gefärbt. Zunächst wurden die Explantatschnitte auf Raumtemperatur gebracht und über fünf Minuten in eine 2%ige Alizarin-Lösung (pH-Wert: 4,2) gegeben. Anschließend wurden diese entwässert, durch ein

20-maliges Eintauchen in Aceton und in ein 1:1 Aceton/Xylol-Gemisch. Zuletzt wurden die Explantatschnitte mehrmals in reinem Xylol gespült, luftgetrocknet und mit dem Einschlussmittel *ROTI Histokitt II* bedeckt.

#### **2.4.6 Movat-Pentachrom-Färbung**

Die Movat-Pentachrom-Färbung wurde von Henry Zoltan Movat erstbeschrieben und erlaubt die Darstellung aller Komponenten des Bindegewebes [251]. Glykosaminoglykane (u.a. vermehrt zu finden in mineralisiertem Knorpelgewebe) stellen sich blau-grün dar, Zellkerne blau-schwarz, Zytoplasma rot und kollagenes Bindegewebe gelb [248].

Es wurde ein Explantatschnitt aus jeder Region (A1 bis B2) aller Tiere gefärbt. Vorbereitend wurden die Explantatschnitte über zwölf Stunden auf eine Temperatur von 37 °C erhitzt. Nach fünf Minuten in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte über zehn Minuten in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert, gefolgt von weiteren fünf Minuten in dH<sub>2</sub>O. Daraufhin wurden diese über zehn Minuten in Bouin's-Lösung gegeben, die auf 50 °C erhitzt wurde. Nach zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser folgten eine fünfminütige Fixierung in 5%iger Natriumthiosulfat-Lösung und mehrere Spülschritte in dH<sub>2</sub>O (2 x 2 min, 1 x 1 min). Danach erfolgte über 20 Minuten die erste Färbung in 1%iger Alcianblau-Lösung und ein Spülschritt unter fließendem Leitungswasser für dreieinhalb Minuten. Es folgte eine zehnminütige Stabilisierung in alkalischer Alkohol-Lösung, die zuvor auf 60 °C erhitzt wurde. Danach wurden die Schnitte erneut für dreieinhalb Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült.

Vorbereitend auf den zweiten Färbeschritt wurde das Weigerts-Eisenhämatoxylin aus drei Stamm-Lösungen hergestellt: 60 ml 2%iger alkoholischer Hämatoxylin-Lösung, 40 ml Eisenchlorid-Lösung und 20 ml Jod-Lösung. Zur Herstellung der Jod-Lösung wurde Jod über 24 Stunden in Kaliumiodid und dH<sub>2</sub>O aufgelöst. Die Schnitte wurden für neun Minuten in dem frisch angesetzten Weigerts-Eisenhämatoxylin gefärbt und anschließend für eine Minute in fließendem Leitungswasser und mehrfach in dH<sub>2</sub>O (2 x 2 min und 1 x 1 min) gespült. Daraufhin folgte der dritte Färbeschritt für eine Minute in Brilliant-Crocein-Säurefuchsin, bestehend aus zwei Stamm-Lösungen, nämlich 80 ml Brilliant Crocein R und 20 ml Säurefuchsin. Diese wurden vor der Färbung frisch angesetzt. Das Säurefuchsin wurde vor der Verwendung filtriert und über 24 Stunden stehen gelassen.

Es folgte eine fünfminütige Differenzierung in 5%iger Phosphorwolframsäure, eine fünfminütige Spülung in 1%iger Essigsäure und mehrfache Spülungen in dH<sub>2</sub>O (2 x 2 min

und 1 x 1 min). Dann wurden die Explantatschnitte mit EtOH entwässert (1 min in 96%igem EtOH, 2 x 1 min in 100%igem EtOH). Der vierte Färbeschritt erfolgte über acht Minuten in alkoholischen Safran, welches zuvor über 48 Stunden bei 60 °C erhitzt und anschließend filtriert wurde. Schließlich wurden die Explantatschnitte mit 100%igem EtOH (2 x 1 min) und Xylol (3 x 5 min) entwässert. Zuletzt wurden diese luftgetrocknet und mit dem Einschlussmittel *ROTI Histokitt II* bedeckt.

#### **2.4.7 Auswertungsprozess**

Als Grundlage für die späteren Auswertungen wurden die gefärbten Explantatschnitte mit einem Durchlichtmikroskop beurteilt und mit einer darauf montierten Kamera fotografisch dokumentiert. Dies erfolgte unter Zuhilfenahme der Software *Leica Application Suite 3.8*. Die Bilder wurden unter einheitlichen Belichtungseinstellungen in 100-facher Vergrößerung angefertigt. Hierbei wurde der gesamte Schnitt in mehreren Einzelbildern erfasst. Anschließend wurden die Einzelbilder mit der Funktion *Grid/Collection Stitching* [252] in der Software *Image J 1.52p* zu einem Bild des gesamten Schnittes zusammengesetzt.

Je nach Auswertungsmethode erfolgte dann entweder eine Streckenmessung mit der Software *Image J 1.52p* oder eine verblindete Beurteilung anhand zuvor festgelegter Scores (s. jeweilige Kapitel).

## **2.5 Immunhistologische Färbungen**

### **2.5.1 Färbeprozess**

In den angewendeten immunhistologischen Färbemethoden wurden verschiedene Zielantigene mithilfe von Primär- und Sekundärantikörpern dargestellt. Der Primärantikörper bindet im Gewebe jeweils das Antigen, das nachgewiesen werden soll. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper bindet hingegen den Primärantikörper und stellt damit indirekt das Antigen dar.

Auf diese Weise wurden folgende Antigene nachgewiesen: Syndecan-3 (Syn3), von-Willebrand-Faktor (vWF),  $\alpha$ -Glattmuskel-Aktin ( $\alpha$ SMA) und *cluster of differentiation 3* bzw. 68 (CD3, CD68). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung der Zellkerne mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Als Negativkontrolle diente ein zweiter Schnitt auf jedem Objektträger, der unter Aussparung des Primärantikörpers ebenso behandelt wurde wie der zu analysierende Gewebeschnitt. Dies erlaubte den Ausschluss unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers an das

Gewebe. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Gewebeschnitt mitgeführt, der nachweislich ein positives Signal erzeugt und somit als Erfolgskontrolle der Färbeschritte diente. Zur besseren Übersicht der durchgeführten immunhistochemischen Färbemethoden dient Tabelle 9.

**Tabelle 9: Übersicht immunhistologischer Färbemethoden und Antikörper**

<b>Färbung</b>	<b>Primär-AK (Verdünnung)</b>	<b>Sekundär-AK (Farbe, Verdünnung)</b>	<b>Positiv- kontrolle</b>	<b>Auswertung</b>
<b>vWF &amp; αSMA</b>	vWF (1:300) αSMA (1:300)	Alexa 488 (grün, 1:200) Alexa 546 (rot, 1:200)	Myokard	Score
<b>CD3 &amp; CD68</b>	CD3 (1:300) CD68 (1:200)	Alexa 488 (grün, 1:200) Alexa 546 (rot, 1:200)	Milz	Anteil CD3- & CD68- positiver Zellen
<b>Syn3</b>	Syn3 (1:100)	Alexa 488 (grün, 1:200)	Milz	Score

AK: Antikörper, CD: cluster of differentiation, Syn3: Syndecan-3, vWF: von-Willebrand-Faktor, αSMA: α-Glattmuskel-Aktin

Zunächst wurden die Explantatschnitte vorbereitend mit einem Fettstift umrandet, um die aufgetragenen Flüssigkeiten am Auslaufen zu hindern. Danach wurden Explantatschnitte für zehn Minuten mit einer 4%igen Formaldehyd-Lösung inkubiert und für dreimal eine Minute mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend erfolgten für 10 Minuten eine Membranpermeabilisierung mit 0,25%iger Triton X-Lösung. Danach wurden die Schnitte erneut für dreimal eine Minute mit PBS gewaschen.

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, wurden die Explantatschnitte anschließend mit einer Albumin-Fraktion-V-Lösung inkubiert: Im Falle der Syn3-Einzelfärbung wurden die Schnitte für 45 Minuten mit je 40 µl einer 1%igen Albumin-Fraktion-V-Lösung inkubiert. Die Schnitte der Doppelfärbungen wurden hingegen für 60 Minuten mit derselben Menge einer 5%igen Albumin-Fraktion-V-Lösung inkubiert. In einem nächsten Schritt wurde die Schnitte für dreimal eine Minute mit 0,1%iger Tween20-Lösung behandelt. Daraufhin wurden diese in eine Feuchtkammer überführt. Die Hauptschnitte wurden darin für 60 Minuten bei 37 °C mit dem Primärantikörper inkubiert (Verdünnungen der Primärantikörper: s. Tabelle 10), wohingegen die Negativkontrollen lediglich mit einer 1%igen Albumin-Fraktion-V-Lösung bedeckt wurden.

Daraufhin folgte eine erneute Behandlung mit 0,1%iger Tween-Lösung, diesmal für dreimal fünf Minuten. Nach erneutem Waschen in PBS für zweimal eine Minute, wurden die Explantatschnitte erneut in die Feuchtkammer überführt. Darin wurden sie mit dem

Sekundärantikörper für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde dafür 1:200 in 1%iger Albumin-Fraktion-V-Lösung verdünnt. Für die gewählten Kombinationen von Primär- und Sekundärantikörpern siehe Tabelle 10. Im direkten Anschluss erfolgte die Kern-Gegenfärbung mit 1:1000-verdünntem DAPI in PBS für 5 Minuten. Schließlich wurden die Schnitte für dreimal fünf Minuten mit PBS und eine Minute mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, kurz in 100%iges EtOH getaucht und im Dunkeln luftgetrocknet. Zuletzt wurden diese mit dem Einschlussmittel *Leica CV Ultra* bedeckt und bis zur Betrachtung am Folgetag lichtgeschützt gelagert.

### **2.5.2 Auswertungsprozess**

Um die immunhistologisch gefärbten Schnitte auszuwerten, wurden diese in einem abgedunkelten Raum betrachtet und fotografisch dokumentiert. Mithilfe einer speziellen Fluoreszenzlampe wurden die Fluoreszenzfarbstoffe zum Leuchten angeregt, bei einheitlich gewählter Lichtintensität. Für die Fotodokumentation wurde die Software *Leica Application Suite 3.8* verwendet. Darin wurde für jeden ausgewählten Filter die Belichtungszeit separat ausgewählt. Je Explantatschnitt wurden mehrere Bilder angefertigt und durch die Software automatisch in ein Überlagerungsbild zusammengeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Bilder in 200-facher Vergrößerung angefertigt.

### **2.5.3 vWF- & αSMA-Score**

Die Doppelfärbung von vWF und αSMA wurde durchgeführt, um Endothelzellen und Glattmuskelzellen in den Explantaten nachzuweisen und somit genauere Aussagen über die zelluläre Zusammensetzung in der Intima treffen zu können. Es wurde ein Schnitt aus jeder Region (A1 bis B2) aller Tiere gefärbt und als Positivkontrolle stets ein Schnitt aus Myokardgewebe mitgeführt.

Die Auswertung der Doppelfärbung von vWF und αSMA erfolgte anhand der registrierten Fluoreszenzintensität und -verteilung in der Intima. Dies erfolgte für die zwei dargestellten Antigene getrennt. Hierzu wurden schrittweise alle Quadranten beurteilt und je ein Punktwert für den gesamten Schnitt zugeteilt (Tabelle 10). Die Punktwerte wurden in der Software *Excel 2011* gesammelt und der Median je Tier berechnet. Anhand dieses Scores wurde ein orientierender Vergleich zwischen der Versuchsgruppe PIO und der Kontrollgruppe C vorgenommen.

**Tabelle 10: vWF- & αSMA-Score**

<b>Punktzahl</b>	<b>Bedeutung (je für vWF und <math>\alpha</math>SMA)</b>
<b>0</b>	Kein Signal
<b>1</b>	schwaches und geringfügig verteiltes Signal
<b>2</b>	mäßiges Signal
<b>3</b>	starkes und großflächig verteiltes Signal

#### **2.5.4 Quantitative Analyse der CD3- & CD68-Färbung**

Um die Gewebeeinfiltration mit Entzündungszellen nachzuweisen, wurden der T-Lymphozyten-Marker CD3 und der Makrophagen-Marker CD68 immunhistologisch angefärbt. Es wurde ein Schnitt aus jeder Region (A1 bis B2) aller Tiere gefärbt und als Positivkontrolle stets ein Schnitt aus Milzgewebe mitgeführt.

Die Auswertung erfolgte durch eine Auszählung der Zellen mit CD3- und CD68-positivem Fluoreszenzsignal in den Bildern der Explantatschnitte. Hierzu wurden repräsentative Bilder für jeden Quadranten eines Schnittes ausgewählt und mithilfe der Software *Image J 1.52p* analysiert. Hierzu wurden diese zunächst in ein Graustufen-Bild umgewandelt. Mithilfe der Software-internen Partikelanalyse wurde daraufhin die Anzahl der Zellen mit positivem DAPI-Signal ermittelt. In einem zweiten Schritt erfolgte je eine doppelte manuelle Auszählung der Zellen mit CD3- und CD68-positivem Signal und eine Berechnung des jeweiligen Mittelwertes mit der Software *Excel 2011*. Bei dieser Auszählung wurden nur solche Zellen berücksichtigt, die bei CD3- oder CD68-positivem Signal gleichzeitig ein DAPI-Signal aufwiesen. Schließlich wurde die Zellzahl aller vier Quadranten zu einer repräsentativen Gesamtanzahl des Schnittes aufsummiert. In einem letzten Schritt wurde der Anteil der CD3- und CD68-positiven Zellen an der Gesamtzahl aller DAPI-positiven Zellen berechnet.

#### **2.5.5 Syndecan-3**

Die Einzelfärbung von Syndecan-3 wurde durchgeführt, um eine frühe chondrogene Transformation in den Explantaten nachzuweisen. Es handelt sich um einen Transmembranrezeptor, der bevorzugt in proliferierenden Chondrozyten exprimiert wird und Interaktionen zwischen Zelloberfläche, extrazellulärer Matrix und löslichen Liganden ermöglicht [253, 254]. Die Bilder der Syndecan-3-gefärbten Schnitte wurden in 400-facher Vergrößerung angefertigt. Die Auswertung erfolgte hier anhand eines Scores (Tabelle 11) und erlaubte Aussagen über Tendenzen der Knorpelbildung im Gruppenvergleich.

**Tabelle 11: Syndecan-3-Score**

<b>Punktwert</b>	<b>Beschreibung</b>
0	Kein Signal
1	schwaches und geringfügig verteiltes Signal
2	mäßiges Signal
3	starkes und großflächig verteiltes Signal

## **2.6 Molekularbiologische Techniken**

### **2.6.1 RNA-Isolation und -Quantifizierung**

Um die Expression verschiedener inflammations-assoziiertes und osteoblastischer Gene im Explantatgewebe zu messen, wurden insgesamt 24 Explantate mittels qPCR ausgewertet. In Vorbereitung auf diese molekularbiologische Technik musste zunächst Ribonukleinsäure (RNA) aus den Explantaten isoliert, aufgereinigt, quantifiziert und in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Um die RNA aus den Explantaten zu isolieren, wurden die gefrorenen Explantate zunächst in ein Gefäß mit TRIzol überführt und bei Raumtemperatur über 30 Sekunden maschinell zerkleinert. Während der gesamten Prozedur wurde die RNA auf Eis gelagert. Nachdem das entstandene Homogenisat über fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde, erfolgte eine Phasentrennung mit Chloroform, welches im Verhältnis 1:5 zugesetzt wurde. Danach wurde das Gemisch geschüttelt, drei Minuten stehen gelassen und anschließend für 25 Minuten bei 14.000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurde die RNA-haltige wässrige Phase extrahiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Die so gewonnene RNA wurde mithilfe des *Qiagen RNeasy Mini Kit* gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine fotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem Absorptionsmessgerät *BioPhotometer plus*. Diese wurde für jede Probe zweimalig ermittelt und daraus mithilfe der Software *Excel 2011* ein Mittelwert gebildet. Um Verunreinigungen auszuschließen, wurde der A260/A280-Absorptionsquotient betrachtet, der als Maß für die RNA-Reinheit gilt [255]. Es wurden nur Proben mit einem Wert von >1,8 weiterverwendet. Auf Grundlage dieser Quantifizierung konnte für die folgenden Schritte außerdem eine übereinstimmende RNA-Menge zwischen den Proben gewährleistet werden.

## 2.6.2 cDNA-Synthese

Vorbereitend auf die qPCR wurde die aufgereinigte RNA mithilfe des *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* gemäß Herstelleranweisungen in cDNA umgeschrieben. Im *Thermocycler T3000* durchliefen die Probenansätze die notwendigen Inkubationsschritte: zunächst zwei Minuten bei 4 °C, dann 30 Minuten bei 42 °C und drei Minuten bei 95 °C. Die fertigen Proben wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C aufbewahrt.

## 2.6.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Mithilfe der qPCR wurde cDNA unter Verwendung genspezifischer Primer amplifiziert und der Expressionsstatus ausgewählter Gene in den Explantaten ermittelt. Zunächst wurde die cDNA in *96-Well* Mikrotiterplatten mit einem Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie dem *GoTaq qPCR Master Mix* von *Promega* nach Herstellerangaben versetzt. Die Primer-Sequenzen sind Tabelle 12 aufgeführt. Die Genquantifizierung wurde in dem Echtzeit-PCR-System *StepOnePlus* mit *SYBR Green PCR Master Mix* durchgeführt. Je qPCR-Durchlauf wurde die cDNA aller 24 Tiere auf ein Zielgen untersucht. Die cDNA wurde stets in Dupletts analysiert und die akzeptierte Abweichung ihrer Zyklus-Schwellenwerte ( $C_t$ ) auf einen Wert < 1 festgelegt. Als Positivkontrolle für die Funktionstüchtigkeit der qPCR-Komponenten und des Echtzeit-PCR-Systems diente die Analyse des konstitutiv exprimierten Haushaltgens RPL13A, welches für das Ribosomale Protein L13A codiert. Als Negativkontrolle wurde stets eine Probe ohne cDNA mitgeführt.

Tabelle 12: qPCR Primersequenzen

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<b>BMP2</b>	5'-GCTCAGCTTCCATCACGAA-3'	5'-AAGAAGCGTCGGGAAGTTTT-3'
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	5'-AGGACCCAAGCACCTTCTTT-3'	5'-CATCATCCCACGAGTCACAG-3'
<b>IL-6</b>	5'-ACCACCCACAACAGACCAGT-3'	5'-AGTGCATCATCGCTGTTCAT-3'
<b>OCN</b>	5'-AAGCAGGAGGGCAGTAAGGT-3'	5'-GTCCGCTAGCTCGTCACAAT-3'
<b>OPN</b>	5'-AAGCCTGACCCATCTCAGAA-3'	5'-ATGGCTTTCATTGGAGTTGC-3'
<b>RAGE</b>	5'-TGAACTCACAGCCAATGTCC-3'	5'-TCAGAGGTTTCCCATCCAAG-3'
<b>RPL13A</b>	5'-GAAAGGTGGTGGTTGTACGC-3'	5'-GAGACGGGTTGGTGTTCATC-3'
<b>RUNX2</b>	5'-GATGACACTGCCACCTCTGA-3'	5'-GATGAAATGCCTGGGAACTG-3'
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	5'-GCTCCCTCTCATCAGTTCCA-3'	5'-GCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'

BMP2: Knochenmorphogenetisches Protein 2, IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ , IL-6: Interleukin-6, OCN: Osteocalcin, OPN: Osteopontin, RAGE: Rezeptor für fortgeschrittene Glykationsendprodukte, RPL13A: Ribosomales Protein L13A, qPCR: Quantitative Echtzeit-PCR, RUNX2: Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2, TNF $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .

Untersucht wurden die Gene Knochenmorphogenetisches Protein 2 (BMP2), Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN), Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und das Gen des Rezeptors für fortgeschrittene Glykationsendprodukte (RAGE).

Um eine relative Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse vorzunehmen, wurde die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet [256]. Grundlage der Berechnungen waren die vom qPCR-System ausgegebenen Zyklus-Schwellenwerte ( $C_t$ -Werte), die als relatives Maß der Zielgenkonzentration dienen. Die  $C_t$ -Werte der Versuchsgruppe PIO wurden gegen die  $C_t$ -Werte des Haushaltsgens RPL13A normalisiert.

## **2.7 Statistik**

Die Berechnung und grafische Darstellung der Studiendaten erfolgten mit der Software *Prism 6.01*. Die Signifikanzen zwischen den Versuchsgruppen wurden mit dem *Mann-Whitney-U-Test* ermittelt. Eine statistische Signifikanz wurde bei p-Werten von  $< 0,05$  angenommen. Wenn nicht anders angegeben, wurden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) bestimmt.

## **2.8 Eigenanteil der durchgeführten Methodik und Etablierungsarbeit**

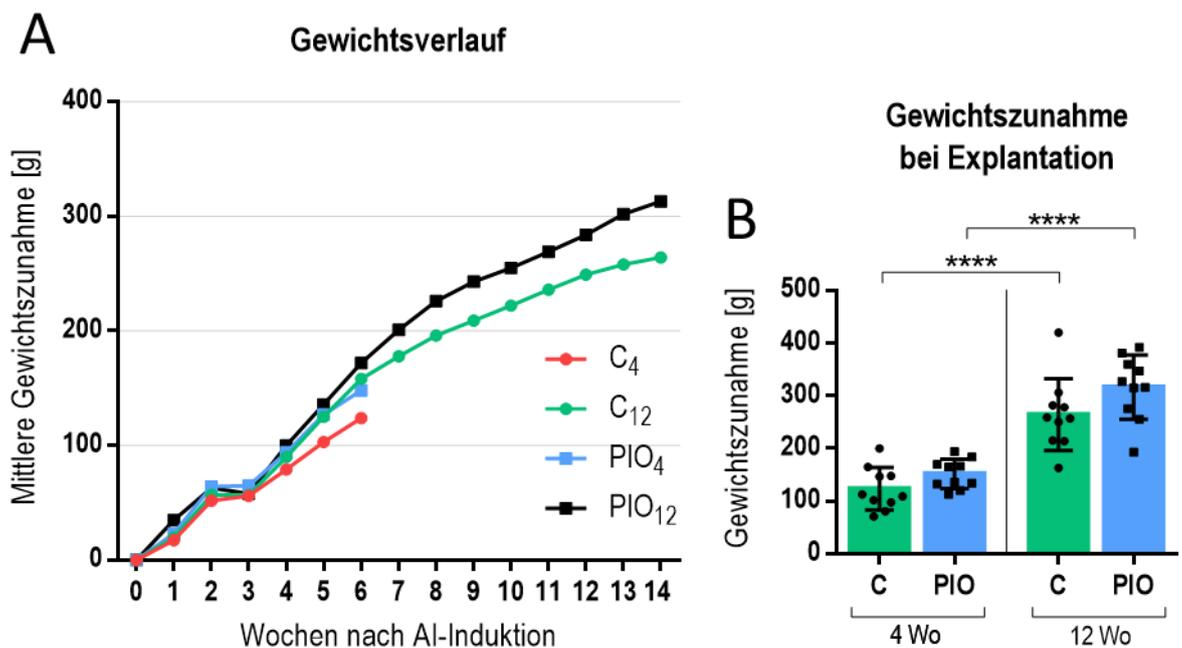
Alle Interventionen und Operationen an den Versuchstieren wurden durch Frau Dr. Anna Kathrin Assmann durchgeführt. Aufzuführen sind hier sowohl die Gewinnung der Implantate als auch die AI-Induktion sowie die Implantation und Explantation der AoCs.

Zur Eigenleistung der Dissertationsarbeit zählte die Einbettung und Kryokonservierung der Explantate, die Anfertigung histologischer Schnittpräparate mit dem Gefriermikroton, die Durchführung der klassisch-histologischen und immunhistologischen Färbungen sowie die Fotodokumentation gefärbter Präparate. Ebenso wurden verschiedene Auswertungsmethoden in unserer Forschungsgruppe etabliert: hierzu gehören die Intima-Media-Ratio, der vonKossa-Score, vWF- und  $\alpha$ SMA-Score, Syndecan-3-Score sowie die quantitative Analyse der CD3- und CD68-Doppelfärbung. Die statistischen Berechnungen und die grafische Darstellung mit der Software *GraphPad Prism 6.01* zählten ebenfalls zur Eigenleistung. Die laborchemischen Analysen erfolgten durch das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Deutschland). Weitere eigens ausgeführte Laborarbeiten sind die RNA-Isolation, RNA-Aufreinigung, RNA-Quantifizierung, cDNA-Synthese und qPCR.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Adipositas und Hypercholesterinämie im Rattenmodell

Bei allen Tieren zeigte sich eine kontinuierliche Gewichtszunahme im Beobachtungszeitraum mit einer leichten Stagnation bei Induktion der nativen AI (Abb. 6A). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Pioglitazon-Zufütterung auf die Gewichtszunahme (Abb. 6B).

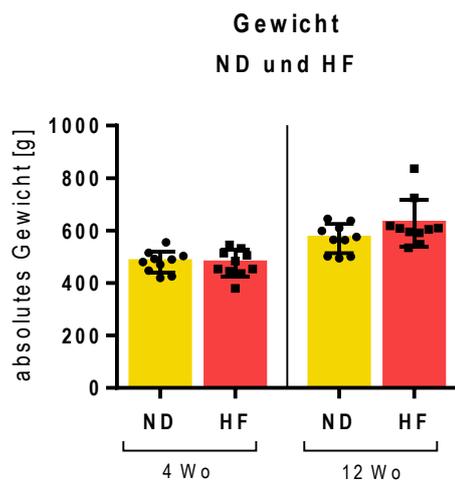


**Abb. 6: Gewichtszunahme im Beobachtungszeitraum**

Kontinuierliche Gewichtszunahme aller Versuchsgruppen im gesamten Beobachtungszeitraum (A). Die relative Gewichtszunahme der Gruppe PIO und C war nach 4 und 12 Wochen (B) vergleichbar. Dargestellt sind Gruppenmittelwerte  $\pm$  SD der Gewichtszunahme ab Zeitpunkt 0 ( $n=10$  Tiere pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. Signifikanzniveau: \*\*\*\* $p < 0,0001$ . AI: Aortenklappeninsuffizienz, C: Fettreiches Futter, g: Gramm, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, Wo: Wochen.

Das Körpergewicht der Versuchstiere, die ein fettreiches Futter erhielten (Gruppe HF, von engl. *high-fat*), wurden darüber hinaus mit den Werten eines Rattenkollektivs verglichen, das bei gleichem Versuchsaufbau eine Normaldiät (Gruppe ND) erhielt. Die Daten der Normaldiät-Gruppe stammen aus einer bereits publizierten Studie [257] und wurden nicht erneut erhoben, um die Tierzahl im Sinne des Tierschutzes zu minimieren.

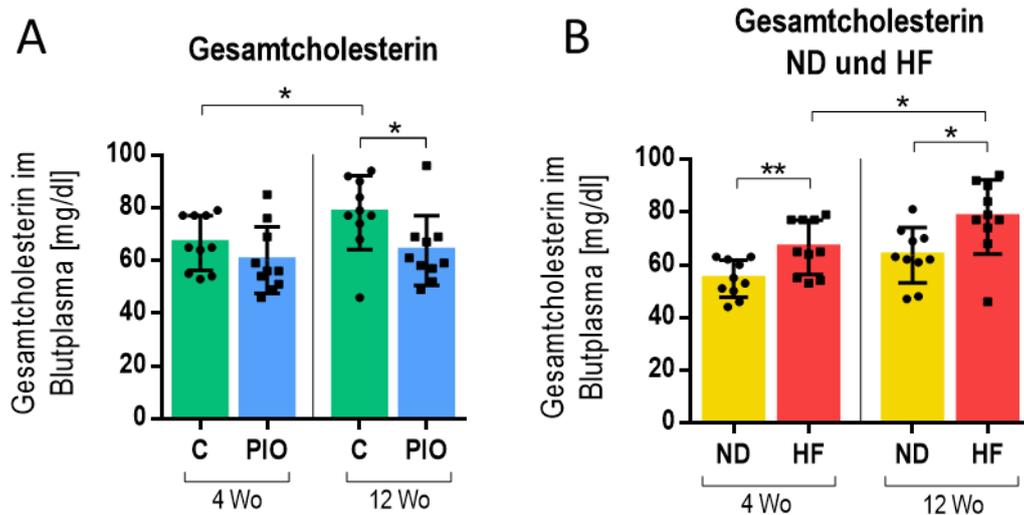
Das Körpergewicht der HF-Tiere war nach 4 und 12 Wochen vergleichbar mit dem der ND-Tiere (Abb. 7).



**Abb. 7: Gewicht im Gruppenvergleich**

Nach 4 und 12 Wochen war das Körpergewicht der HF-Tiere vergleichbar mit dem der ND-Tiere. Messwerte bei Explantation nach 4 bzw. 12 Wochen sind als Mittelwerte  $\pm$  *SD* dargestellt ( $n = 10$  Tiere pro Gruppe). Daten der ND-Gruppe stammen aus einer bereits publizierten Studie [257]. Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. g: Gramm, HF: Fettreiches Futter, ND: Futter mit normalem Fettgehalt, Wo: Wochen.

Das Gesamtcholesterin war nach 12 Wochen durch die Pioglitazon-Zufütterung signifikant reduziert (Abb. 8A). Im Vergleich mit dem Normaldiät-Rattenkollektiv wurden bei den Versuchstieren unserer Studie nach 4 und 12 Wochen signifikant höhere Plasmaspiegel für das Gesamtcholesterin gemessen (Abb. 8B). Die Blutwerte stammen ebenfalls aus der bereits publizierten Studie [257].



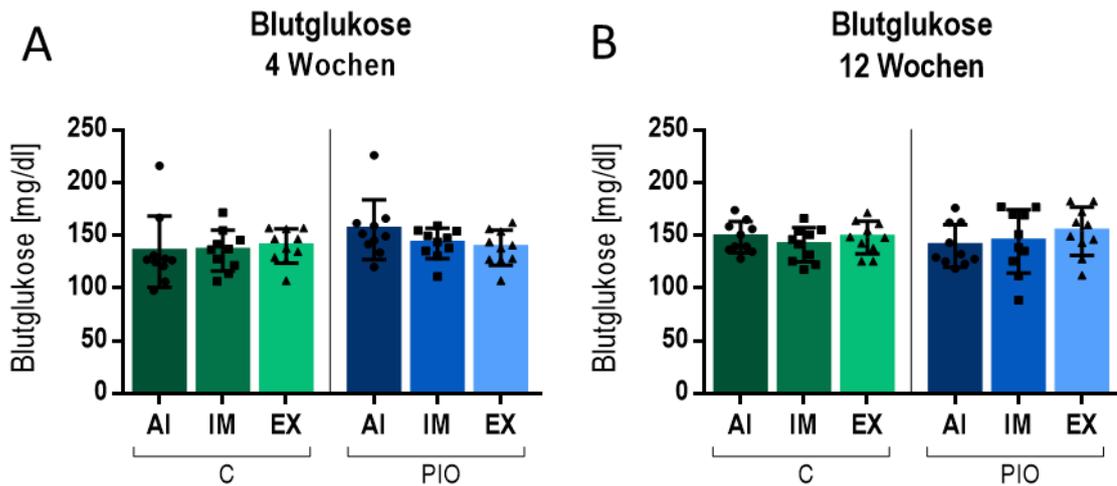
**Abb. 8: Gesamtcholesterin im Gruppenvergleich**

In Gruppe PIO war das Gesamtcholesterin im Vergleich zur Kontrollgruppe C nach 12 Wochen signifikant erniedrigt (A). Nach 4 und 12 Wochen war das Gesamtcholesterin in Gruppe HF signifikant höher als in Gruppe ND (B). Blutplasma-Analysen erfolgten bei Explantation nach 4 bzw. 12 Wochen. Ergebnisse repräsentieren die Gruppenmittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 10$  Tiere pro Gruppe). Daten der ND-Gruppe stammen aus einer bereits publizierten Studie [257]. Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. Signifikanzniveaus:  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ . C  $\triangleq$  HF: Fettreiches Futter, mg/dl: Milligramm pro Deziliter, ND: Futter mit normalem Fettgehalt, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, Wo: Wochen.

### 3.2 Blutglukose und ergänzende Blutplasma-Analysen

Ergänzend zu den zuvor beschriebenen Parametern wurden Spontanwerte der Blutglukose sowie weitere Lipidparameter, zirkulierende Elektrolyte und Nierenfunktionsparameter im Blutplasma der Versuchstiere bestimmt.

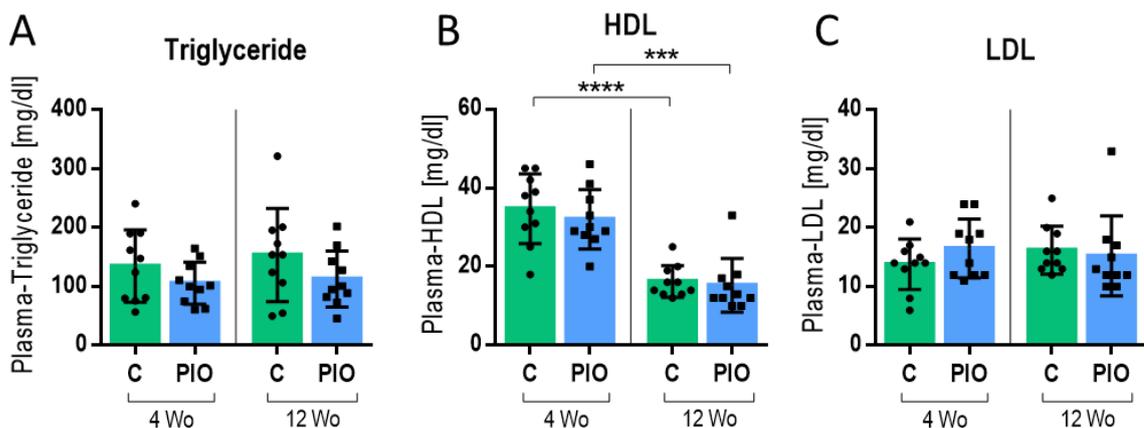
Die Blutglukosewerte wurden dreizeitig bei AI-Induktion, Implantation und Explantation gemessen und im zeitlichen Verlauf verglichen (vgl. Tabelle 7). In keiner der Versuchsgruppen zeigte sich eine signifikante Veränderung der Blutglukose zwischen den drei Messpunkten (Abb. 9). Es wurde kein signifikanter Einfluss der Pioglitazon-Zufütterung auf die Blutglukose festgestellt (Abb. 9).



**Abb. 9: Blutglukose im Gruppenvergleich**

Keine signifikante Veränderung der Blutglukose im zeitlichen Verlauf beider Beobachtungszeiträume (A, B). Die Blutglukose in Gruppe PIO und C war zu allen drei Messzeitpunkten vergleichbar, inkl. der Explantation nach 4 (A) und 12 Wochen (B). Ergebnisse repräsentieren Gruppenmittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 10$  Tiere pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. AI: Aortenklappeninsuffizienz-Induktion, C: Fettreiches Futter, EX: Explantation, IM: Implantation, mg/dl: Milligramm pro Deziliter, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon

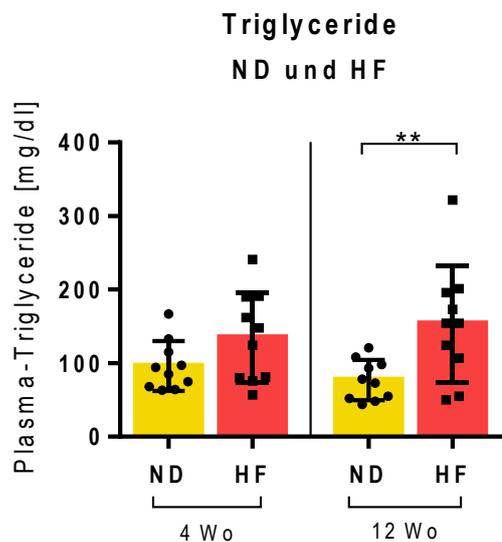
Es zeigte sich kein signifikanter Effekt durch Pioglitazon auf die Triglyceride, das LDL- oder HDL-Cholesterin im Blutplasma, sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen (Abb. 10). Der Blutplasmaspiegel des HDLs war in Gruppe C und PIO nach 12 Wochen signifikant niedriger als nach 4 Wochen (Abb 10B).



**Abb. 10: Blutfettwerte im Gruppenvergleich**

Die Blutplasmaspiegel der Triglyceride (A) sowie des HDLs (B) und LDLs (C) waren zwischen Gruppe PIO und C in beiden Beobachtungszeiträumen vergleichbar. Der Blutplasmaspiegel des HDLs war in Gruppe C und PIO nach 12 Wochen signifikant niedriger als nach 4 Wochen (B). Blutplasma-Analysen erfolgten bei Explantation nach 4 bzw. 12 Wochen. Ergebnisse repräsentieren Gruppenmittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 10$  pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. Signifikanzniveaus: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . C: Fettreiches Futter, HDL: Lipoprotein hoher Dichte, LDL: Lipoprotein niedriger Dichte, mg/dl: Milligramm pro Deziliter, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon.

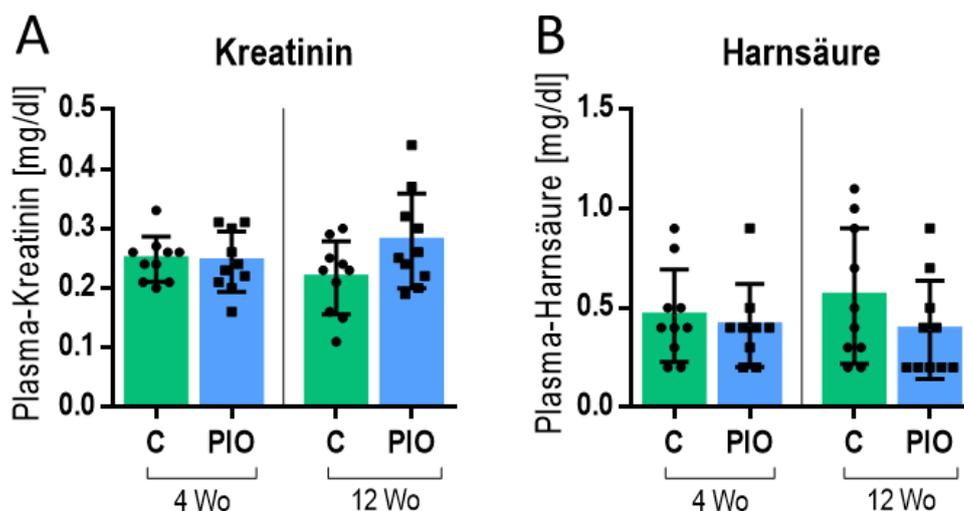
Der Triglycerid-Spiegel der Tiere, die mit hochkalorischem Futter gefüttert wurden, waren im Vergleich zum Normaldiät-Rattenkollektiv (ND) aus der bereits publizierten Studie [257] nach 12 Wochen signifikant erhöht (Abb. 11).



**Abb. 11: Triglyceride im Vergleich mit Normalkost-Tierkollektiv**

Signifikant erhöhte Triglyceride in HF-Gruppe nach 12 Wochen im Vergleich zur ND-Gruppe. Blutplasma-Analysen erfolgten bei Explantation nach 4 bzw. 12 Wochen. Ergebnisse repräsentieren die Gruppenmittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 10$  pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. Signifikanzniveau:  $**p < 0,01$ . HF: Fettreiches Futter, mg/dl: Milligramm pro Deziliter, ND: Futter mit normalem Fettgehalt, Wo: Wochen.

Es zeigten sich nach 4 und 12 Wochen keine Unterschiede des Kreatinin- oder des Harnsäure-Spiegels zwischen Gruppe PIO und C (Abb. 12).

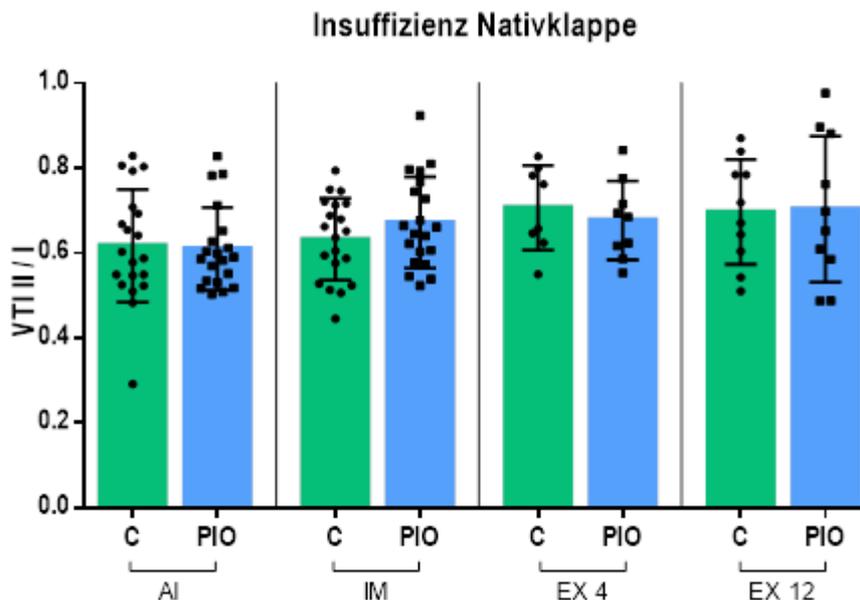


**Abb. 12: Plasmakreatinin und -harnsäure im Gruppenvergleich**

Kreatinin- (A) und Harnsäure-Werte (B) der Gruppe PIO und C waren in beiden Beobachtungszeiträumen vergleichbar. Blutplasma-Analysen erfolgten bei Explantation nach 4 bzw. 12 Wochen. Ergebnisse repräsentieren die Gruppenmittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 10$  Tiere pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. C: Fettreiches Futter, mg/dl: Milligramm pro Deziliter, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, Wo: Wochen.

### 3.3 Ergebnisse der Echokardiographie

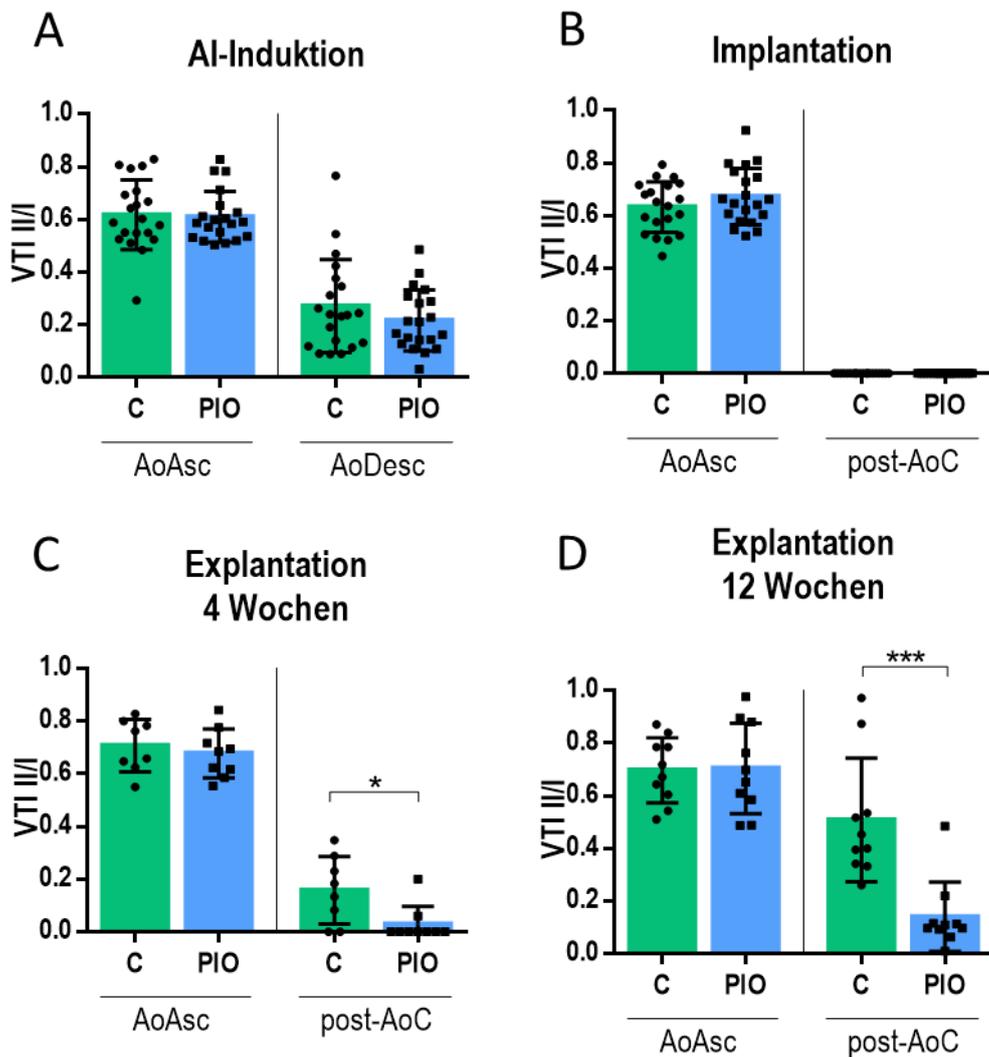
Der Insuffizienz-Schweregrad der nativen Aortenklappe war zwischen Gruppe PIO und C zu jedem Zeitpunkt vergleichbar. Bei der Induktion der AI, der Implantation und der Explantation war der Insuffizienzgrad der nativen Aortenklappe ebenfalls vergleichbar (Abb. 13).



**Abb. 13: Echokardiographische Ergebnisse Nativklappe**

Zwischen Gruppe PIO und C zeigt sich ein vergleichbarer Insuffizienzgrad der nativen Aortenklappe. Konstanter Insuffizienzgrad im zeitlichen Verlauf zwischen AI-Induktion und Explantation. Die Ergebnisse repräsentieren Quotienten-Mittelwerte ( $VTI-II/VTI-I \pm SD$ ) ( $n = 20$  pro Gruppe bei AI und IM,  $n = 10$  bei EX4 und 12). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. AI: Aortenklappeninsuffizienz-Induktion, C: Fettreiches Futter, EX: Explantation nach 4 bzw. 12 Wochen, IM: Implantation, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, VTI-I: systolisches Geschwindigkeits-Zeit-Integral [cm], VTI-II: diastolisches Geschwindigkeits-Zeit-Integral [cm].

In der PIO-Gruppe und der Kontrollgruppe wurden kurz nach AI-Induktion vergleichbare Insuffizienzgrade der Nativklappen sowie des gegenläufigen Blutflusses in der Aorta *descendens* gemessen (Abb. 14A). Kurz nach der AoC-Implantation wurden in beiden Gruppen ebenfalls vergleichbare Insuffizienzgrade der Nativklappen gemessen (Abb. 13B, AoAsc) und es war keine Insuffizienz der Klappenimplantate messbar (Abb. 14B, post-AoC). In der PIO-Gruppe zeigte sich sowohl nach 4 Wochen als auch nach 12 Wochen eine intakte Klappe des AoC (Abb. 14C und D, post-AoC), während sich in der Kontrollgruppe bereits nach 4 Wochen eine signifikante Insuffizienz zeigte (Abb. 14C, post-AoC), die nach 12 Wochen noch deutlicher ausgeprägt war (Abb. 14D). Die Insuffizienzgrade der Nativklappe waren nach 4 und 12 Wochen in der PIO-Gruppe und der Kontrollgruppe vergleichbar (Abb. 14 C und D, AoAsc)

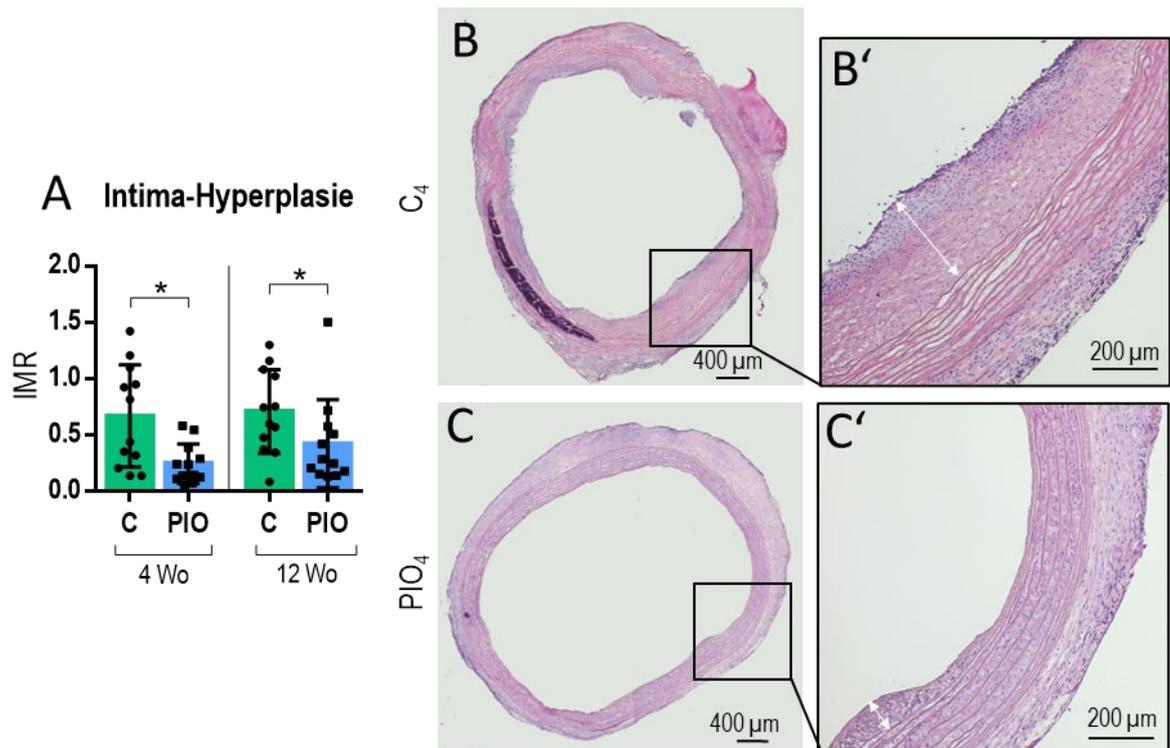


**Abb. 14: Echokardiographische Ergebnisse Nativklappe und Klappenimplantat**

Bei Implantation zeigte sich in beiden Gruppen keine Insuffizienz der implantierten Aortenklappe (**B**). In Gruppe PIO war der Insuffizienzgrad der implantierten Aortenklappe nach 4 (**C**) und 12 Wochen (**D**) geringer ausgeprägt als in Gruppe C. Die Ergebnisse repräsentieren Quotienten-Mittelwerte ( $VTI-II/VTI-I$ )  $\pm$   $SD$  ( $n = 20$  pro Gruppe bei IM,  $n = 10$  bei EX4 und 12). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. Signifikanzniveaus:  $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$ . AoAsc: Aorta *ascendens*, AoC: Klappentragendes Aortenkonduit, C: Fettreiches Futter, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, Post-AoC: Distal des AoC, VTI-I: systolisches Geschwindigkeits-Zeit-Integral [cm], VTI-II: diastolisches Geschwindigkeits-Zeit-Integral [cm]

### 3.4 Intima-Hyperplasie der klappentragenden Aortenkonduits

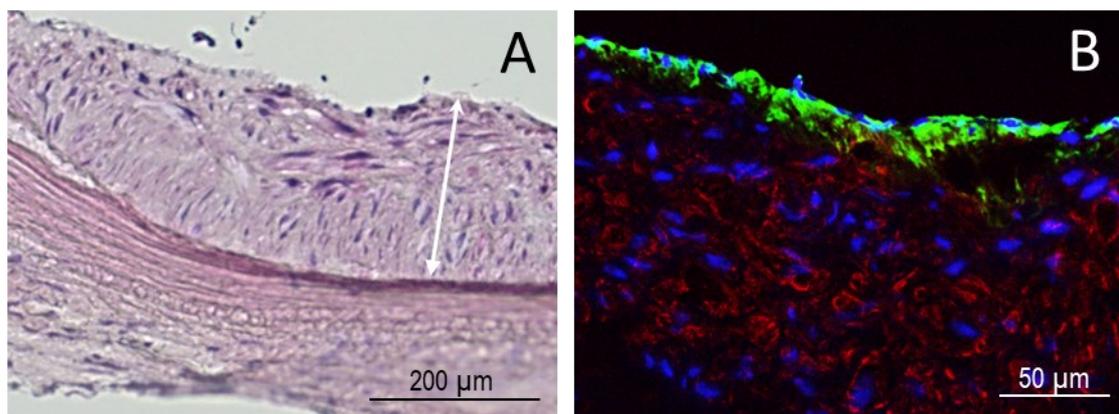
In Gruppe C war nach 4 und 12 Wochen eine signifikant erhöhte Intima-Hyperplasie im Vergleich zur Gruppe PIO erkennbar (Abb. 15).



**Abb. 15: Intima-Hyperplasie des Aortenkonduits**

Signifikant geringere Intima-Hyperplasie der Gruppe PIO nach 4 und 12 Wochen im Vergleich zur Gruppe C (A). Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-gefärbter Explantatschnitte zeigen verdickte Intima in Gruppe C (B, Pfeil in B') und schlanke Intima in Gruppe PIO (C, Pfeil in C'). Ergebnisse in A repräsentieren IMR-Mittelwerte  $\pm$  SD je Tier und Region ( $n = 4$  pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U*-Test. Signifikanzniveau:  $*p < 0,05$ . HE-Färbung: blau, Zellkerne; rot, Zellplasmaproteine und Kollagene. Vergrößerung: 100-fach. C: Fettreiches Futter, HE: Hämatoxylin-Eosin, IMR: Intima-Media-Ratio, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, Wo: Wochen,  $\mu\text{m}$ : Mikrometer.

Im Bereich der Intima-Hyperplasie erfolgte der ubiquitäre Nachweis  $\alpha\text{SMA}$ -positiver Glattmuskelzellen und eine lokalisierte Ansammlung vWF-positiver Endothelzellen auf der luminalen Gefäßseite (Abb. 16).



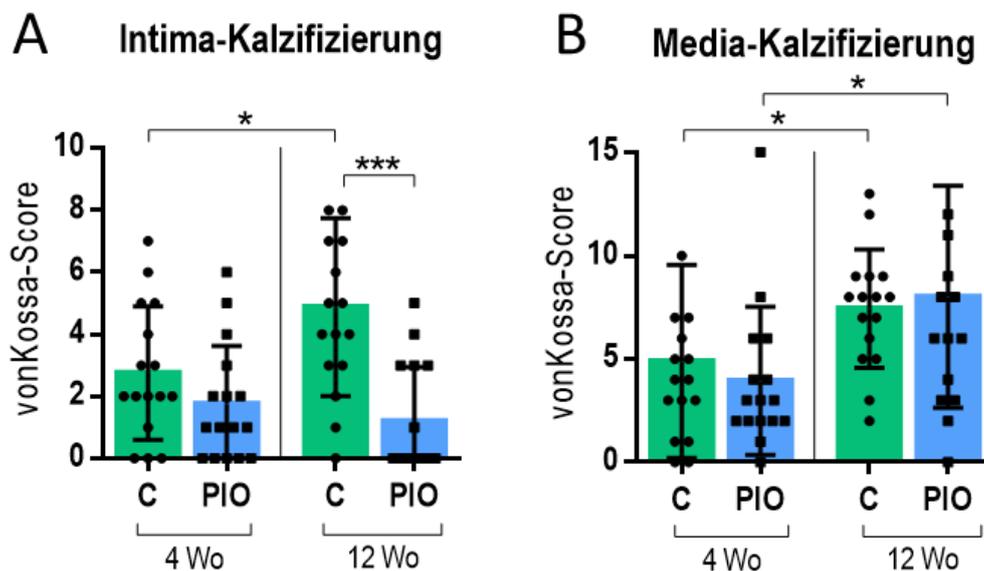
**Abb. 16:  $\alpha\text{SMA}$ - und vWF-Expression im Bereich der Intima**

Immunhistologische Darstellung  $\alpha\text{SMA}$ -positiver Glattmuskelzellen (rot), vWF-positiver Endothelzellen (grün) und der Zellkerne (blau) im Bereich der Intima-Hyperplasie (B). Gegenüberstellung des entsprechenden HE-gefärbten Areals (A). Vergrößerung: 100-fach (A), 200-fach (B). HE: Hämatoxylin-Eosin, vWF: von-Willebrand-Faktor,  $\alpha\text{SMA}$ :  $\alpha$ -Glattmuskel-Aktin,  $\mu\text{m}$ : Mikrometer.

### 3.5 Kalzifizierung der klappentragenden Aortenkonduits

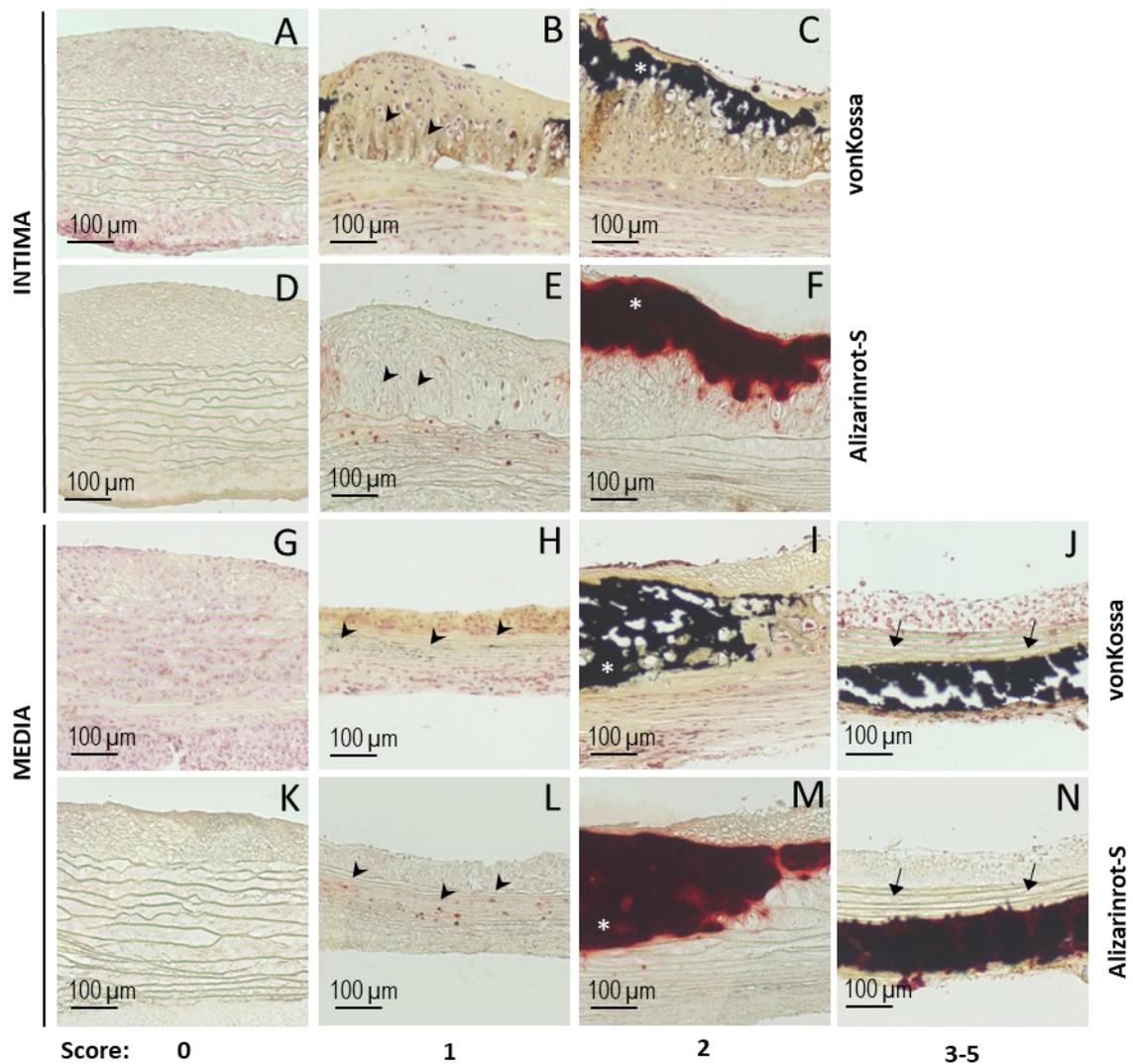
Die Explantate waren nach 12 Wochen signifikant stärker kalzifiziert als nach 4 Wochen. Dieser Effekt zeigte sich sowohl in der Intima der Kontrollgruppe C (Abb. 17A) als auch in der Media beider Gruppen (Abb. 17B). Pioglitazon führte nach 4 Wochen zu einer tendenziell geringeren und nach 12 Wochen zu einer signifikant geringeren Kalzifizierung der Intima (Abb. 17A).

Im Bereich der Media zeigte sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich (Abb. 17B). Abbildung 18C zeigt eine starke Kalzifizierung der Intima der Gruppe C nach 12 Wochen.



**Abb. 17: Intima- und Media-Kalzifizierung des Aortenkonduits im Gruppenvergleich**

In Gruppe PIO zeigte sich nach 12 Wochen eine signifikant geringere Intima-Kalzifizierung im Vergleich zur Kontrollgruppe C (A). Ergebnisse repräsentieren vonKossa-Score-Median  $\pm$  Interquartilbereich dreier Explantatschnitte je Tier und Region ( $n = 4$  pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U*-Test. Signifikanzniveaus: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ . C: Fettreiches Futter, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, Wo: Wochen.

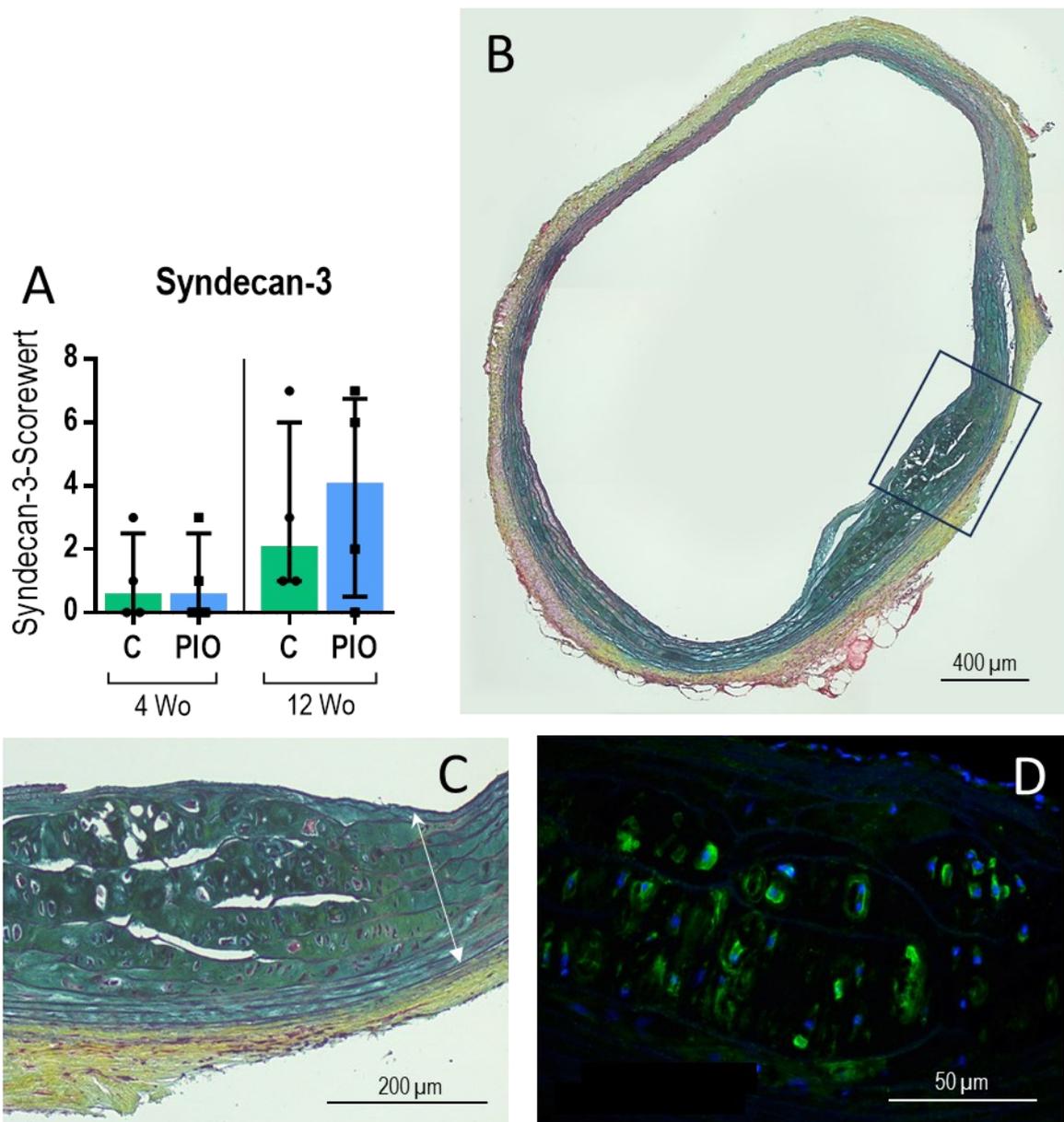


**Abb. 18: Histologisch sichtbare Unterschiede der Kalzifizierung im Aortenkonduit**

Lichtmikroskopische Aufnahmen vonKossa- (A-C, G-J) und Alizarinrot-S-gefärbter (D-F, K-N) Explantatschnitte zeigen verschiedene Schweregrade der Kalzifizierung (Score 0-5) im Bereich der Intima (A-F) und Media (G-N). Übereinstimmende Anfärbung verkalkter Areale im direkten Vergleich der Färbemethoden. VonKossa: schwarz, Kalziumkarbonate und -phosphate; rot, Zellkerne; Alizarinrot-S: rot, Kalzium. Vergrößerung: 100-fach. Pfeile: Kalkscholle, Pfeilspitzen: Mikrokalk, Sternchen: Flächige Kalzifizierung, µm: Mikrometer.

### 3.6 Chondrogene und osteogene Prozesse

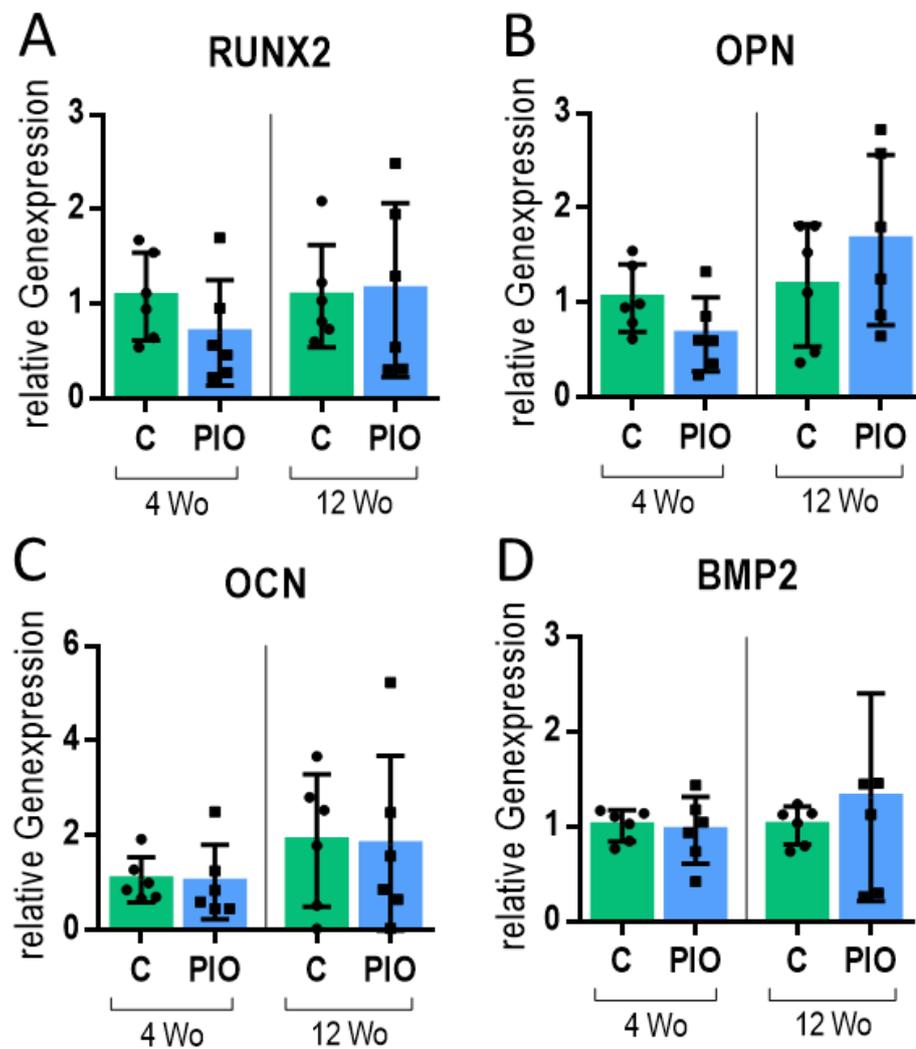
Mithilfe der Movat-Pentachrom-Färbung wurden innerhalb der Explantate Glykosaminoglykane (GAG) grün-blau angefärbt (Abb 19B, C). Der Nachweis einer großen Menge von Glykosaminoglykanen weist auf eine pro-chondrogene Gewebetransformation hin [248]. GAG wurden überwiegend in der Media der Explantate nachgewiesen (Abb. 19B, C). Eine Co-Expression von GAG und des Transmembranrezeptors Syndecan-3 wurde insbesondere in der Media nachgewiesen (Abb. 19D). Nach 4 und 12 Wochen konnten keine Unterschiede zwischen der PIO-Gruppe und der Kontrollgruppe bei der Expression von Syndecan-3 festgestellt werden (Abb. 19A).



**Abb. 19: Chondrogene Aktivität im Gruppenvergleich**

Glykosaminoglykane in Movat-Pentachrom-gefärbten Explantat-Arealen (**B, C**, blau-grün) waren vornehmlich in der Media (Doppelpfeil) mit Syndecan-3 (**D**, grün) co-lokalisiert. Kein signifikanter Unterschied der Syndecan-3-Expression zwischen Gruppe PIO und C (**A**). Immunhistologische Erhebung eines Syndecan-3-Scores und Darstellung von Score-Median  $\pm$  Interquartilabstand ( $n = 4$  pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. Movat-Pentachrom: blau-grün, Knorpel: blau-schwarz, Zellkerne; rot, Zytoplasma; gelb, kollagenes Bindegewebe. Immunhistologie: grün: Syndecan-3; blau, Zellkerne. Vergrößerung: 100-fach (B, C), 400-fach (D). C: Fettreiches Futter, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, Wo: Wochen,  $\mu\text{m}$ : Mikrometer.

Es zeigten sich zwischen Gruppe PIO und C keine signifikanten Unterschiede für die Expression von RUNX2, OPN, OCN oder BMP2, sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen (Abb. 20A-D).



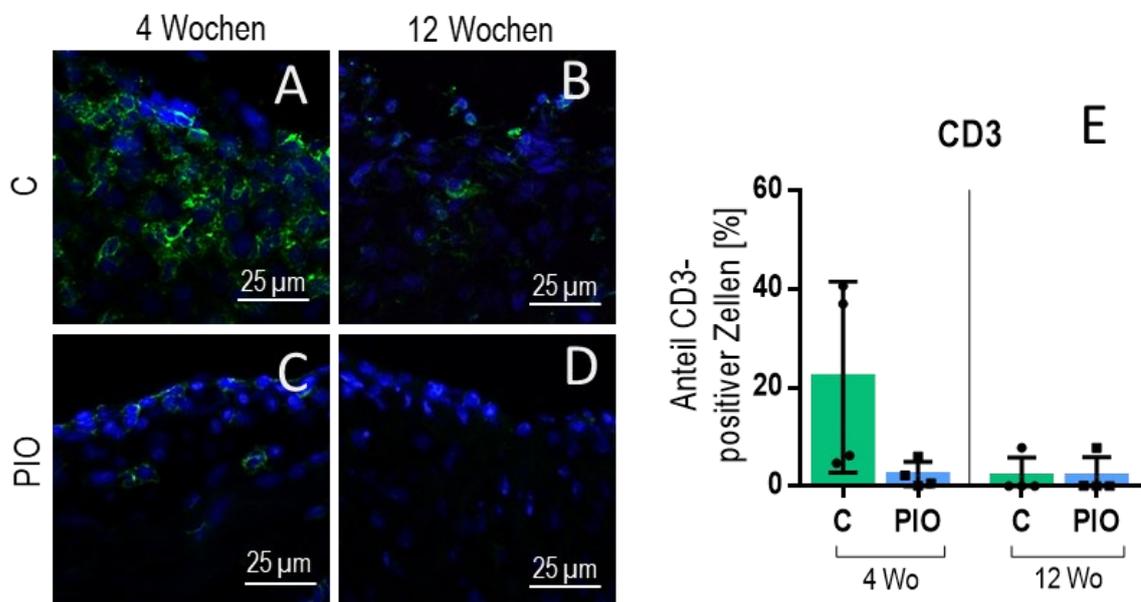
**Abb. 20: Expression von Genen der osteo-chondrogenen Transformation**

Zwischen Gruppe PIO und C zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede der Gene RUNX2 (A), OPN (B), OCN (C) und BMP2 (D). Die mRNA-Werte sind als relative Werte zur Kontrolle C dargestellt, gemessen mittels qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 6$  pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. BMP2: Knochenmorphogenetisches Protein 2, C: Fettreiches Futter, mRNA: Boten-RNA, OCN: Osteocalcin, OPN: Osteopontin, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, qPCR: Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, RUNX2: Runt-verbundter Transkriptionsfaktor 2

### 3.7 Inflammationsprozesse

In Gruppe PIO und Gruppe C wurde im immunhistologisch gefärbten Explantatgewebe die Expression von CD3 (Abb. 21) und CD68 (Abb. 22) nachgewiesen.

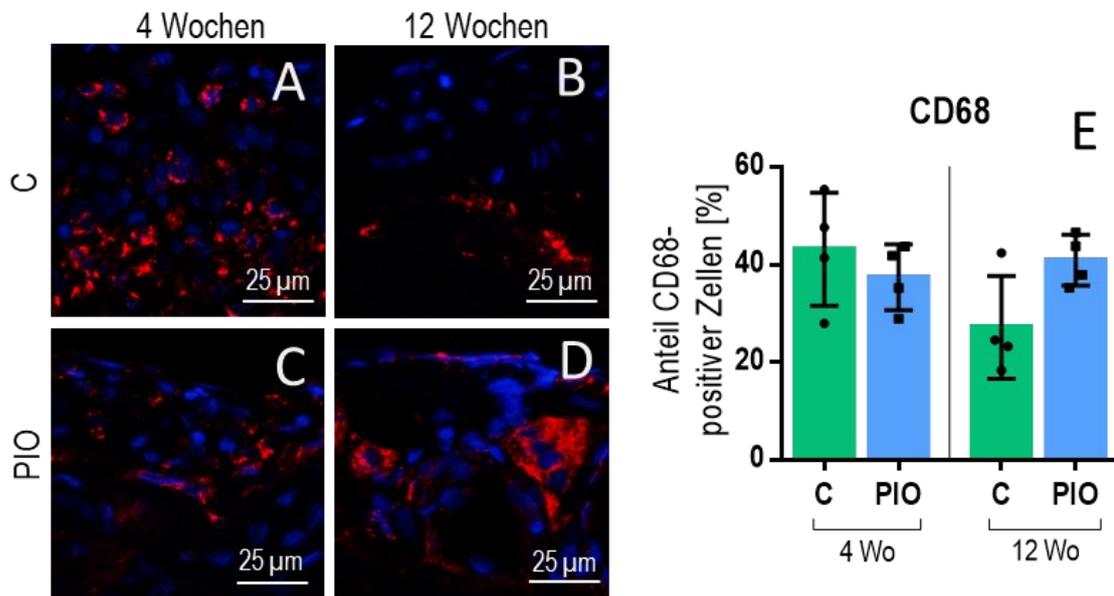
Ergänzend wurde der Anteil CD3- und CD68-positiver Zellen verglichen: In der Kontrollgruppe C war die CD3-Expression nach 4 Wochen tendenziell höher als nach 12 Wochen (Abb. 21A, B, E), bei Pioglitazongabe war diese nach 4 und 12 Wochen auf gleichbleibend niedrigem Niveau (Abb. 21C, D, E). Die Pioglitazongabe führte nach 4 Wochen zu einer tendenziellen Erniedrigung der CD3-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 21A, C, E). Auch nach 12 Wochen war der Unterschied zwischen den Gruppen nicht signifikant (Abb. 21E).



**Abb. 21: CD3-Expression im Gruppenvergleich**

Der Anteil CD3-positiver T-Lymphozyten (grün) war in Gruppe C nach 12 Wochen (**B**) tendenziell geringer als nach 4 Wochen (**A, E**). Kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe PIO und C (**E**). Ergebnisse repräsentieren Anteil CD3-positiver Zellen, angeben als Mittelwerte je Tier  $\pm$  SD ( $n=4$  pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. Grün: CD3, blau: Zellkerne. Vergrößerung: 200-fach. C: Fettreiches Futter, CD: *cluster of differentiation*, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, Wo: Wochen,  $\mu\text{m}$ : Mikrometer.

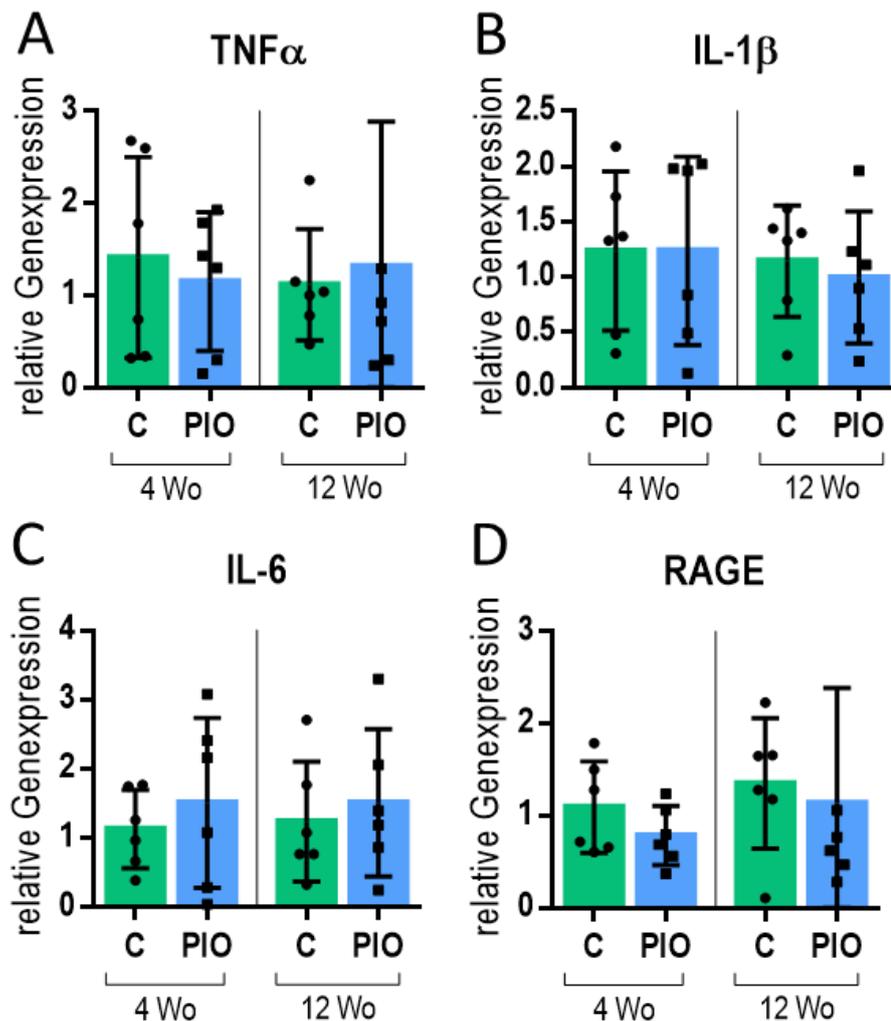
Bei der Analyse des CD68-Signals zeigten sich im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede, weder in Gruppe PIO (Abb. 22C, D, E) noch in Kontrollgruppe C (Abb. 22A, B, E).



**Abb. 22: CD68-Expression im Gruppenvergleich**

Der Anteil CD68-positiver Makrophagen (rot) war in Gruppe PIO nach 4 Wochen (C) tendenziell niedriger und nach 12 Wochen (D) tendenziell höher als in Gruppe C (A, B, E). Ergebnisse repräsentieren Anteil CD68-positiver Zellen, angegeben als Mittelwerte je Tier  $\pm$  SD ( $n = 4$  pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem Mann-Whitney-U-Test. Rot: CD68, blau: Zellkerne. Vergrößerung: 200-fach. C: Fettreiches Futter, CD: *cluster of differentiation*, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, Wo: Wochen,  $\mu\text{m}$ : Mikrometer.

Es zeigten sich zwischen Gruppe PIO und C keine signifikanten Unterschiede für die Expression von  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  oder RAGE, sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen (Abb. 23A-D).



**Abb. 23: Expression Inflammations-assoziiierter Gene**

Zwischen Gruppe PIO und C zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede der Gene TNF $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C) und RAGE (D). Die mRNA-Werte sind als relative Werte zur Kontrolle C dargestellt, gemessen mittels qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 6$  pro Gruppe). Signifikanzberechnung mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. C: Fettreiches Futter, IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ , IL-6: Interleukin-6, mRNA: Boten-RNA, PIO: Fettreiches Futter + Pioglitazon, qPCR: Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, RAGE: Rezeptor für fortgeschrittene Glykations-endprodukte, TNF $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Wo: Wochen.

#### 4 DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Mit einem Modell der heterotopen infrarenalen Implantation in Ratten untersuchten wir den Einfluss des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon auf die Degeneration von klappentagenden Aortenkonduits in adipösen Ratten mit einer Hypercholesterinämie. Fokus der Untersuchungen war hierbei der Unterschied von Intima-Hyperplasie, Kalzifizierung und Inflammation mit und ohne systemische PPAR $\gamma$ -Aktivierung. Signifikante Unterschiede zeigten sich im Vergleich der Intima-Hyperplasie und Kalzifizierung, welche nach systemischer PPAR $\gamma$ -Aktivierung deutlich geringer ausgeprägt waren.

#### **4.1 Implantationsmodell in adipösen, hypercholesterinämischen Ratten**

Grundlage unserer Untersuchungen war ein Modell der heterotopen infrarenalen Implantation, welches wir nach dem Vorbild einer zuvor publizierten Studie anwendeten [246].

Um den genannten Zusammenhang zwischen einer systemischen PPAR $\gamma$ -Aktivierung und Klappendegeneration zu untersuchen, wurden in der Vergangenheit verschiedene Tierversuche durchgeführt [30, 193, 194]. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen wurden dabei allerdings Nativklappen analysiert [30, 193, 194]. Durch unseren Versuchsaufbau konnten wir erstmals biologische Prothesen unter physiologischer Beanspruchung analysieren, indem sie wiederholten zyklischen Öffnungs- und Schließbewegungen während des Herzschlags ausgesetzt wurden.

Zusätzlich integrierten wir Hypercholesterinämie als einen bedeutenden Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen in unsere vergleichenden Studien, indem die Tiere eine fettreiche Ernährung erhielten. Dies ermöglichte uns eine Annäherung an einen bedeutenden Aspekt des typischen Patientenkollektivs in der biologischen Herzklappenprothetik.

Die Gesamtcholesterinspiegel unserer Versuchstiere wiesen in beiden Beobachtungszeiträumen signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Tieren auf, die in einer vorangegangenen Parallelstudie normale Ernährung erhielten. Im Rahmen einer 12-wöchigen Verabreichung von Pioglitazon beobachteten wir hingegen eine deutliche Abnahme der Gesamtcholesterinspiegel bei unseren hypercholesterinämischen Ratten. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass unsere experimentellen Bedingungen den Cholesterinstoffwechsel der Versuchstiere messbar beeinflusst haben.

Verschiedene Studien zeigten beim Menschen einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Gesamtcholesterin und kardiovaskulärer Kalzifizierung: beispielsweise identifizierten Farivar et al. einen Anstieg des Gesamtcholesterins als einen unabhängigen Risikofaktor für die Kalzifizierung und die darauffolgende Explantation von biologischen Aorten- und Mitralklappenprothesen [80]. Komplementär dazu zeigten Callister et al. mittels Computertomographie, dass eine medikamentös induzierte Reduktion des LDL- sowie des Gesamtcholesterinspiegels mit einer Verminderung des koronararteriellen Kalkgehaltes assoziiert war [258].

Des Weiteren wurde der Einfluss von Pioglitazon auf den Cholesterinmetabolismus bei Menschen untersucht. Aronoff et al. führten eine randomisierte, kontrollierte Studie mit 408

Teilnehmenden durch und konstatierten, dass Pioglitazon in einer dosisabhängigen Weise das Gesamtcholesterin bei Patientinnen und Patienten mit Typ-2-Diabetes senkte [181].

Das metabolische Syndrom, eine Ansammlung von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Insulinresistenz, Dyslipidämie und Hypertonie, steht in direktem Zusammenhang mit der Nierenfunktion und kann diese beeinträchtigen [259]. Eine verschlechterte Nierenfunktion kann sekundär zu kardiovaskulärer Verkalkung führen, welche die Struktur und Funktion der Gefäßwände, des Myokards und der Herzklappen beeinträchtigen kann [260]. In der aktuellen Untersuchung wurden Plasmakreatinin- und -harnstoffwerte regelmäßig gemessen, um die Nierenfunktion zu evaluieren. Während des gesamten Beobachtungszeitraums blieben diese Indikatoren in allen Gruppen über die Zeit stabil, was auf eine unveränderte Nierenfunktion hindeutet. Es ist also nicht ableitbar, dass die Nierenfunktion die AoC-Verkalkung in unseren Untersuchungen beeinflusst hat.

#### **4.2 Reduzierte Intima-Hyperplasie durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung**

Die Gewebe-Hyperplasie durch unkontrollierte Zellproliferation gilt als Hauptfaktor für die Entwicklung einer Atherosklerose [261–263]. Ein Tierversuch der cholesterininduzierten Atherosklerose in Kaninchen zeigte die aktive Rolle der Zellproliferation bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen, die sich auf dem Boden initialer Lipidablagerungen bildeten [264]. Diese Publikation impliziert, dass die Hemmung der exzessiven Intima-Hyperplasie eine vielversprechende Strategie sein könnte, um die kardiovaskuläre Degeneration positiv zu modulieren.

Die systemische PPAR $\gamma$ -Aktivierung über einen Zeitraum von 4 und 12 Wochen führte in unseren Untersuchungen zu einer signifikanten Reduktion der Intima-Hyperplasie in den AoCs. In Übereinstimmung mit unseren Befunden wurde in mehreren Studien ein anti-atherogener Effekt von Pioglitazon, einem PPAR $\gamma$ -Agonisten, beobachtet: Bei adipösen Wistar-Ratten führte es zur Verringerung des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen nach balloninduzierter Gefäßverletzung und resultierte in einer reduzierten Intima-Hyperplasie der Arteria carotis [219]. Bei Typ 2 DiabetikerInnen führte eine 6-monatige Pioglitazontherapie zu einer Reduktion der sonographisch gemessenen Intima-Media-Dicke der Arteria carotis [211].

Bei nicht-diabetischen Patienten führte die Anwendung von Pioglitazon nach koronarer Stentimplantation zu einer Hemmung der Intima-Hyperplasie und resultierte in einer Verringerung des Intima-Volumens: Dies galt sowohl für Patienten mit [192] und ohne

begleitendem metabolischem Syndrom [192]. Diese Befunde wurden auch bei Typ 2 DiabetikerInnen repliziert, bei denen Pioglitazon zu einer geringeren Rate von In-Stent-Restenosen führte [225].

### **4.3 Reduzierte Intima-Kalzifizierung durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung**

Die Beobachtung, dass die Verringerung der AoC-Kalzifizierung möglicherweise mit einer Abnahme der Intima-Hyperplasie in Verbindung steht, wirft wichtige Fragen bezüglich der zugrunde liegenden Mechanismen und therapeutischen Implikationen auf. Unsere Ergebnisse belegen eine deutlich reduzierte Intima-Kalzifizierung unter Einfluss von Pioglitazon. Die Hemmung der Intima-Zellproliferation führt letztlich zur Verringerung des primär kalzifizierenden Gewebes [265]. Dies steht im Einklang mit der etablierten Erkenntnis, dass unkontrollierte Zellproliferation ein dominierender Faktor in der Pathogenese sowohl der Atherosklerose [261–263] als auch der degenerativen Verkalkung von Herzklappen [10, 35, 80, 266] ist.

Kalzifizierungsprozesse treten sowohl in atherosklerotischen Läsionen als auch in nativen Herzklappen auf [18]. In unserer Studie führte die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch Pioglitazon nach 12 Wochen zu einer signifikanten Reduktion der Intima-Kalzifizierung in den implantierten AoCs. Frühere Erkenntnisse belegen, dass PPAR $\gamma$ -Aktivierung wirksam gegen Kalzifizierungsprozesse in Gefäßen und Herzklappen ist: Beispielsweise konnten Cheng et al. in-vitro eine verminderte Kalzifizierung glatter Gefäßmuskulzellen unter Verwendung von Rosiglitazon nachweisen [267]. Ebenso beobachteten Li et al. eine reduzierte Kalzifizierung der nativen Aortenklappe bei hypercholesterinämischen Kaninchen nach Gabe von Pioglitazon [194].

Es ist denkbar, dass durch die Pioglitazon-induzierte Reduktion des Plasma-Gesamtcholesterins im Blut auch die Ablagerung von Lipoproteinen in das AoC-Gewebe reduziert wurde. Im Prothesengewebe abgelagertes LDL kann ausgelöst durch reaktive Sauerstoffspezies oxidieren und degenerative Prozesse auslösen [105, 124]. Mithilfe immunhistochemischer Methoden untersuchten Shetty et al. degenerierte biologische Klappenprothesen von 18 Patienten, die einer Explantation unterzogen wurden, auf Lipidablagerung und wiesen eine signifikante Anhäufung von oxidiertem LDL in den Klappensegeln nach [105]. Es ist jedoch anzumerken, dass in der Studie von Shetty et al. das Gesamtcholesterinwerte im Blut der Patienten nicht erfasst wurden. In unserer eigenen

Studie wurde die Lipidablagerung in den AoCs nicht erhoben, daher kann der Zusammenhang lediglich angenommen werden.

In humanen Nativklappen wurde außerdem eine Koinzidenz von Lipidablagerungen und kalzifizierten Klappenarealen nachgewiesen [27, 28]. In unserer Studie führte die Anwendung von Pioglitazon zu einer signifikanten Senkung der Gesamtcholesterinwerte im Blut sowie der Intima-Kalzifizierung. Daher könnte in der nicht untersuchten Lipidablagerung eine zusätzliche Erklärung für die beobachteten Effekte liegen.

Daneben gibt es mehrere Hinweise dafür, dass osteogene Mechanismen eine Rolle in der Pathogenese der Degeneration und des Funktionsverlustes nativer Herzklappen spielen [268, 269]. In verkalkten humanen Aortenklappen wurden osteoblasten-ähnliche Zellen sowie heterotoper Knochen identifiziert, was auf eine pathologische Ossifikation hinweist [22, 268]. Die Arbeit von Srivatsa et al. unterstreicht diese Erkenntnisse, indem sie die Lokalisation der Expression von Matrixproteinen wie OPN und OCN, die für die Knochenhomöostase essenziell sind, in unmittelbarer Nähe zu kalzifizierten Arealen in Herzklappen aufzeigt [112]. Verschiedene Studien wiesen die Expression von OCN, OPN und BMP-2 außerdem in verkalkten atherosklerotischen Plaques nach [270, 16, 271, 272]. Es wurde gezeigt, dass BMP-2 die Gefäßverkalkung teilweise durch die Regulation des Phosphattransports und die Erhöhung der RUNX2-mRNA-Konzentration in vaskulären Glattmuskelzellen *in vitro* stimuliert [273].

In unserer Studie wurde eine ubiquitäre Expression von OPN, OCN, BMP2 und RUNX2 in klappentragenden Aortenkonduits festgestellt. Interessanterweise zeigte sich trotz der nachgewiesenen positiven Wirkung von Pioglitazon auf die Klappenfunktion und die Reduktion der Intimaverkalkung keine signifikante Veränderung in der Expression der untersuchten Marker. Dies steht im Kontrast zu den *in vitro* Ergebnissen von Xu et al., die eine Reduktion der OCN- und RUNX2-Expression durch Pioglitazon feststellten [274], sowie zu den Befunden von Katahira et al., die in einem Rattenmodell eine signifikante Verringerung der OPN- und RUNX2-Expression nach Pioglitazon-Behandlung nachwiesen [275].

Unsere Ergebnisse sind jedoch kongruent mit den Beobachtungen von Chu et al., die in hypercholesterinämischen Mäusen keine Reduktion der OCN-Expression durch Pioglitazon feststellten, obwohl eine verminderte Kalzifizierung der Aortenklappe belegt wurde [193]. Unsere Studie ergab nur eine marginale Reduktion der RUNX2-Expression, was mit den

Ergebnissen von Chu et al. übereinstimmt, die eine reduzierte RUNX2-Expression in der Aorta und Aortenklappe hypercholesterinämischer Mäuse nach Pioglitazon-Behandlung berichteten [193]. Darüber hinaus unterstützt die Studie von Gao et al. die potenzielle Wirkung von Pioglitazon auf die RUNX2-Expression, indem sie eine Reduktion in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten in vitro demonstrierte [276].

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Ergebnisse könnte in der gleichzeitigen Untersuchung sowohl der Herzklappe als auch der Aorta mittels Genexpressionsanalysen an ganzen Explantaten liegen. Diese Methode könnte potenzielle Veränderungen in der Genexpression maskieren, die spezifisch in einem der beiden Gewebe auftreten. Weitere Genexpressionsanalysen mit getrennter Betrachtung von Klappe und Aorta sowie detaillierteren zellulären Analysen könnten in zukünftigen Studien notwendig sein.

Diese Diskrepanzen in den Ergebnissen unterstreichen die Komplexität der Pioglitazon-Wirkung auf die vaskuläre und valvuläre Pathophysiologie und deuten auf die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen hin, um die zugrundeliegenden Mechanismen vollständig zu verstehen.

#### **4.4 Inflammationsprozesse bei antidegenerativer PPAR $\gamma$ -Aktivierung**

Inflammationsprozesse spielen eine zentrale Rolle bei der kardiovaskulären Kalzifizierung und vermitteln somit die Entstehung atherosklerotischer Läsionen und die Degeneration biologischer Herzklappenprothesen [18, 104, 113, 114]. Beteiligt ist ein komplexes Zusammenspiel von zellulären und humoralen Komponenten: so wurden T-Lymphozyten in frühen atherosklerotischen Läsionen und degeneriertem bioprothetischem Herzklappengewebe nachgewiesen [102, 119–121]. Umgekehrt könnte eine Aktivierungshemmung dieser Entzündungszellen deren Gewebemigration und Gewebeerstörung reduzieren.

Drew und Tipping hemmten durch die Gabe von Cyclosporin A die Aktivierung von T-Lymphozyten in der Aorta hypercholesterinämischer Kaninchen, was die Bildung atherosklerotischer Plaques signifikant verringerte [277]. In adipösen, insulinresistenten Mäusen wiesen Foryst-Ludwig et al. einen Zusammenhang zwischen der PPAR $\gamma$ -Aktivierung und einer reduzierten T-lymphozytären Fettgewebsinfiltration nach [278]: Rosiglitazon- und Telmisartangabe reduzierte die Genexpression des T-Zell-Markers CD3 im abdominellen Fett der Versuchsratten. Da Fett- bzw. Lipidablagerungen sowohl bei der Atherosklerose als auch bei der Degeneration biologischer Herzklappenprothesen eine Rolle

spielen [18, 25, 26, 105], könnte eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung auch in diesem Kontext protektiv wirken.

In unseren Untersuchungen konnte CD3 in den Explantaten nachgewiesen werden, was auf eine Gewebeeinfiltration mit CD3-positiven T-Lymphozyten hinweist. Durch die Pioglitazon-induzierte PPAR $\gamma$ -Aktivierung zeigte sich nach 4 Wochen aber lediglich eine leichte Reduktion der T-Lymphozyten im Gewebe. Zum Zeitpunkt der Analysen konnte ein signifikanter Einfluss der PPAR $\gamma$ -Aktivierung auf die Gewebsinfiltration durch T-Lymphozyten also nicht nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die beobachteten Effekte des Pioglitazons (Reduzierte Intima-Kalzifizierung und -Hyperplasie sowie Erhalt der Funktionalität) nicht primär durch die Beeinflussung der T-Lymphozyten-Infiltration bedingt sind [265].

Neben T-Lymphozyten wurden auch Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen [279–281] und degeneriertem bioprothetischem Herzklappengewebe nachgewiesen [75, 115]. Ricote et al. zeigten in ihrem *in vitro* Versuch eine hohe PPAR $\gamma$ -Expression in aktivierten Makrophagen. Darüber hinaus wiesen sie nach, dass PPAR $\gamma$  die Expression verschiedener Gene in Makrophagen reguliert und damit positiv in schädliche Entzündungsprozesse eingreift [167]. Es zeigte sich allerdings kein signifikanter Einfluss von Pioglitazon auf die Anzahl von Makrophagen.

Des Weiteren wurde die Expression der pro-inflammatorischen Gene TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in unseren Explantaten durch Pioglitazon nicht signifikant beeinflusst. Die protektiven Pioglitazoneffekte könnten also auf die Modifikation anderer pro-inflammatorischer Gene zurückzuführen sein.

Auch die RAGE-Expression wurde in den Explantaten untersucht. Zu den Liganden zählen unter anderem fortgeschrittene Glykationsendprodukte, die sich im Rahmen des Alterungsprozesses und insbesondere bei Diabetes in verschiedenen Geweben ablagern [282]. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass RAGE mit einer Inflammation, Atherosklerose und kardiovaskulärer Kalzifizierung assoziiert ist [283–287]. Strategien, die auf eine Inaktivierung von RAGE abzielen, hemmen die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine [194], die Expression osteoblastischer Gene [194, 283] und die Atherosklerose-Progression [287–289]. In mehreren Studien reduzierten PPAR $\gamma$ -Agonisten die RAGE-Expression [290–292]. Li et al. zeigten, dass Pioglitazon in Aortenklappen hypercholesterinämischer Kaninchen eine verringerte RAGE-Expression

vermittelt [194]. Begleitend kam es zu einer Reduktion von Entzündungszellen, oxidativem Stress und OPN-Expression, was sich in einer besser erhaltenen Klappenfunktion niederschlug [194]. Die RAGE-Hemmung präsentiert sich somit als wichtiger Wirkungsmechanismus in der protektiven Pioglitazon-Wirkung. In unserer Studie reduzierte Pioglitazon die RAGE-Expression in den Explantaten nur leicht, ein signifikanter Effekt wurde nicht nachgewiesen.

Eine Erklärung hierfür wäre, dass die protektive Wirkung von Pioglitazon nicht primär von der RAGE-Aktivität abhängt. Ausgehend von der gegenteiligen Annahme könnte der positive Einfluss der RAGE-Expression auch außerhalb der von uns analysierten Zeitpunkten stattgefunden haben.

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung könnte sein, dass wir die lokale RAGE-Expression in Gewebeproben untersucht haben, obwohl andere Mediatoren des Expressionsprozesses eine maßgebliche Wirkung haben. So könnten die lokalen Proteinkonzentrationen von RAGE oder die zirkulierenden RAGE-Spiegel für die Wirkung des PPAR $\gamma$ -Stoffwechsels eine bedeutendere Rolle spielen.

#### **4.5 Limitationen der Arbeit**

In der vorliegenden Studie wurde die Degeneration biologischer kardiovaskulärer Prothesen *in vivo* untersucht. Angewendet wurde ein Modell der heterotopen, allogenen Implantation in adipösen, hypercholesterinämischen Ratten. Wenngleich dieses Modell viele Komponenten einschließt, die auch nach dem menschlichen Herzklappenersatz einwirken (hämodynamische Belastung der Prothese, metabolische Risikofaktoren), so bildet es dennoch nicht vollständig die Komplexität der Degenerationsprozesse nach. Erhoben wurden das Gewicht sowie Blutglukose- und Lipidparameter im Blut der Versuchstiere. Die Aufnahme weiterer Einflussfaktoren in das Spektrum der Untersuchungsparameter (z.B. Blutdruck, Insulinhaushalt, Fettsäurespeicherung) könnte Aufschluss über den zugrundeliegenden Mechanismus der protektiven Pioglitazonwirkung geben.

Analysiert wurden die Bioprothesen hinsichtlich Funktion, Gewebe-Hyperplasie, Kalzifizierung und Inflammation, alles wesentliche Kennwerte und Mechanismen bei der Degeneration nativer Herzklappen und biologischer Herzklappenprothesen. Die Untersuchung weiterer Gewebeprozesse, wie z.B. Lipidablagerungen und oxidativer Stress, könnten den zugrundeliegenden Wirkmechanismus weiter beleuchten.

Der festgelegte Beobachtungszeitraum von 4 und 12 Wochen erlaubt keine Aussagen über die Langzeiteffekte von Pioglitazon. Auch sehr frühe Effekte bei initialer Pioglitazongabe entziehen sich so den Analysen. Darüber hinaus wurde in den Genexpressionsanalysen osteoblastischer und inflammatorischer Marker das AoC in Gänze untersucht. Isolierte Aussagen über die Genexpression in der Aortenklappe oder des nachfolgenden Aortenkonduits können so nicht getroffen werden. Die Klappenregion umfasst lediglich ein Viertel des jeweils untersuchten AoCs, sodass Effekte im nachfolgenden Aortenkonduit stärker ins Gewicht fallen. So könnte ein signifikanter Effekt, der isoliert in der Region der Aortenklappe aufgetreten ist, bei einer Gesamtanalyse des AoC maskiert worden sein.

#### **4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die systemische PPAR $\gamma$ -Aktivierung vermindert die Intima-Hyperplasie und nachfolgende Kalzifizierung von kryokonservierten Allografts bei adipösen, hypercholesterinämischen Empfängern. Darüber hinaus verlangsamt sie die Degeneration der implantierten Aortenklappe, erkennbar durch eine reduzierte funktionelle Beeinträchtigung. Ferner senkt die systemische PPAR $\gamma$ -Aktivierung den Gesamtcholesterinspiegel im Plasma und adressiert somit einen Risikofaktor der kardiovaskulären Kalzifizierung.

Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse lässt sich vermuten, dass durch die postoperative Einnahme von Pioglitazon eine Lebenszeitverlängerung von biologischen Aortenklappenprothesen zu erwarten sein könnte. Profitieren könnten hier vor allem Patientinnen und Patienten, die aufgrund von Übergewicht und Hypercholesterinämie ein erhöhtes Risiko der Prothesendegeneration aufweisen. Um genaue Aussagen abzuleiten, wären perspektivisch Untersuchungen in größeren Versuchstieren und anschließend im Menschen erforderlich. Weitergehende Untersuchungen könnten hier zusätzlichen Aufschluss über den zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus geben und den potenziellen Nutzen einer Pioglitazon-Medikation bei Allograft-Empfängern unterstreichen.

## 5 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zunächst Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg, dem Direktor der *Klinik für Herzchirurgie* der Universitätsklinik Düsseldorf, für die Aufnahme in sein engagiertes Forschungsteam und die Möglichkeit mein Promotionsvorhaben in seiner Klinik zu verwirklichen.

Meinem Doktorvater und ehemaligem Leiter der *experimentellen Chirurgie* Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari, danke ich für die gewissenhafte Begleitung meiner Arbeit sowie seine zahlreichen hilfreichen Denkanstöße. Seinem Engagement habe ich eine sehr prägende und lehrreiche Zeit zu verdanken.

Meiner Betreuerin Frau Dr. med. Anna Kathrin Assmann möchte ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und ihre Unterstützung vom Beginn der Laborversuche bis zur Fertigstellung dieser Dissertationsschrift danken.

Unserer MTA Frau Gisela Müller danke ich vielmals für ihre unermüdliche Hilfestellung und Anleitung im Labor, mit der sie unter anderem den Weg für die Durchführung der PCRs geebnet hat. Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth und Frau Dr. rer. nat. Jessica Isabel Selig danke ich dafür, dass sie sich für Erklärungen und fachliche Tipps auch im hektischen Laboralltag immer Zeit genommen haben.

Danken möchte ich außerdem meinen ehemaligen Mitdoktoranden Herrn Dr. med. Daniel Goschmer und Frau Dr. med. Laura Jacobi. Ihre Freundschaft hat die vielen Stunden im Labor zu etwas ganz Besonderem gemacht.

Mein tiefer Dank gilt außerdem meinem Partner Daniel Weppert, der mir über die gesamte Promotion hinweg mit Geduld und Hingabe zur Seite gestanden und viele wertvolle Tipps für die Optimierung dieser Arbeit beigesteuert hat.

Meinen Eltern und meinem großen Bruder verdanke ich mehr, als ich in diesem Rahmen ausdrücken kann. Mit ihrer bedingungslosen Unterstützung ermöglichten sie mir nicht nur mein Studium, sondern brachten mir auch bei an mich zu glauben. Bessere Vorbilder hätte ich mir nicht erträumen können.

## 6 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- [1] Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Gentile F, Jneid H, Krieger EV, Mack M, McLeod C, O’Gara PT, Rigolin VH, et al. (2021) 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease. *J Am Coll Cardiol* 77:25–197
- [2] Carabello BA, Crawford BA (1997) Valvular Heart Disease. *N Engl J Med* 337:32–41
- [3] Ross J, Braunwald E (1968) Aortic stenosis. *Circulation* 38:61–67
- [4] Simonet M, Driessen-Mol A, Baaijens FPT, Bouten CVC (2011) Heart valve tissue regeneration. *Electrospinning for Tissue Regeneration*. Woodhead Publishing, 202–224
- [5] Fong P, Shin’oka T, Lopez-Soler RI, Breuer C (2006) The use of polymer based scaffolds in tissue-engineered heart valves. *Prog Pediatr Cardiol* 21:193–199
- [6] Cheung DY, Duan B, Butcher JT (2015) Current Progress in Tissue Engineering of Heart Valves: Multiscale Problems, Multiscale Solutions. *Expert Opin Biol Ther* 15:1155–1172
- [7] Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Bärwolf C, Hanrath P, Horstkotte D, Koch KC, Mügge A, Schäfers HJ, Flachskampf FA (2006) Klappenvitien im Erwachsenenalter. *Clin Res Cardiol* 95:620–641
- [8] Shiels HA, White E (2008) The Frank–Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *J Exp Biol* 211:2005–2013
- [9] Jung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde J-L, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, Vahanian A (2003) A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J* 24:1231–1243
- [10] Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM (1997) Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 29:630–634
- [11] Erdmann E (Hrsg) (2011) *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 8. Aufl.
- [12] Sievers H-H, Misfeld M (2010) Erworbene Vitien der Aortenklappe. In: Ziemer G, Haverich A (Hrsg) *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und den herznahen Gefäßen*. Springer: Berlin, Heidelberg, 3. 601–634
- [13] Sievers HH, Misfeld M (2010) Erworbene Vitien der Aortenklappe. In: Ziemer G, Haverich A *Herzchirurgie*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 601–634
- [14] Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Bärwolf C, Hanrath P, Horstkotte D, Koch KC, Mügge A, Schäfers HJ, Flachskampf FA (2006) Klappenvitien im Erwachsenenalter. *Clin Res Cardiol* 95:620–641
- [15] Freeman RV, Otto CM (2005) Spectrum of Calcific Aortic Valve Disease. *Circulation* 111:3316–3326
- [16] Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL (1993) Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91:1800–1809
- [17] Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T (2003) Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. *Circulation* 107:2181–2184
- [18] Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O’Brien KD (1994) Characterization of the early lesion of „degenerative“ valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 90:844–853

- [19] Olsson M, Rosenqvist M, Nilsson J (1994) Expression of HLA-DR antigen and smooth muscle cell differentiation markers by valvular fibroblasts in degenerative aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 24:1664–1671
- [20] Olsson M, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A, Rosenqvist M, Rydén L, Nilsson J (1994) Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* 23:1162–1170
- [21] Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Castaneda LE, Brooks RM, Zimmerman K, Heistad DD (2010) Evidence for Active Regulation of Pro-Osteogenic Signaling in Advanced Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:2482–2486
- [22] Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS (2001) Bone Formation and Inflammation in Cardiac Valves. *Circulation* 103:1522–1528
- [23] Mohler ER, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR (1997) Detection of Osteopontin in Calcified Human Aortic Valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:547–552
- [24] O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM (1995) Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 92:2163–2168
- [25] Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, Sebo TC, Niekrasz M, McConnell JP, Singh RJ, Stone NJ, Bonow RO, Spelsberg TC (2002) Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve. *Circulation* 105:2660–2665
- [26] Rajamannan NM, Subramaniam M, Caira F, Stock SR, Spelsberg TC (2005) Atorvastatin Inhibits Hypercholesterolemia-Induced Calcification in the Aortic Valves via the Lrp5 Receptor Pathway. *Circulation* 112:I229-234
- [27] O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM (1996) Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of „degenerative“ valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:523–532
- [28] Olsson M, Thyberg J, Nilsson J (1999) Presence of Oxidized Low Density Lipoprotein in Nonrheumatic Stenotic Aortic Valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1218–1222
- [29] Walton KW, Williamson N, Johnson AG (1970) The pathogenesis of atherosclerosis of the mitral and aortic valves. *J Pathol* 101:205–220
- [30] Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, Heistad DD (2006) Calcific Aortic Valve Stenosis in Old Hypercholesterolemic Mice. *Circulation* 114:2065–2069
- [31] Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Brooks RM, Berry CJ, Zimmerman K, Young SG, Heistad DD (2009) Lowering Plasma Cholesterol Levels Halts Progression of Aortic Valve Disease in Mice. *Circulation* 119:2693–2701
- [32] Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Peña-Silva R, Heistad DD (2008) Dysregulation of Antioxidant Mechanisms Contributes to Increased Oxidative Stress in Calcific Aortic Valvular Stenosis in Humans. *J Am Coll Cardiol* 52:843–850
- [33] Boon A, Cheriex E, Lodder J, Kessels F (1997) Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve. *Heart* 78:472–474
- [34] Aronow WS, Ahn C, Kronzon I, Goldman ME (2001) Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons. *J Am Coll Cardiol* 88:693–695
- [35] Mohler ER, Nichols R, Harvey WP, Sheridan MJ, Waller BF, Waller BF (1991) Development and progression of aortic valve stenosis: Atherosclerosis risk factors—a causal relationship? a clinical morphologic study. *Clin Cardiol* 14:995–999

- [36] Peltier M, Trojette F, Sarano ME, Grigioni F, Slama MA, Tribouilloy CM (2003) Relation between cardiovascular risk factors and nonrheumatic severe calcific aortic stenosis among patients with a three-cuspid aortic valve. *Am J Cardiol* 91:97–99
- [37] Deutscher S, Rockette HE, Krishnaswami V (1984) Diabetes and hypercholesterolemia among patients with calcific aortic stenosis. *J Chronic Dis* 37:407–415
- [38] Katz R, Wong ND, Kronmal R, Takasu J, Shavelle DM, Probstfield JL, Bertoni AG, Budoff MJ, O'Brien KD (2006) Features of the Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus as Predictors of Aortic Valve Calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation* 113:2113–2119
- [39] Chui MCK, Newby DE, Panarelli M, Bloomfield P, Boon NA (2009) Association between calcific aortic stenosis and hypercholesterolemia: Is there a need for a randomized controlled trial of cholesterol-lowering therapy? *Clin Cardiol* 24:52–55
- [40] Pohle K, Mäffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, Achenbach S (2001) Progression of Aortic Valve Calcification. *Circulation* 104:1927–1932
- [41] Statistisches Bundesamt (Destatis) (2020) Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2019 (Zugriff vom 01.04.2021). <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>
- [42] Statistisches Bundesamt (Destatis) (2021) Daten der Lebendgeborenen, Totgeborenen, Gestorbenen und der Gestorbenen im 1. Lebensjahr (Zugriff vom 25.05.2021). <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Bevoelkerung/Geburten/Tabellen/lebendgeborene-gestorbene.html>
- [43] Beckmann A, Meyer R, Lewandowski J, Markewitz A, Gummert J (2020) German Heart Surgery Report 2019: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 68:263–276
- [44] Hoffmann G, Lutter G, Cremer J (2008) Durability of Bioprosthetic Cardiac Valves. *Dtsch Arztebl Int* 105:143–148
- [45] Vongpatanasin W, Lange RA (1996) Prosthetic Heart Valves. *N Engl J Med* 335:407–416
- [46] Schoen FJ, Levy RJ (1999) Tissue heart valves: Current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res* 47:439–465
- [47] Singhal P, Luk A, Butany J (2013) Bioprosthetic Heart Valves: Impact of Implantation on Biomaterials. *ISRN Biomater* 2013:1–14
- [48] Bloomfield P (2002) Choice of heart valve prosthesis. *Heart* 87:583–589
- [49] Hoffmann G, Lutter G, Cremer J (2008) Durability of Bioprosthetic Cardiac Valves. *Dtsch Arztebl Int*
- [50] Sodian R, Lueders C, Kraemer L, Kuebler W, Shakibaei M, Reichart B, Daebritz S, Hetzer R (2006) Tissue Engineering of Autologous Human Heart Valves Using Cryopreserved Vascular Umbilical Cord Cells. *Ann Thorac Surg* 81:2207–2216
- [51] Zund G (1997) The in vitro construction of a tissue engineered bioprosthetic heart valve. *Eur J Cardiothorac Surg* 11:493–497
- [52] Ibrahim D, Kakarougkas A, Allam N (2017) Recent advances on electrospun scaffolds as matrices for tissue-engineered heart valves. *Mater Today Chem* 5:11–23
- [53] O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH, Pohlner PG, McGiffin DC, Kirklin JW (1987) A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 94:812–823
- [54] Lupinetti FM, Christy JP, King DM, El Khatib H, Thompson SA (1991) Immunogenicity, Antigenicity, and Endothelial Viability of Aortic Valves Preserved at 4°C in a Nutrient Medium. *J Card Surg* 6:454–461

- [55] Pibarot P, Dumesnil JG (2009) Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation* 119:1034–1048
- [56] Orszulak TA, Schaff HV, Puga FJ, Danielson GK, Mullany CJ, Anderson BJ, Ilstrup DM (1997) Event Status of the Starr-Edwards Aortic Valve to 20 Years: A Benchmark for Comparison. *Ann Thorac Surg* 63:620–626
- [57] Schoevaerdt JC, Buche M, el Gariani A, Lichtsteiner M, Jaumin P, Ponlot R, Chalant ChH (1987) Twenty years' experience with the Model 6120 Starr-Edwards valve in the mitral position. *J Thorac Cardiovasc Surg* 94:375–382
- [58] Ruel M, Kulik A, Rubens FD, Bédard P, Masters RG, Pipe AL, Mesana TG (2004) Late incidence and determinants of reoperation in patients with prosthetic heart valves. *Eur J Cardiothorac Surg* 25:364–370
- [59] Rahimtoola SH (2003) Choice of prosthetic heart valve for adult patients. *J Am Coll Cardiol* 41:893–904
- [60] Becker RC, Eisenberg P, Turpie AGG (2001) Pathobiologic features and prevention of thrombotic complications associated with prosthetic heart valves: Fundamental principles and the contribution of platelets and thrombin. *Am Heart J* 141:1025–1037
- [61] Debétaz L-F, Ruchat P, Hurni M, Fischer A, Stumpe F, Sadeghi H, van Melle G, Goy J-J (1997) St. Jude medical valve prosthesis: An analysis of long-term outcome and prognostic factors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 113:134–148
- [62] Schoevaerdt JC, Buche M, el Gariani A, Lichtsteiner M, Jaumin P, Ponlot R, Chalant ChH (1987) Twenty years' experience with the Model 6120 Starr-Edwards valve in the mitral position. *J Thorac Cardiovasc Surg* 94:375–382
- [63] Rahimtoola SH (2003) Choice of prosthetic heart valve for adult patients. *J Am Coll Cardiol* 41:893–904
- [64] Cohn LH, Collins JJ, DiSesa VJ, Couper GS, Peigh PS, Kowalker W, Allred E (1989) Fifteen-year experience with 1678 Hancock porcine bioprosthetic heart valve replacements. *Ann Surg* 210:435–443
- [65] Jamieson WRE, Munro AI, Miyagishima RT, Allen P, Burr LH, Tyers GFO (1995) Carpentier-edwards standard porcine bioprosthesis: Clinical performance to seventeen years. *Ann Thorac Surg* 60:999–1007
- [66] Grunkemeier GL, Jamieson WRE, Miller DC, Starr A (1994) Actuarial versus actual risk of porcine structural valve deterioration. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108:709–718
- [67] Schoen FJ, Hobson CE (1985) Anatomic analysis of removed prosthetic heart valves: Causes of failure of 33 mechanical valves and 58 bioprostheses, 1980 to 1983. *Hum Pathol* 16:549–559
- [68] Turina J, Hess OM, Turina M, Krayenbuehl HP (1993) Cardiac bioprostheses in the 1990s. *Circulation* 88:775–781
- [69] Clarke DR, Campbell DN, Hayward AR, Bishop DA (1993) Degeneration of aortic valve allografts in young recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 105:934–942
- [70] Alkhaja N, Belboul A, Rashid M, Elgatit A, Roberts D, Larsson S, Williamolsson G (1991) The influence of age on the durability of Carpentier-Edwards biological valves Thirteen years follow-up. *Eur J Cardiothorac Surg* 5:635–640
- [71] Marchand MA, Aupart MR, Norton R, Goldsmith IRA, Pelletier LC, Pellerin M, Dubiel T, Daenen WJ, Herijgers P, Casselman FP, Holden MP, David TE (2001) Fifteen-year experience with the mitral Carpentier-Edwards PERIMOUNT pericardial bioprosthesis. *Ann Thorac Surg* 71:236–239
- [72] Frank G, Tyers O, Jamieson WRE, Ian Munro A, Germann E, Burr LH, Miyagishima RT, Ling H (1995) Reoperation in biological and mechanical valve populations: Fate of the reoperative patient. *Ann Thorac Surg* 60:464–469
- [73] Cohn LH, Couper GS, Aranki SF, Kinchla NM, Collins JJ (1991) The Long-Term Follow-Up of the Hancock Modified Orifice Porcine Bioprosthetic Valve. *J Card Surg* 6:557–561

- [74] Schoen FJ, Levy RJ (2005) Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention. *Ann Thorac Surg* 79:1072–1080
- [75] Manji RA, Zhu LF, Nijjar NK, Rayner DC, Korbitt GS, Churchill Thomas A., Rajotte Ray V., Koshal Arvind, Ross David B. (2006) Glutaraldehyde-Fixed Bioprosthetic Heart Valve Conduits Calcify and Fail From Xenograft Rejection. *Circulation* 114:318–327
- [76] Jamieson WRE, Cartier PC (2004) Surgical Management of Valvular Heart Disease 2004 20:114
- [77] Nollert G, Miksch J, Kreuzer E, Reichart B (2003) Risk factors for atherosclerosis and the degeneration of pericardial valves after aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:965–968
- [78] Lindroos M, Kupari M, Valvanne J, Strandberg T, Heikkilä J, Tilvis R (1994) Factors associated with calcific aortic valve degeneration in the elderly. *Eur Heart J* 15:865–870
- [79] Aronow WS, Schwartz KS, Koenigsberg M (1987) Correlation of serum lipids, calcium, and phosphorus, diabetes mellitus and history of systemic hypertension with presence or absence of calcified or thickened aortic cusps or root in elderly patients. *Am J Cardiol* 59:998–999
- [80] Farivar RS, Cohn LH (2003) Hypercholesterolemia is a risk factor for bioprosthetic valve calcification and explantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:969–975
- [81] Briand M (2006) Metabolic Syndrome Is Associated With Faster Degeneration of Bioprosthetic Valves. *Circulation* 114:512–517
- [82] David TE, Ivanov J, Armstrong S, Feindel CM, Cohen G (2001) Late results of heart valve replacement with the Hancock II bioprosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121:268–278
- [83] Fann JI, Miller DC, Moore KA, Mitchell RS, Oyer PE, Stinson EB, Robbins RC, Reitz BA, Shumway NE (1996) Twenty-year clinical experience with porcine bioprostheses. *Ann Thorac Surg* 62:1301–1312
- [84] Grabenwöger M, Sider J, Fitzal F, Zelenka C, Windberger U, Grimm M, Moritz A, Böck P, Wolner E (1996) Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann Thorac Surg* 62:772–777
- [85] Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ (1987) The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol* 127:122–130
- [86] Thubrikar MJ, Deck JD, Aouad J, Nolan SP (1983) Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 86:115–125
- [87] Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ (1983) Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol* 113:143–155
- [88] Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005) The metabolic syndrome. *The Lancet* 365:1415–1428
- [89] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001) Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285:2486–2497
- [90] Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Spertus JA, Costa F (2005) Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. *Circulation* 112:2735–2752
- [91] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001) Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol

- Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285:2486–2497
- [92] Comment on the provisional report from the WHO consultation (1999) *Diabet Med* 16:442–443
- [93] Ford ES, Giles WH, Dietz WH (2002) Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287:356–359
- [94] Azizi F, Salehi P, Etemadi A, Zahedi-Asl S (2003) Prevalence of metabolic syndrome in an urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. *Diabetes Res Clin Pract* 61:29–37
- [95] Mokdad AH (2001) The Continuing Epidemics of Obesity and Diabetes in the United States. *JAMA* 286:1195
- [96] Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782–787
- [97] Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen M-R, Groop L (2001) Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 24:683–689
- [98] Lakka H-M (2002) The Metabolic Syndrome and Total and Cardiovascular Disease Mortality in Middle-aged Men. *JAMA* 288:2709
- [99] Katz R, Budoff MJ, Takasu J, Shavelle DM, Bertoni A, Blumenthal RS, Ouyang P, Wong ND, O'Brien KD (2009) Relationship of Metabolic Syndrome With Incident Aortic Valve Calcium and Aortic Valve Calcium Progression: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes* 58:813–819
- [100] Briand M, Lemieux I, Dumesnil JG, Mathieu P, Cartier A, Després J-P, Arsenault M, Couet J, Pibarot P (2006) Metabolic Syndrome Negatively Influences Disease Progression and Prognosis in Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 47:2229–2236
- [101] Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ (1986) Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. *Am J Pathol* 123:134–145
- [102] Wilhelmi MH, Mertsching H, Wilhelmi M, Leyh R, Haverich A (2003) Role of inflammation in allogeneic and xenogeneic heart valve degeneration: immunohistochemical evaluation of inflammatory endothelial cell activation. *J Heart Valve Dis* 12:520–526
- [103] Moustapha A, Ross DB, Bittira B, Van-Velzen D, McAlister VC, Lannon CL, Lee TD (1997) Aortic valve grafts in the rat: Evidence for rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114:891–902
- [104] Hoekstra F, Knoop C, Vaessen L, Wassenaar C, Jutte N, Bos E, Bogers A, Weimar W (1996) Donor-specific cellular immune response against human cardiac valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112:281–286
- [105] Shetty R, Pibarot P, Audet A, Janvier R, Dagenais F, Perron J, Couture C, Voisine P, Després JP, Mathieu P (2009) Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *Eur J Clin Invest* 39:471–480
- [106] Schoen FJ, Levy RJ, Nelson AC, Bernhard WF, Nashef A, Hawley M (1985) Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification. *Lab Invest* 52:523–532
- [107] Bailey MT, Pillarisetti S, Xiao H, Vyavahare NR (2003) Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves. *J Biomed Mater Res A* 66:93–102
- [108] Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Kawanami O, Roberts WC (1980) Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. *Am J Cardiol* 46:744–753
- [109] Mosier J, Nguyen N, Parker K, LaShanSimpson C (2017) Calcification of Biomaterials and Diseased States. *Biomater - Phys Chem - New Ed*

- [110] Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S (1994) Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem* 42:885–896
- [111] Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. Thieme: Stuttgart, 6. Aufl.
- [112] Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB, Kleppe L, Veinot J, Edwards WD, Johnson CM, Fitzpatrick LA (1997) Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest* 99:996–1009
- [113] Hogan P, Duplock L, Green M, Smith S, Gall KL, Frazer IH, O'Brien MF (1996) Human aortic valve allografts elicit a donor-specific immune response. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112:1260–1267
- [114] Rajani B, Mee RB, Ratliff NB (1998) Evidence for rejection of homograft cardiac valves in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115:111–117
- [115] Green MK, Walsh MD, Dare A, Hogan PG, Zhao X-M, Frazer IH, Bansal AS, O'Brien MF (1998) Histologic and immunohistochemical responses after aortic valve allografts in the rat. *Ann Thorac Surg* 66:216-S220
- [116] Legare JF, Lee TDG, Creaser K, Ross DB (2000) T lymphocytes mediate leaflet destruction and allograft aortic valve failure in rats. *Ann Thorac Surg* 70:1238–1245
- [117] Welters MJ, Oei FB, Witvliet MD, Vaessen LMB, Cromme-Dijkhuis AH, Bogers AJ, Weimar W, Claas FH (2002) A broad and strong humoral immune response to donor HLA after implantation of cryopreserved human heart valve allografts. *Hum Immunol* 63:1019–1025
- [118] Sandrin M, McKenzie IFC (1994) Gal $\alpha$ (1,3)Gal, the Major Xenoantigen(s) Recognised in Pigs by Human Natural Antibodies. *Immunol Rev* 141:169–190
- [119] Ferrans VJ, Boyce SW, Billingham ME, Jones M, Ishihara T, Roberts WC (1980) Calcific deposits in porcine bioprostheses: Structure and pathogenesis. *Am J Cardiol* 46:721–734
- [120] Skowasch D, Schrempf S, Wernert N, Steinmetz M, Jabs A, Tuleta I, Welsch U, Preusse CJ, Likungu JA, Welz A, Lüderitz B, Bauriedel G (2005) Cells of primarily extravalvular origin in degenerative aortic valves and bioprostheses. *Eur Heart J* 26:2576–2580
- [121] Human P, Zilla P (2001) The possible role of immune responses in bioprosthetic heart valve failure. *J Heart Valve Dis* 10:460–466
- [122] Murphy KM, Weaver C, Janeway C (2018) Janeway Immunologie. (L. Seidler, Übers.). Springer Spektrum: Berlin [Heidelberg], 9. Auflage
- [123] Aldehyde tanning: the villain in bioprosthetic calcification (1991) *Eur J Cardiothorac Surg* 5:288–299
- [124] Olsson M, Thyberg J, Nilsson J (1999) Presence of Oxidized Low Density Lipoprotein in Nonrheumatic Stenotic Aortic Valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1218–1222
- [125] Chen J-H, Yip CYY, Sone ED, Simmons CA (2009) Identification and Characterization of Aortic Valve Mesenchymal Progenitor Cells with Robust Osteogenic Calcification Potential. *Am J Pathol* 174:1109–1119
- [126] Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarıkoç A, Kılıç R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, et al. (2004) Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 36:57–66
- [127] Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL (1993) Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91:1800–1809

- [128] Schmid K, McSharry WO, Pameijer CH, Binette JP (1980) Chemical and physicochemical studies on the mineral deposits of the human atherosclerotic aorta. *Atherosclerosis* 37:199–210
- [129] Boitier E, Gautier JC, Roberts R (2003) Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comp Hepatol* 2:3
- [130] Berger J, Moller DE (2002) The Mechanisms of Action of PPARs. *Annu Rev Med* 53:409–435
- [131] Maglich JM, Sluder A, Guan X, Shi Y, McKee DD, Carrick K, Kamdar K, Willson TM, Moore JT (2001) Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biol* 2:research0029.1-7
- [132] Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2001) Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. *Science* 294:1866–1870
- [133] Hsueh WA, Bruemmer D (2004) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ : Implications for Cardiovascular Disease. *Hypertension* 43:297–305
- [134] Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA (2001) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Metabolic Disease. *Annu Rev Biochem* 70:341–367
- [135] Dubois M, Pattou F, Kerr-Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, Desreumaux P, Auwerx J, Schoonjans K, Lefebvre J (2000) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 43:1165–1169
- [136] Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$ : adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135:798–800
- [137] Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B (2002) Pleiotropic Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Lipid Metabolism and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:717–726
- [138] Yki-Järvinen H (2004) Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 351:1106–1118
- [139] Dubois V, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels B (2017) Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J Clin Invest* 127:1202–1214
- [140] Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4318–4323
- [141] Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A (2007) Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and PPAR $\gamma$ coactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutr* 10:1132–1137
- [142] Sheu SH, Kaya T, Waxman DJ, Vajda S (2005) Exploring the Binding Site Structure of the PPAR $\gamma$  Ligand-Binding Domain by Computational Solvent Mapping. *Biochemistry* 44:1193–1209
- [143] Lehrke M, Lazar MA (2005) The Many Faces of PPAR $\gamma$ . *Cell* 123:993–999
- [144] Rogue A, Lambert C, Jossé R, Antherieu S, Spire C, Claude N, Guillouzo A (2011) Comparative Gene Expression Profiles Induced by PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha/\gamma$  Agonists in Human Hepatocytes. *PLoS One* 6:e18816
- [145] Rogue A, Spire C, Brun M, Claude N, Guillouzo A (2010) Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver. *PPAR Res* 2010:325183
- [146] Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR (2000) The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. *J Med Chem* 43:527–550
- [147] Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart JC, Staels B (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice: *Curr Opin Lipidol* 12:245–254

- [148] Chinetti G, Fruchart J-C, Staels B (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 49:497–505
- [149] Tsuchida A, Yamauchi T, Kadowaki T (2005) Nuclear Receptors as Targets for Drug Development: Molecular Mechanisms for Regulation of Obesity and Insulin Resistance by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, CREB-Binding Protein, and Adiponectin. *J Pharmacol Sci* 2:164–170
- [150] Kintscher U, Law RE (2005) PPAR $\gamma$ -mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 288:E287–E291
- [151] Havel PJ (2002) Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin: *Curr Opin Lipidol* 13:51–59
- [152] Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, et al. (2002) Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8:731–737
- [153] Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J (1996) PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15:5336–5348
- [154] Chui PC, Guan HP, Lehrke M, Lazar MA (2005) PPAR $\gamma$  regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J Clin Invest* 115:2244–2256
- [155] Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA (1999) Identification of a Functional Peroxisome Proliferator-responsive Element in the Murine Fatty Acid Transport Protein Gene. *J Biol Chem* 274:3970–3977
- [156] Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM (1995) PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15:351–357
- [157] Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Stepan CM, Lazar MA (2002) A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 8:1122–1128
- [158] Rieusset J, Auwerx J, Vidal H (1999) Regulation of Gene Expression by Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  with Rosiglitazone (BRL 49653) in Human Adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 265:265–271
- [159] Smith U, Gogg S, Johansson A, Olausson T, Rotter V, Svalstedt B (2001) Thiazolidinediones (PPAR $\gamma$  agonists) but not PPAR  $\alpha$  agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes1. *FASEB J* 15:215–220
- [160] Rajagopalan R, Xu Y, Abbadessa M (2006) The effect of pioglitazone on glycemic and lipid parameters and adverse events in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: A post hoc analysis of four randomized trials. *Am J Geriatr Pharmacother* 4:123–133
- [161] Marx N, Bourcier T, Sukhova GK, Libby P, Plutzky J (1999) PPAR $\gamma$  Activation in Human Endothelial Cells Increases Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:546–551
- [162] Babaev VR, Yancey PG, Ryzhov SV, Kon V, Breyer MD, Magnuson Mark A., Fazio Sergio, Linton MacRae F. (2005) Conditional knockout of macrophage PPAR $\gamma$  increases atherosclerosis in C57BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1647–1653
- [163] Qu A, Shah YM, Manna SK, Gonzalez FJ (2012) Disruption of Endothelial Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Accelerates Diet-induced Atherogenesis in Low-density Lipoprotein Receptor-null Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:65–73

- [164] Meredith D, Panchatcharam M, Miriyala S, Tsai YS, Morris AJ, Maeda Nobuyo, Stouffer George A., Smyth Susan S. (2009) Dominant-Negative Loss of PPAR $\gamma$  Function Enhances Smooth Muscle Cell Proliferation, Migration, and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:465–471
- [165] Wang N, Yin R, Liu Y, Mao G, Xi F (2011) Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  in Atherosclerosis. *Circ J* 75:528–535
- [166] Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 110:371–385
- [167] Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79–82
- [168] Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H (2004) PPAR  $\gamma$  insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113:846–855
- [169] Yamashita A, Takada T, Nemoto K, Yamamoto G, Torii R (2006) Transient suppression of PPAR $\gamma$  directed ES cells into an osteoblastic lineage. *FEBS Lett* 580:4121–4125
- [170] Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J (1994) Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med* 331:1188–1193
- [171] Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Glass L, Mahankali S, Ferrannini E, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA (2001) Improved Glycemic Control and Enhanced Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Subjects Treated With Pioglitazone. *Diabetes Care* 24:710–719
- [172] Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA (2002) Effect of Pioglitazone on Abdominal Fat Distribution and Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2784–2791
- [173] Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Matsuda M, Cusi K, Mahankali A, Mahankali S, Mandarino LJ, DeFronzo RA (2001) Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients. *Diabetologia* 44:2210–2219
- [174] Suter SL (1992) Metabolic Effects of New Oral Hypoglycemic Agent CS-045 in NIPPM Subjects. *Diabetes Care* 15:193–203
- [175] Bajaj M, Suraamornkul S, Piper P, Hardies LJ, Glass L, Cersosimo E, Pratipanawatr T, Miyazaki Y, DeFronzo RA (2004) Decreased Plasma Adiponectin Concentrations Are Closely Related to Hepatic Fat Content and Hepatic Insulin Resistance in Pioglitazone-Treated Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89:200–206
- [176] Bajaj M, Suraamornkul S, Pratipanawatr T, Hardies LJ, Pratipanawatr W, Glass L, Cersosimo E, Miyazaki Y, DeFronzo RA (2003) Pioglitazone Reduces Hepatic Fat Content and Augments Splanchnic Glucose Uptake in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 52:1364–1370
- [177] Tiikkainen M, Häkkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Mäkimattila S, Yki-Järvinen H (2004) Effects of Rosiglitazone and Metformin on Liver Fat Content, Hepatic Insulin Resistance, Insulin Clearance, and Gene Expression in Adipose Tissue in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 53:2169–2176
- [178] Carey DG, Cowin GJ, Galloway GJ, Jones NP, Richards JC, Biswas N, Doddrell DM (2002) Effect of Rosiglitazone on Insulin Sensitivity and Body Composition in Type 2 Diabetic Patients. *Obes Res* 10:1008–1015
- [179] Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, Petersen KF (2002) The Effects of Rosiglitazone on Insulin

- Sensitivity, Lipolysis, and Hepatic and Skeletal Muscle Triglyceride Content in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51:797–802
- [180] Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, Tan MH, Khan MA, Perez AT, Jacober SJ (2005) A Comparison of Lipid and Glycemic Effects of Pioglitazone and Rosiglitazone in Patients With Type 2 Diabetes and Dyslipidemia. *Diabetes Care* 28:1547–1554
- [181] Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL (2000) Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care* 23:1605–1611
- [182] Rosenblatt S, Miskin B, Glazer NB, Prince MJ, Robertson KE (2001) The impact of pioglitazone on glycemic control and atherogenic dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus: *Coron Artery Dis* 12:413–423
- [183] Kipnes MS, Krosnick A, Rendell MS, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL (2001) Pioglitazone hydrochloride in combination with sulfonylurea therapy improves glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Med* 111:10–17
- [184] Hedblad B, Nilsson P, Engström G, Berglund G, Janzon L (2002) Insulin resistance in non-diabetic subjects is associated with increased incidence of myocardial infarction and death. *Diabet Med* 19:470–475
- [185] Piatti PM, Di Mario C, Monti LD, Fragasso G, Sgura F, Caumo A, Setola E, Lucotti P, Galluccio E, Ronchi C, Origgi A, Zavaroni I, et al. (2003) Association of Insulin Resistance, Hyperleptinemia, and Impaired Nitric Oxide Release With In-Stent Restenosis in Patients Undergoing Coronary Stenting. *Circulation* 108:2074–2081
- [186] Després JP, Lamarche B, Mauriège P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien P-J (1996) Hyperinsulinemia as an Independent Risk Factor for Ischemic Heart Disease. *N Engl J Med* 334:952–958
- [187] Pfeifle B, Ditschuneit H (1981) Effect of insulin on growth of cultured human arterial smooth muscle cells. *Diabetologia* 20:155–158
- [188] Stout RW, Bierman EL, Ross R (1975) Effect of insulin on the proliferation of cultured primate arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 36:319–327
- [189] Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE (2007) Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 298:1180–1188
- [190] Patel D, Walitt B, Lindsay J, Wilensky RL (2011) Role of Pioglitazone in the Prevention of Restenosis and Need for Revascularization After Bare-Metal Stent Implantation. *JACC Cardiovasc Interv* 4:353–360
- [191] Marx N, Wöhrle J, Nusser T, Walcher D, Rinker, Hombach V, Koenig W, Höher M (2005) Pioglitazone Reduces Neointima Volume After Coronary Stent Implantation. *Circulation* 112:2792–2798
- [192] Katayama T, Ueba H, Tsuboi K, Kubo N, Yasu T, Kuroki M, Saito M, Momomura S, Kawakami M (2007) Reduction of neointimal hyperplasia after coronary stenting by pioglitazone in nondiabetic patients with metabolic syndrome. *Am Heart J* 153:762.e1–7
- [193] Chu Y, Lund DD, Weiss RM, Brooks RM, Doshi H, Hajj GP, Sigmund CD, Heistad DD (2013) Pioglitazone Attenuates Valvular Calcification Induced by Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:523–532
- [194] Li F, Cai Z, Chen F, Shi X, Zhang Q, Chen S, Shi J, Wang DW, Dong N (2012) Pioglitazone attenuates progression of aortic valve calcification via down-regulating receptor for advanced glycation end products. *Basic Res Cardiol* 107
- [195] Berger JP, Petro AE, Macnaul KL, Kelly LJ, Zhang BB, Richards K, Elbrecht A, Johnson BA, Zhou G, Doebber TW, Biswas C, Parikh M, et al. (2003) Distinct

- Properties and Advantages of a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Protein  $\gamma$  Selective Modulator. *Mol Endocrinol* 17:662–676
- [196] Coletta D, Sriwijitkamol A, Wajcberg E, Tantiwong P, Li M, Prentki M, Madiraju SM, Jenkinson CP, Cersosimo E, Musi N, DeFronzo R (2009) Pioglitazone stimulates AMP-activated protein kinase signalling and increases the expression of genes involved in adiponectin signalling, mitochondrial function and fat oxidation in human skeletal muscle in vivo: A randomised trial. *Diabetologia* 52:723–732
- [197] Bays H, Mandarin L, DeFronzo RA (2004) Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. *J Clin Endocrinol Metab* 89:463–478
- [198] Miyazaki Y, He H, Mandarin LJ, DeFronzo RA (2003) Rosiglitazone Improves Downstream Insulin Receptor Signaling in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* 52:1943–1950
- [199] Miyazaki Y, Matsuda M, DeFronzo RA (2002) Dose-Response Effect of Pioglitazone on Insulin Sensitivity and Insulin Secretion in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 25:517–523
- [200] Cavaghan MK, Ehrmann DA, Byrne MM, Polonsky KS (1997) Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves beta cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. *J Clin Invest* 100:530–537
- [201] Gastaldelli A, Miyazaki Y, Mahankali A, Berria R, Pettiti M, Buzzigoli E, Ferrannini E, DeFronzo RA (2006) The Effect of Pioglitazone on the Liver: Role of adiponectin. *Diabetes Care* 29:2275–2281
- [202] Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Santini E, Ciociaro D, DeFronzo RA, Ferrannini E (2006) The Effect of Rosiglitazone on the Liver: Decreased Gluconeogenesis in Patients with Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 91:806–812
- [203] Pickavance LC, Widdowson PS, Foster JR, Williams G, Wilding JPH (2003) Chronic treatment with the thiazolidinedione, MCC-555, is associated with reductions in nitric oxide synthase activity and  $\beta$ -cell apoptosis in the pancreas of the Zucker Diabetic Fatty rat. *Int J Exp Pathol* 84:83–89
- [204] Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y, Unger RH (1998) Troglitazone Lowers Islet Fat and Restores Beta Cell Function of Zucker Diabetic Fatty Rats. *J Biol Chem* 273:3547–3550
- [205] Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE (2001)  $\beta$ -Cell Mass Dynamics in Zucker Diabetic Fatty Rats: Rosiglitazone Prevents the Rise in Net Cell Death. *Diabetes* 50:1021–1029
- [206] DeFronzo RA (2010) Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 53:1270–1287
- [207] Spiegelman BM (1998) PPAR- $\gamma$ : Adipogenic Regulator and Thiazolidinedione Receptor 47:507–514
- [208] Unger RH (2003) Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 14:398–403
- [209] Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL, Newell-Morris L (2000) Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care* 23:465–471
- [210] DeFronzo RA, Banerji M, Clement SC, Kitabchi AE, Ratner RE, Musi N (2011) Pioglitazone for Diabetes Prevention in Impaired Glucose Tolerance. *N Engl J Med* 364:1104–1115
- [211] Pfützner A, Marx N, Lübben G, Langenfeld M, Walcher D, Konrad T, Forst T (2005) Improvement of Cardiovascular Risk Markers by Pioglitazone Is Independent From Glycemic Control: Results From the Pioneer Study. *J Am Coll Cardiol* 45:1925–1931

- [212] Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B (2004) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Atherogenesis. *Circ Res* 94:1168–1178
- [213] Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, et al. (2001) PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 7:53–58
- [214] Mörl H (1964) Über den Myokardinfarkt. *Virchows Arch Für Pathol Anat Physiol Für Klin Med* 337:383–394
- [215] Kreuzer J, Tiefenbacher C (2003) Atherosklerose: Taschenatlas spezial. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1. Aufl.
- [216] Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, French BC, Phillips JA, Mucksavage ML, Wilensky RL, Mohler ER, Rothblat GH, et al. (2011) Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *N Engl J Med* 364:127–135
- [217] Little PJ, Osman N, de Dios ST, Cemerlang N, Ballinger M, Nigro J (2007) Anti-proliferative activity of oral anti-hyperglycemic agents on human vascular smooth muscle cells: thiazolidinediones (glitazones) have enhanced activity under high glucose conditions. *Cardiovasc Diabetol* 6:33
- [218] Igarashi M, Hirata A, Yamaguchi H, Tsuchiya H, Ohnuma H, Tominaga M, Daimon M, Kato T (2001) Characterization of an inhibitory effect of pioglitazone on balloon-injured vascular smooth muscle cell growth. *Metabolism* 50:955–962
- [219] Igarashi M, Takeda Y, Ishibashi N, Takahashi K, Mori S, Tominaga M, Saito Y (1997) Pioglitazone reduces smooth muscle cell density of rat carotid arterial intima induced by balloon catheterization. *Horm Metab Res* 29:444–449
- [220] Kornowski R, Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Bucher TA, Hong MK, Popma JJ, Leon MB (1997) Increased Restenosis in Diabetes Mellitus After Coronary Interventions Is Due to Exaggerated Intimal Hyperplasia: A Serial Intravascular Ultrasound Study. *Circulation* 95:1366–1369
- [221] Lau KW, Ding ZP, Johan A, Lim YL (1998) Midterm angiographic outcome of single-vessel intracoronary stent placement in diabetic versus nondiabetic patients: A matched comparative study. *Am Heart J* 136:150–155
- [222] Kastrati A, Schömig A, Elezi S, Schühlen H, Dirschinger J, Hadamitzky M, Wehinger A, Hausleiter J, Walter H, Neumann FJ (1997) Predictive Factors of Restenosis After Coronary Stent Placement. *J Am Coll Cardiol* 30:1428–1436
- [223] Carrozza JP, Kuntz RE, Fishman RF, Baim DS (1993) Restenosis after Arterial Injury Caused by Coronary Stenting in Patients with Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med* 118:344–349
- [224] Klugherz BD, DeAngelo DL, Kim BK, Herrmann HC, Hirshfeld JW, Kolansky DM (1996) Three-year clinical follow-up after Palmaz-Schatz stenting. *J Am Coll Cardiol* 27:1185–1191
- [225] Nishio K, Sakurai M, Kusuyama T, Shigemitsu M, Fukui T, Kawamura K, Itoh S, Konno N, Katagiri T (2006) A Randomized Comparison of Pioglitazone to Inhibit Restenosis After Coronary Stenting in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 29:101–106
- [226] Geng D, Jin D, Wu W, Wang Z, Wang J (2009) Effect of thiazolidinediones on in-stent restenosis in patients after coronary stenting: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 202:521–528
- [227] Rosmarakis ES, Falagas ME (2007) Effect of thiazolidinedione therapy on restenosis after coronary stent implantation: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 154:144–150
- [228] Takagi T, Yamamuro A, Tamita K, Yamabe K, Katayama M, Mizoguchi S, Ibuki M, Tani T, Tanabe K, Nagai K, Shiratori K, Morioka S, et al. (2003) Pioglitazone reduces

- neointimal tissue proliferation after coronary stent implantation in patients with type 2 diabetes mellitus: an intravascular ultrasound scanning study. *Am Heart J* 146:E5
- [229] Kaneda H, Shiono T, Miyashita Y, Takahashi S, Taketani Y, Domae H, Matsumi J, Mizuno S, Minami Y, Sugitatsu K, Saito S (2009) Efficacy and safety of pioglitazone in patients with ST elevation myocardial infarction treated with primary stent implantation. *Heart* 95:1079–1084
- [230] Takagi T, Okura H, Kobayashi Y, Kataoka T, Taguchi H, Toda I, Tamita K, Yamamuro A, Sakanoue Y, Ito A, Yanagi S, Shimeno K, et al. (2009) A Prospective, Multicenter, Randomized Trial to Assess Efficacy of Pioglitazone on In-Stent Neointimal Suppression in Type 2 Diabetes. *JACC Cardiovasc Interv* 2:524–531
- [231] Joner M, Farb A, Cheng Q, Finn AV, Acampado, Burke AP, Skorija K, Creighton W, Kolodgi FD, Gold HK, Virmani R (2007) Pioglitazone Inhibits In-Stent Restenosis in Atherosclerotic Rabbits by Targeting Transforming Growth Factor- $\beta$  and MCP-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:182–189
- [232] Pakala R, Dilcher C, Baffour R, Hellenga D, Seabron R, Joner M, Kolodgie F, Virmani R, Waksman R (2006) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Ligand Pioglitazone Alters Neointimal Composition in a Balloon-Denuded and Radiated Hypercholesterolemic Rabbit 48:299–305
- [233] Kasai T, Miyauchi K, Yokoyama T, Kajimoto K, Sumiyoshi K, Kubota N, Ikeda E, Daida H (2008) Pioglitazone attenuates neointimal thickening via suppression of the early inflammatory response in a porcine coronary after stenting. *Atherosclerosis* 197:612–619
- [234] Wang CH, Ciliberti N, Li SH, Szmitko PE, Weisel, Fedak PWM, Al-Omran M, Cherng WJ, Li RK, Stanford WL, Verma S (2004) Rosiglitazone Facilitates Angiogenic Progenitor Cell Differentiation Toward Endothelial Lineage. *Circulation* 109:1392–1400
- [235] Bodary PF, Vargas FB, King S a. D, Jongeward KL, Wickenheiser KJ, Eitzman DT (2005) Pioglitazone protects against thrombosis in a mouse model of obesity and insulin resistance. *J Thromb Haemost* 3:2149–2153
- [236] Li D, Chen K, Sinha N, Zhang X, Wang Y, Sinha AK, Romeo F, Mehta JL (2005) The effects of PPAR- $\gamma$  ligand pioglitazone on platelet aggregation and arterial thrombus formation. *Cardiovasc Res* 65:907–912
- [237] Kanehara H, Tohda G, Oida K, Suzuki J, Ishii H, Miyamori I (2002) Thrombomodulin expression by THP-1 but not by vascular endothelial cells is upregulated by pioglitazone. *Thromb Res* 108:227–234
- [238] Aizawa Y, Kawabe JI, Hasebe N, Takehara N, Kikuchi K (2001) Pioglitazone Enhances Cytokine-Induced Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells and Reduces Intimal Hyperplasia. *Circulation* 104:455–460
- [239] Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefèbvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, et al. (2005) Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *The Lancet* 366:1279–1289
- [240] Touboul PJ, Elbaz A, Koller C, Lucas C, Adraï, Chédru F, Amarenco P (2000) Common Carotid Artery Intima-Media Thickness and Brain Infarction. *Circulation* 102:313–318
- [241] Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE (1997) Common Carotid Intima-Media Thickness and Risk of Stroke and Myocardial Infarction: The Rotterdam Study. *Circulation* 96:1432–1437
- [242] Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL (1997) Lipid Oxidation Products Have Opposite Effects on Calcifying

- Vascular Cell and Bone Cell Differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:680–687
- [243] Assmann A, Zwirnmann K, Heidelberg F, Schiffer F, Horstkötter K, Munakata H, Gremse F, Barth M, Lichtenberg A, Akhyari P (2014) The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model. *Biomaterials* 35:7416–7428
- [244] Munakata H, Assmann A, Poudel-Bochmann B, Horstkötter K, Kamiya H, Okita Y, Lichtenberg A, Akhyari P (2013) Aortic Conduit Valve Model With Controlled Moderate Aortic Regurgitation in Rats. *Circ J* 77:2295–2302
- [245] Assmann A, Zwirnmann K, Heidelberg F, Schiffer F, Horstkötter K, Munakata H, Gremse F, Barth M, Lichtenberg A, Akhyari P (2014) The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model. *Biomaterials* 35:7416–7428
- [246] Assmann A, Akhyari P, Delfs C, Flögel U, Jacoby C, Kamiya H, Lichtenberg A (2012) Development of a Growing Rat Model for the In Vivo Assessment of Engineered Aortic Conduits. *J Surg Res* 176:367–375
- [247] Wissozky N (1877) Ueber das Eosin als Reagens auf Hämoglobin und die Bildung von Blutgefäßen und Blutkörperchen bei Säugethier- und Hühnerembryonen. *Arch Für Mikrosk Anat* 13:479–496
- [248] Lang G (2013) *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. Springer-Verlag: Wien, New York, 2. Aufl.
- [249] von Kóssa J (1901) Ueber die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. *Beitr Zur Pathol Anat Zur Allg Pathol* 2
- [250] Dahl LK (1952) A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc Soc Exp Biol Med* 80:474–479
- [251] Movat HZ (1955) Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol* 60:289–295
- [252] Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P (2009) Globally Optimal Stitching of Tiled 3D Microscopic Image Acquisitions. *Bioinforma Oxf Engl* 25:1463–1465
- [253] Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M (2005) Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* 96:488–500
- [254] Shimo T, Gentili C, Iwamoto M, Wu C, Koyama E, Pacifici M (2004) Indian hedgehog and syndecans-3 coregulate chondrocyte proliferation and function during chick limb skeletogenesis. *Dev Dyn* 229:607–617
- [255] Saunders GC, Parkes HC (1999) *Analytical Molecular Biology: Quality and Validation*. Royal Society of Chemistry: Cambridge
- [256] Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25:402–408
- [257] Assmann AK, Goschmer D, Sugimura Y, Chekhoeva A, Barth M, Assmann A, Lichtenberg A, Akhyari P (2021) A Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists in Counteracting the Degeneration of Cardiovascular Grafts. *J Cardiovasc Pharmacol* 79:e103–e115
- [258] Callister TQ, Raggi P, Cooil B, Lippolis NJ, Russo DJ (1998) Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on coronary artery disease as assessed by electron-beam computed tomography. *N Engl J Med* 339:1972–1978
- [259] Prasad GR (2014) Metabolic syndrome and chronic kidney disease: Current status and future directions. *World J Nephrol* 3:210
- [260] Rong S, Qiu X, Jin X, Shang M, Huang Y, Tang Z, Yuan W (2018) Risk factors for heart valve calcification in chronic kidney disease. *Medicine (Baltimore)* 97:e9804
- [261] Cavallero C, Turolla E, Ricevuti G (1971) Cell proliferation in the atherosclerotic plaques of cholesterol-fed rabbits: Part 1. Colchicine and [3H]thymidine studies. *Atherosclerosis* 13:9–20

- [262] Walker LN, Reidy MA, Bowyer DE (1986) Morphology and cell kinetics of fatty streak lesion formation in the hypercholesterolemic rabbit. *Am J Pathol* 125:450–459
- [263] McMillan GC, Stary HC (1968) Preliminary Experience with Mitotic Activity of Cellular Elements in the Atherosclerotic Plaques of Cholesterol-Fed Rabbits Studied by Labeling with Tritiated Thymidine. *Ann N Y Acad Sci* 149:699–709
- [264] Spraragen Sanford C., Bond Victor P., Dahl Lewis K. (1962) Role of Hyperplasia in Vascular Lesions of Cholesterol-fed Rabbits Studied with Thymidine-H3 Autoradiography. *Circ Res* 11:329–336
- [265] Assmann AK, Winnicki V, Sugimura Y, Chekhoeva A, Barth M, Assmann A, Lichtenberg A, Akhyari P (2023) Impact of PPAR-gamma activation on the durability of biological heart valve prostheses in hypercholesterolaemic rats. *Eur J Cardiothorac Surg* 63:ezad005
- [266] Mohler ER (2000) Are atherosclerotic processes involved in aortic-valve calcification? *The Lancet* 356:524–525
- [267] Cheng L, Zhang L, Yang J, Hao L (2017) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  inhibits vascular calcification by upregulating Klotho. *Exp Ther Med* 13:467–474
- [268] Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T (2003) Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. *Circulation* 107:2181–2184
- [269] Mohler ER, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, Gannon FH (1999) Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis* 8:254–260
- [270] Dhore CR, Cleutjens JPM, Lutgens E, Cleutjens KBJM, Geusens PPM, Kitslaar PJEHM, Tordoir JHM, Spronk HMH, Vermeer C, Daemen MJAP (2001) Differential Expression of Bone Matrix Regulatory Proteins in Human Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1998–2003
- [271] Demer LL, Watson KE, Boström K (1994) Mechanism of calcification in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 4:45–49
- [272] Al-Aly Z, Shao J-S, Lai C-F, Huang E, Cai J, Behrmann A, Cheng S-L, Towler DA (2007) Aortic Msx2-Wnt Calcification Cascade Is Regulated by TNF- $\alpha$ -Dependent Signals in Diabetic Ldlr $^{-/-}$  Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2589–2596
- [273] Li X, Yang H-Y, Giachelli CM (2008) BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 199:271–277
- [274] Xu F, Dong Y, Huang X, Chen P, Guo F, Chen A, Huang S (2016) Pioglitazone affects the OPG/RANKL/RANK system and increase osteoclastogenesis. *Mol Med Rep* 14:2289–2296
- [275] Katahira S, Sugimura Y, Grupp S, Doepp R, Selig JI, Barth M, Lichtenberg A, Akhyari P (2021) PPAR-Gamma Activation May Inhibit the In Vivo Degeneration of Bioprosthetic Aortic and Aortic Valve Grafts under Diabetic Conditions. *Int J Mol Sci* 22:11081
- [276] Gao M, Chen T, Wu L, Zhao X, Mao H, Xing C (2017) Effect of pioglitazone on the calcification of rat vascular smooth muscle cells through the downregulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Mol Med Rep* 16:6208–6213
- [277] Drew AF, Tipping PG (1995) Cyclosporine treatment reduces early atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* 116:181–189
- [278] Foryst-Ludwig A, Hartge M, Clemenz M, Sprang C, Heß K, Marx N, Unger T, Kintscher U (2010) PPARgamma activation attenuates T-lymphocyte-dependent inflammation of adipose tissue and development of insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc Diabetol* 9:64

- [279] Spagnoli LG, Orlandi A, Santeusanio G (1991) Foam cells of the rabbit atherosclerotic plaque arrested in metaphase by colchicine show a macrophage phenotype. *Atherosclerosis* 88:87–92
- [280] Lamharzi N, Renard CB, Kramer F, Pennathur S, Heinecke JW, Chait A, Bornfeldt KE (2004) Hyperlipidemia in Concert With Hyperglycemia Stimulates the Proliferation of Macrophages in Atherosclerotic Lesions: Potential Role of Glucose-Oxidized LDL. *Diabetes* 53:3217–3225
- [281] Rosenfeld ME, Ross R (1990) Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 10:680–687
- [282] Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Nepper M, Przysiecki C, Shaw A, Migheli A, Stern D (1993) Survey of the Distribution of a Newly Characterized Receptor for Advanced Glycation End Products in Tissues. *Am J Pathol* 143:1699–1712
- [283] Hofmann Bowman MA, Gawdzik J, Bukhari U, Husain AN, Toth PT, Kim G, Earley J, McNally EM (2011) S100A12 in Vascular Smooth Muscle Accelerates Vascular Calcification in Apolipoprotein E–Null Mice by Activating an Osteogenic Gene Regulatory Program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:337–344
- [284] Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth P (2004) RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect* 6:1219–1225
- [285] Lin L, Park S, Lakatta EG (2009) RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front Biosci* 14:1403–1413
- [286] Lin L (2006) RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol* 3:351–358
- [287] Soro-Paavonen A, Watson AMD, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, et al. (2008) Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Deficiency Attenuates the Development of Atherosclerosis in Diabetes. *Diabetes* 57:2461–2469
- [288] Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kojima Y, Honjo T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ishibashi S, Hirata K, Hayashi Y (2009) RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res* 82:371–381
- [289] Lu Y, Qin W, Shen T, Dou L, Man Y, Wang S, Xiao C, Li J (2011) The Antioxidant N-Acetylcysteine Promotes Atherosclerotic Plaque Stabilization Through Suppression of RAGE, MMPs and NF- $\kappa$ B in ApoE-Deficient Mice. *J Atheroscler Thromb* 18:998–1008
- [290] Ihm SH, Chang K, Kim HY, Baek SH, Youn HJ, Seung KB, Kim JH (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation attenuates cardiac fibrosis in type 2 diabetic rats: the effect of rosiglitazone on myocardial expression of receptor for advanced glycation end products and of connective tissue growth factor. *Basic Res Cardiol* 105:399–407
- [291] Wang K, Zhou Z, Zhang M, Fan L, Forudi F, Zhou X, Qu W, Lincoff AM, Schmidt AM, Topol EJ, Penn MS (2006) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Down-Regulates Receptor for Advanced Glycation End Products and Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation in a Diabetic and Nondiabetic Rat Carotid Artery Injury Model. *J Pharmacol Exp Ther* 317:37–43
- [292] Marx N, Walcher D, Ivanova N, Rautzenberg K, Jung A, Friedl R, Hombach V, Caterina R de, Basta G, Wautier MP, Wautiers JL (2004) Thiazolidinediones Reduce Endothelial Expression of Receptors for Advanced Glycation End Products. *Diabetes* 53:2662–2668