

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

*„Effekte der PPAR γ -Aktivierung auf die in vivo Degeneration von Aorten-Allografts in
einem Rattenmodell der chronischen Niereninsuffizienz“*

Dissertation

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

Vorgelegt von
Robin Maurice Döpp
2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

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

Widmung

Für meine Familie. Ohne eure Unterstützung wäre ich heute nicht dort, wo ich bin – und noch viel mehr: nicht der, der ich bin.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Shintaro Katahira, Mareike Barth, Robin Döpp, Yukiharu Sugimura, Vera Schmidt, Jessica Isabel Selig, Yoshikatsu Saiki, Joachim Jankowski, Nikolaus Marx, Willi Jahnen-Dechent, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari. *Pioglitazone treatment mitigates cardiovascular bioprosthetic degeneration in a chronic kidney disease model. Front Pharmacol.* 2024;15:1412169. Published 2024 Aug 8. doi:10.3389/fphar.2024.1412169

I Zusammenfassung

Die Degeneration von bioprothetischem Material wie Allografts stellt eine bedeutende Herausforderung in der modernen Medizin dar. Patienten, die einen solchen Eingriff benötigen, leiden häufig an multiplen Komorbiditäten. Zu den zentralen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen zählen neben dem arteriellen Hypertonus, Dyslipidämien und Diabetes mellitus auch die chronische Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease* – CKD). Die CKD ist oftmals mit einem beschleunigten Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen verbunden; häufige Todesursachen sind kardiovaskuläre Ereignisse wie Schlaganfall, Myokardinfarkt oder das Aortensyndrom. Die genannten Risikofaktoren sind zudem eng mit der frühzeitigen Degeneration von Aortengrafts assoziiert.

Wir untersuchten die Rolle der CKD bei der Degeneration von allogenen transplantierten Aortengrafts (Allografts) in einem etablierten Rattenmodell sowie potenzielle protektive Effekte von Pioglitazon. Ziel war eine Verlängerung der Haltbarkeit bioprothetischer Aortengrafts. Pioglitazon ist ein Aktivator des *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ), der bekannt ist für seine kardioprotektiven und renoprotektiven Eigenschaften. Neben seinem Einsatz in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2, werden auch anti-degenerative Effekte beschrieben.

Es wurde männlichen Ratten ein infrarenales Aorten-Allograft implantiert. Die Gruppen wurden nach vier und acht Wochen untersucht und jeweils in drei Gruppen unterteilt: 1) Kontrollgruppe mit Standardfutter, 2) CKD-Gruppe mit 0,25 % Adenin im Futter, 3) CKD-Gruppe mit 0,25 % Adenin und 300 mg/kg Pioglitazon im Futter. Es wurden Plasmaanalysen, semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*semi quantitative polymerase-chain reaction*, qPCR), histologische und immunhistochemische Färbungen und ELISA-Untersuchungen durchgeführt.

Die Behandlung mit Pioglitazon führte hier zu einer signifikanten Reduktion der Intimahyperplasie, geringeren Gefäßverkalkungen sowie niedrigeren Kalium- und Phosphatspiegeln im Plasma. Zusätzlich konnte eine verminderte Expression von Interleukin-6 im Aortenkonduit nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pioglitazon die Degeneration von Aortengrafts im Kontext einer CKD günstig beeinflussen kann. Somit stellt Pioglitazon eine potenzielle therapeutische Option zur Verbesserung der Langzeitfunktion von Gefäßtransplantaten bei CKD-Patienten dar.

II Abstract

The degeneration of valuable allografts or other bioprosthetic materials presents a significant challenge in modern medicine. Patients requiring such interventions often exhibit multiple comorbidities. Major drivers of cardiovascular disease include arterial hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, and chronic kidney disease (CKD). CKD patients are particularly prone to rapid progression of cardiovascular pathology, with cardiovascular events such as stroke, myocardial infarction, or acute aortic syndromes being among the leading causes of death in this population. Notably, the mentioned risk factors are also well-established triggers of calcifying processes and are associated with premature degeneration of aortic grafts.

This study specifically focuses on the impact of chronic kidney disease in a rat model. Pioglitazone, a known activator of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma, has demonstrated both cardioprotective and renoprotective effects. While traditionally used in the treatment of type 2 diabetes mellitus, recent evidence suggests that pioglitazone also possesses anti-degenerative properties. The aim of this study was to explore anti-degenerative effects in detail and to investigate relevant molecular pathways, with the long-term goal of identifying potential therapeutic strategies to prolong graft durability.

In the experimental setup, rats received infrarenal implantation of an allogenic transplanted aortic graft and were analyzed after four and eight weeks post-operation. Animals were divided into three groups: (1) control group with standard diet; (2) CKD group receiving 0.25% adenine-enriched diet; (3) CKD group receiving 0.25% adenine and pioglitazone at 300 mg/kg feed. Analyses included plasma assessments, semi-quantitative polymerase chain reaction (qPCR) of graft tissue, histological and immunohistochemical staining and quantification, as well as ELISA assays.

Treatment with pioglitazone resulted in a reduction of intimal hyperplasia, decreased calcification, and lower plasma potassium and phosphate levels. Additionally, interleukin-6 expression within the aortic grafts was notably reduced. These findings contribute to a better understanding of relevant signaling pathways involved in graft degeneration and suggest that pioglitazone may serve as a promising therapeutic option to enhance the longevity of vascular allografts in patients with CKD.

III Abkürzungsverzeichnis

18S	Ribosomale Ribonukleinsäure 18S
A.	Arteria
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase-Signalwegs
β-Aktin	Beta Aktin
BMI	<i>Body mass index</i>
BMP-2	Knochenmorphogenes Proteine 2 (<i>bone morphogenetic protein 2</i>)
CAVD	Kalzifizierende Aortenklappenerkrankung <i>calcific aortic valve disease</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat (<i>cyclic Gunosine Monophosphate</i>)
CKD	Chronische Niereninsuffizienz (<i>chronic kidney disease</i>)
COX-2	Cyclooxygenase-2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EACTS	<i>European association for cardio-thoracic surgery</i>
eNOS	Endotheliale Stickoxid (NO)-Synthase
ESC	<i>European society of cardiology</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLP-1	<i>Glucagone-like peptid 1</i>
GOT	Glutatmat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL-1β/6	Interleukin-1β/6
KDIGO	<i>Kidney disease improving global outcome</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
OCN	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)

PEW	<i>Protein-Energy-Wastings</i>
PIT-1	Hypophysenspezifischer positiver Transkriptionsfaktor 1 (<i>Pituitary-specific positive transcription factor 1</i>)
qPCR	Semi-quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (<i>semi-quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
RAGE	Rezeptor für Endprodukte der fortgeschrittenen Glykation (Receptor for advanced glycation endproducts)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPL13a	Ribosomales Protein L13a (<i>ribosomal protein L13a</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RUN-X2	Runt-bezogener Transkriptionsfaktor 2 (<i>Runt-related transcription factor 2</i>)
sdLDL	<i>Small, dense LDL</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
SGLT	Natrium-Glukose Co-Transporter (<i>Sodium-Glucose Cotransporter</i>)
TAVI	Transkatheter-Aortenklappenimplantation (<i>transcatheter aortic valve implantation</i>)
TB-Puffer	Tris-Base-Puffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)

IV Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Kalzifizierende Aortenklappenerkrankung.....	1
1.1.1	Therapieoptionen der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung	2
1.1.2	Limitationen der bioprothetischen Therapieoptionen.....	3
1.2	Chronische Niereninsuffizienz	3
1.2.1	Einfluss der chronischen Niereninsuffizienz auf die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung	4
1.2.2	Tiermodell der chronischen Niereninsuffizienz in der Ratte.....	4
1.3	Pioglitazon als <i>peroxisome-proliferator-activated receptor</i> γ -Aktivator.....	5
1.3.1	PPAR γ -Aktivierung in Bezug auf kalzifizierende Aortenklappenerkrankung sowie auf die Degeneration von Bioprothesen	6
1.4	Ziel der Arbeit.....	7
2	Materialien	8
2.1	Laborgeräte	8
2.2	Software	8
2.3	Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien.....	9
2.4	Organismen	10
3	Methoden	11
3.1	Versuchsaufbau.....	11
3.1.1	Kryokonservierung von Aortenkonduits	11
3.1.2	Induktion einer Aorteninsuffizienz und Implantation der Konduits.....	11
3.1.3	Explantation	12
3.2	Blutprobenanalyse	13
3.2.1	Adiponektin-ELISA.....	13
3.3	Histologie und Immunhistochemie	13
3.3.1	Anfertigung von Gewebeschnitten	13
3.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	14
3.3.3	Von-Kossa-Färbung.....	14
3.3.4	Alizarin-Rot-S-Färbung	15
3.3.5	DAB-RAGE-Färbung	15
3.3.6	Anfertigung von fotomikroskopischen Bildern	16
3.4	Semi-quantitative <i>real-time</i> PCR (<i>real-time</i> qPCR).....	16
3.4.1	RNA-Isolation aus kryokonservierten Aortenkonduits	16
3.4.2	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der isolierten RNA	17
3.4.3	Umschreiben der RNA zu cDNA	17

3.4.4	Expressionsanalyse mittels <i>real-time</i> qPCR	17
3.4.5	Primersequenzen	17
3.5	Statistische Analysen und grafische Aufarbeitung mittels GraphPad Prism ..	18
4	Ergebnisse	18
4.1	Gewichtsdokumentation, Nierenfunktion und Blutanalysen	18
4.1.1	Gewichtsdokumentation	18
4.1.2	Induktion der Niereninsuffizienz	19
4.1.3	Laborchemische Veränderungen im Blutplasma	21
4.1.4	Veränderungen des Adiponektinstoffwechsels	24
4.2	Histomorphologische und molekularbiologische Gewebsveränderungen	25
4.2.1	Intimahyperplasie im Rahmen proliferativer Prozesse	25
4.2.2	Nachweis von Mineralisierungsprozessen im Konduitgewebe	27
4.2.3	RAGE assoziierte Inflammation	30
4.2.4	Veränderungen inflammatorischer Genexpression	32
4.2.5	Veränderungen chondro-osteogener Genexpression	32
5	Diskussion	33
5.1	Rattenmodell der chronischen Niereninsuffizienz mit Aortenkonduit	33
5.1.1	Modellvalidierung, Transfermöglichkeit, Limitierungen	33
5.1.2	Metabolische Effekte von Pioglitazon im Modell der chronischen Niereninsuffizienz	35
5.1.3	Einfluss des Pioglitazons auf den Adiponektinstoffwechsel	36
5.2	Modulierung des Aortenkonduits	38
5.2.1	<i>Early-Onset</i> -Inflammation	38
5.2.2	Pioglitazons Einfluss auf weitere inflammatorische Parameter	38
5.2.3	Wirkung auf chondro-osteogene Prozesse	39
5.2.4	Hemmung kalzifizierender proliferativer Prozesse am Aortenkonduit ..	39
5.3	Ausblick auf weitere Forschung	40
6	Anhang	49

1 Einleitung

1.1 Kalzifizierende Aortenklappenerkrankung

Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (*calcific aortic valve disease, CAVD*) ist eine weltweit häufig vorkommende Erkrankung der Herzklappen, die insbesondere die ältere Bevölkerung betrifft. In Industrienationen tritt CAVD besonders häufig auf. Im Jahr 2019 wurden weltweit 9,4 Millionen Fälle dokumentiert; zwischen 1990 und 2019 stieg die globale Prävalenz um 138 %. Die Mortalität lag im Jahr 2017 bei 102700 [1-3]. Die Pathophysiologie der CAVD ist multifaktoriell. Erhöhter mechanischer Stress, beispielsweise infolge einer arteriellen Hypertonie, kann zu einer Freisetzung verschiedener modulierender Faktoren führen. Hierzu zählen Zytokine, inflammatorische sowie osteo- und chondrogene Transkriptionsfaktoren und zelluläre Komponenten, die gemeinsam über fibrotisch-kalzifizierende Umbauprozesse zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen. Neben mechanischem Stress beeinflussen auch Alter, Geschlecht und Komorbiditäten maßgeblich die Entstehung der CAVD [4, 5]. Insbesondere inflammatorische und immunmodulierende Faktoren spielen eine zentrale Rolle in der Krankheitsgenese [6, 7].

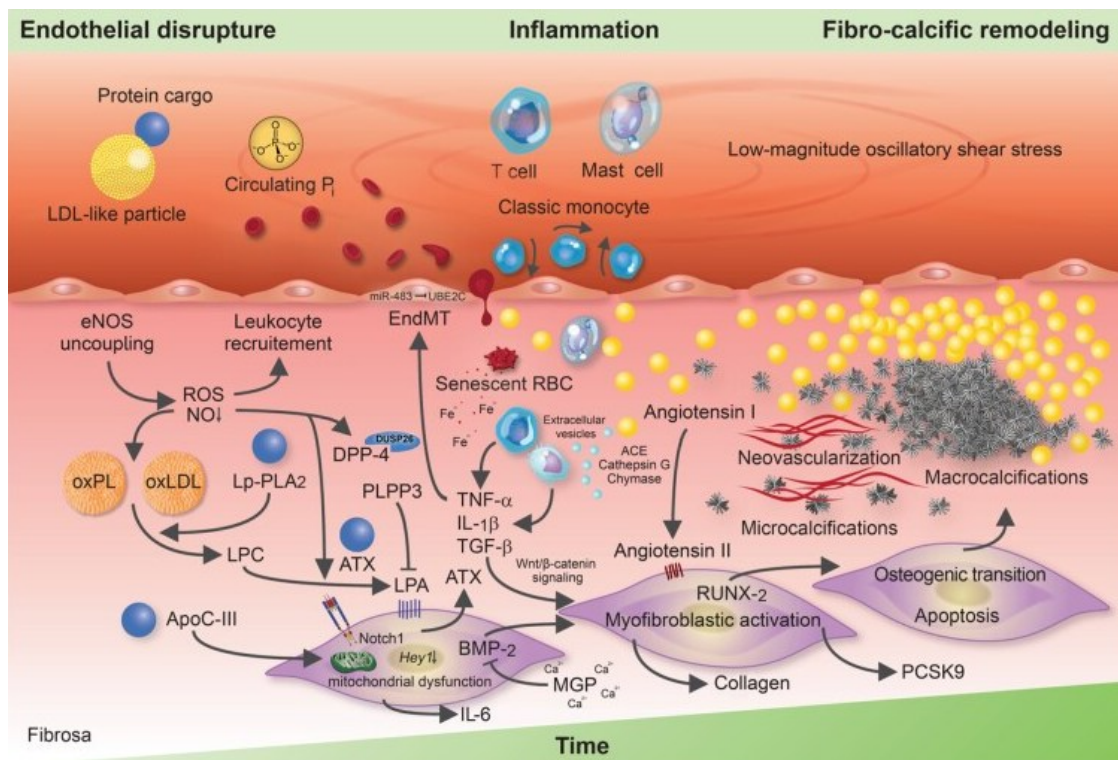


Abbildung 1: Die Pathophysiologie der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (*calcific aortic valve disease* – CAVD) ist multifaktoriell und komplex. Mechanischer Stress führt zur vermehrten Freisetzung

von Zytokinen. In Kombination mit erhöhten LDL-Spiegeln und zellulärer Migration von Immunzellen wie z.B. Makrophagen, kommt es im Verlauf zur fulminanten Ausprägung von zuerst Mikro-Kalzifikationen und schließlich von Makro-Kalzifikationen. Die Ausbildung von Makro-Kalzifikationen führt anschließend zum Endstadium der CAVD. Abbildung im Original übernommen aus [4] Abkürzungen: CAVD – *calcific aortic valve disease*; LDL – *low density lipoprotein*.

Während die Erkrankung lange Zeit asymptomatisch bleiben kann, so zeigen sich im symptomatischen Stadium der Krankheit typische Symptome wie Dyspnoe, körperliche Schwäche und Synkopen sowie Thoraxschmerzen. Weiterhin traten Komorbiditäten wie Vorhofflimmern, chronische Lungenschädigung und pulmonale Hypertension sowie CKD auf [8]. Ist die CAVD diagnostiziert, so stellt sich bei symptomatischen Patienten nach den ESC/EACTS (*European society of cardiology/European association for cardiothoracic surgery*) Leitlinien die Indikation für einen Klappenersatz [9]. Ohne Therapie, steigt die Mortalität in diesem Stadium auf 50 – 70 % [10]. Wirksame medikamentöse Therapieoptionen gibt es bisher nicht.

1.1.1 Therapieoptionen der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung

Die Therapieoptionen der CAVD hängen von spezifischen Faktoren ab. Nach wie vor ist der Klappenersatz das Verfahren der ersten Wahl. Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten. Neben der klassischen Operation mit chirurgischem Ersatzverfahren in Form einer mechanischen oder biologischen Prothese, gibt es heute unter anderem kathetergestützte Verfahren. Unterschieden wird grundsätzlich zwischen einem chirurgischen und einem interventionellen Verfahren. Die chirurgischen Klappenersatzverfahren umfassen mechanische Klappensysteme sowie biologische Klappensysteme. Die mechanischen Systeme profitieren von ihrer Langlebigkeit, was insbesondere bei einem jungen Alter der Patienten von Vorteil ist. Der Einsatz einer mechanischen Aortenklappe verlangt jedoch eine lebenslange Antikoagulation mit z.B. Marcumar als Vitamin-K-Antagonist. Biologische Systeme bedürfen dieser streng zu überwachenden Antikoagulation nicht, sind jedoch stärker degenerativen Prozessen ausgesetzt als mechanische Klappen [9]. Die Degeneration der biologischen Aortenklappen sowie mögliche Therapieansätze sollen im Fokus dieser Arbeit stehen.

1.1.2 Limitationen der bioprothetischen Therapieoptionen

Die fortschreitende Degeneration des bioprothetischen Materials kann im Verlauf zu einer Dysfunktion der Prothese führen, die anschließend häufig ersetzt werden muss [11, 12]. Somit kann die lange Haltbarkeit einer solchen Klappe bisher nicht gewährleistet werden. Dies ist der Grund warum bei jungen Patienten häufig das mechanische Ersatzverfahren bevorzugt wird. Probleme der biologischen Klappen die in diesem Kontext entstehen sind unter anderem entstehende Aortenklappenstenosen (40 %), Aortenklappeninsuffizienzen (30 %) oder die Kombination beider (30 %) [13]. Die einzige Option, diese Klappendegeneration biologischer Klappen zu therapieren, ist das erneute chirurgische Ersatzverfahren. Die postoperative Mortalität dieser Re-Operationen lag zwischen 3 % und 23 %, welche in den letzten Jahren jedoch erheblich abgenommen hat [14, 15]. Es gibt verschiedene Risikofaktoren, die eine erneute Degeneration begünstigen. Hierzu zählen ebenso das Alter des Patienten, kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, der *body mass index* (BMI) sowie Komorbiditäten wie Diabetes mellitus, Dyslipidämie oder die CKD [16]. Weiterhin begünstigen eine persistierende linksventrikuläre Hypertrophie sowie die Prothesengröße und ein eventuell vorkommender Prothesen-Patienten-Mismatch die Entstehung von Degenerationen [17]. Eine Observationsstudie zeigte, dass Bioprothesendegeneration signifikant assoziiert ist mit Serum-Kreatinin-Werten $>2,1$ mg/dL und Hypertension [16].

1.2 Chronische Niereninsuffizienz

Die CKD ist beim Menschen laut KDIGO (*kidney disease improving global outcome*) Leitlinie definiert als eine über drei Monate andauernde abnorme Funktionsstörung der Nieren, welche mit gesundheitlichen Folgen einhergeht [18]. Die CKD wird nach der Ursache und nach der glomerulären Filtrationsrate (GFR) in fünf Stadien eingeteilt, wobei das Stadium G3 in G3a und G3b aufgeteilt wird. Im Stadium G1 beträgt die GFR $[\text{ml/min/1,73 m}^2] \geq 90$, G2 – 60-89, G3a 45-59, G3b, 30-44, G4 15-29, G5 < 15 . Weiterhin spielt die Albuminurie eine wichtige Rolle zur Risikostratifizierung der CKD. Hierbei wird zum G-Stadium noch das A1-Stadium mit einer Albuminurie von < 30 mg/g, A2 – 30 – 300 mg/g, A3 – > 300 mg/g hinzugefügt. Somit ergibt sich eine Spannweite einer milden CKD im Stadium G1 A1 bis G5 A3 [18]. Die globale Prävalenz der CKD liegt bei ca. 13,4 % [19]. Risikofaktoren, die die Entstehung einer CKD fördern sind ein hohes Alter, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie [19]. Insbesondere im GFR-Bereich unter 60 ml/min/1,73 m² steigt das kardiovaskuläre Risiko von CKD-

Patienten exponentiell an, sodass eine frühzeitige Diagnose entscheidend ist [20, 21]. Die Therapie und das Management der CKD ist besonders schwierig. Eine Kausaltherapie gibt es neben der Nierentransplantation bisher nicht. Insofern gilt es die Progression der CKD zu verhindern und das kardiovaskuläre Risiko zu reduzieren. Dies sollte unter anderem *low-to moderate-dose* Statine, Nikotinkarenz, strenge Hypertonieeinstellung, HbA1c-Einstellung und das Vermeiden von nephrotoxischen Risikofaktoren beinhalten [22]. Außerdem gilt es die Dosisanpassung verschiedener Medikamente zur entsprechenden Nierenfunktion zu beachten.

1.2.1 Einfluss der chronischen Niereninsuffizienz auf die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung

Viele Studien konnten zeigen, dass mit dem Vorhandensein einer CKD ein erhöhtes Risiko für eine CAVD einhergeht [23-25]. Die Ursache hierfür liegt vermutlich im gestörten Metabolismus, was insbesondere Mineralien wie Kalzium betrifft [24]. Ebenso spielen Phosphat, erhöhte Parathormonspiegel, Veränderungen des Vitamin D Metabolismus, fibrogene sowie osteogene Wachstumsfaktoren eine große Rolle in der Entstehung von Kalkablagerung [26]. Eine Beeinflussung der Progression der CAVD mithilfe von Statinen konnte in einer großen randomisierten prospektiven Studie mit 1873 Patienten nicht gezeigt werden [27]. Aufgrund der Senkung des kardiovaskulären Risikos sollten sie dennoch bei Patienten mit CKD eingesetzt werden [23]. Es wird angenommen, dass im Endstadium der CKD mit der Notwendigkeit von Nierenersatzverfahren Faktoren wie eine renale Anämie, arteriovenöse Shunts und Hyperhydration das Herz-Zeit-Volumen erhöhen, was wiederum zu einem erhöhten Stress an der Aortenklappe führt. Dieser vermehrte Stress führt über einen längeren Zeitraum zu kleinen Läsionen mit folgender Mineralisierung der Aortenklappe [28].

1.2.2 Tiermodell der chronischen Niereninsuffizienz in der Ratte

Die Zusammenhänge der CKD mit der CAVD und den Progress der Degeneration nach einer bereits erfolgten Klappenrekonstruktion bedarf weiterhin tiefergehender Forschung. Um eine Annäherung der klinischen und molekularen Zusammenhänge zu schaffen, gibt es einige Modelle an Nagetieren, die die CKD simulieren. Ein häufig verwendetes Modell ist das der 5/6-Nephrektomie [29, 30]. Die systemischen Verhältnisse der Tiere kommen denen des Menschen sehr nah [31]. Das größte Problem dieses Verfahrens ist die

aufwändige Operation mit einer hohen Mortalität von ca. 40 % [29]. Ein weiteres Verfahren zur Induktion einer Niereninsuffizienz sieht eine Substitution von 0,75 % Adenin vor. Hierbei kommt es jedoch binnen vier Wochen zu einem erheblichen Progress der Nierenschädigung, was eher einem akuten Nierenversagen als einer CKD ähnelt [32]. Das Adenin wird als Purinbase von der Xanthinoxidase zur Harnsäure abgebaut. Erhöhte Harnsäurespiegel führen zu einem erhöhten Risiko für eine CKD und kardiovaskulärem Risiko. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es zur Ablagerung von Adeninkristallen in den Nieren gekommen ist. Da dieses Modell keiner komplexen Operation bedarf, wurden verschiedene Konzentrationen des Adenins getestet, um einen chronischen Progress zu imitieren. Hierbei stellte sich eine Konzentration von 0,25 % Adenin im Futter der Ratten als die vergleichbarste heraus. In diesem Modell kam es zu einer Erhöhung von Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin und einer Proteinurie. Die Intensität der Progression verlief moderat ab. Im Bereich der Nieren kam es zu tubulären und glomerulären Schäden sowie interstitieller Fibrosierung und Inflammation. Ebenfalls konnte in diesem Modell auch ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, wie es auch beim Menschen mit CKD vorhanden ist, gezeigt werden [33].

1.3 Pioglitazon als *peroxisome-proliferator-activated receptor* γ -Aktivator

Pioglitazon gehört zur Gruppe der Glitazone, auch Thiazolidindione genannt. Es wird vor allem in der Behandlung des Diabetes mellitus zur Senkung des Glukosespiegels verwendet, indem es als *Insulin-sensitizer* bei Typ 2 Diabetes wirkt. Thiazolidindione entfalten verschiedene Effekte auf den Organismus. Unter anderem wird neben der Erhöhung der Insulinsensitivität, eine Erhöhung des subkutanen Fettgewebes, Verbesserung der Dyslipidämien, blutdrucksenkende Eigenschaften, Verminderung der Intimaproliferation nach Stentimplantation bei Koronarinterventionen, verminderte CRP-Plasmaspiegel, Reduktion des HbA1c, sowie eine verbesserte beta-Zell-Funktion beobachtet (zusammengefasst in [34-38]). Hierbei stellte man fest, dass es vor allem auch eine kardioprotektive Wirkung hat. Die prospektive PROactive Studie zeigte, dass es bei einer Gabe von Pioglitazon im Vergleich zu einem Placebo zu einer niedrigeren Mortalität und kardiovaskulären Ereignissen kam [39]. Weitere Studien untermauern diese Ergebnisse [40, 41]. Es zeigte sich, dass auch transitorische ischämische Attacken sowie ischämische Schlaganfälle auch bei Patienten mit nachgewiesener Insulinresistenz aber ohne Diabetes mellitus durch die Einnahme von Pioglitazon verhindert werden konnten. Weiterhin reduzierte sich das Risiko eines neu aufgetretenen Diabetes mellitus,

während es verstärkt zu einer Gewichtszunahme, Ödemen und Frakturen kam [42]. Pioglitazon entfaltet seine Wirkung über die Aktivierung des *peroxisome-proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ). PPAR γ ist vor allem in Adipozyten aber auch in Blutgefäßen exprimiert, wo es durch Aktivierung über verschiedene Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Adipozyten sowie die Lipid- und Glukosehomöostase hat. In Blutgefäßen, insbesondere in den Endothelzellen, findet man ebenfalls vermehrte Expression von PPAR γ [38]. Antiarteriosklerotische Effekte durch die Aktivierung von PPAR γ konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden [37, 43, 44]. Weiterhin zeigte sich ein positiver Einfluss von Pioglitazon auf die Mortalität und den Progress bzw. den Verlauf von Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz wie z.B. die Verminderung einer Albuminurie [45-47]. Zu erwähnen sind jedoch auch Bedenken bezüglich der Sicherheit von Pioglitazon. Es zeigte sich eine signifikante Gewichtszunahme [48], die Bildung von Ödemen, insbesondere in Kombination mit Insulin sowie das gehäufte Vorkommen einer Herzinsuffizienz [49]. Außerdem zeigten sich gehäufte Frakturen, insbesondere in Patientengruppen älterer Frauen und vor allem in den distalen oberen- und unteren Extremitäten [50]. Ebenso zeigten sich gehäufte Ereignisse von diabetischen Makulaödemen [51]. Eine erhöhte Inzidenz von Blasenkrebs wurde ebenso über viel Jahre diskutiert. Hier zeigte sich jedoch aufgrund mangelnder, belastbarer Studiendaten kein eindeutiges Bild. Während einige Studien einen Zusammenhang feststellen konnten [39, 52], während andere zu keinem eindeutigen Ergebnis kommen konnten [53]. Vor diesem Hintergrund ist jedoch aufzuführen, dass die richtige Indikationsstellung für die Verwendung von Pioglitazon entscheidend ist. Im Rahmen der allein antidiabetischen Therapie von Pioglitazon sind andere Medikamente teilweise überlegen [54]. Die genaue Auswahl der Patientengruppe ist somit entscheidend. Patientengruppen, wie sie in dieser Arbeit im Rattenmodell dargestellt werden soll, wurden bisher nicht untersucht, sodass eine genauere Analyse notwendig ist.

1.3.1 PPAR γ -Aktivierung in Bezug auf kalzifizierende Aortenklappenerkrankung sowie auf die Degeneration von Bioprothesen

Bis heute gibt es keine alternative Behandlungsstrategie in der Behandlung der CAVD als die Operation/Intervention. In diesem Kontext ist es von Bedeutung, die Haltbarkeit der Bioprothesen möglichst zu verlängern, um eine erneute Operation mit der einhergehenden erhöhten Mortalität zu verhindern [55, 56]. Da die Entstehung der CAVD vor allem über Inflammation hin zur Einwanderung von Makrophagen und

anschließender Kalzifikation entsteht (s.o.), gilt es in diesen Signalkaskaden einzugreifen. Pioglitazon als PPAR γ -Aktivator entfaltet seine Wirkung über die Inhibierung dieser Prozesse. Durch Modulation der Inflammation, Monozyten/Makrophagen, konnte ein antiinflammatorischer und antiarteriosklerotischer Effekt gezeigt werden [37, 43, 44, 57-59]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Pioglitazon die Progression einer CAVD in einem Kaninchenmodell signifikant vermindern konnte. Sowohl echokardiographisch als auch auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon, vermutlich über eine Modulation des *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE), einen positiven Einfluss auf die native Aortenklappe hat [60]. Ein Rattenmodell soll die in vivo Situation einer bioprothetischen Aortenklappe simulieren. Hierfür wurde ein Aorten-Allograft einer Ratte infrarenal an die Aorta abdominalis anastomosiert [61]. In Anlehnung an dieses Modell wurde gezeigt, dass Pioglitazon inflammatorische Prozesse und die Kalzifizierung an dem bioprothetischen Konduit vermindern konnte [62]. Patienten mit CAVD weisen häufig eine Vielzahl von Komorbiditäten wie Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie sowie einer chronischen Niereninsuffizienz auf [63]. So wurde in dem zuvor beschriebenen Rattenmodell unter anderem unter diabetogenen sowie hypercholesterinämischen Bedingungen gezeigt werden, dass die PPAR γ -Aktivierung durch Pioglitazon einen positiven Einfluss hinsichtlich Inflammation und Kalzifikation auf bioprothetische Aorten-Allografts hat [64, 65].

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, weitere Therapiemöglichkeiten zu finden, um die Entstehung der Degeneration von bioprothetischem Material nach einer Implantation in CKD-Patienten zu verhindern oder zu verlangsamen. Besonders der Einfluss von Pioglitazon als PPAR γ -Aktivator spielt hier eine zentrale Rolle. Die Themenfelder der Inflammation und Kalzifizierung von Aorten-Allografts sollen in einem Rattenmodell der chronischen Niereninsuffizienz untersucht werden. Langfristig sollen Schnittstellen für eine geeignete Therapie gefunden werden, um künftig die Langlebigkeit bioprothetischer Klappenersatzverfahren verlängern zu können.

2 Materialien

2.1 Laborgeräte

Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Biometra T3000 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Durchlichtmikroskop Leica DM 2000	Leica Camera AG, Wetzlar, DE
Feinwaage BP 110 S	Sartorius, Göttingen, DE
Heidolph REAX 2000 Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Laser Scanning Mikroskop 710	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Leica CM 1950 Kryostat	Leica Camera AG, Wetzlar, DE
Leica DFC 425 C Mikroskopkamera	Leica Biosystems, Nussloch, DE
Leica DM 2000 Mikroskop	Leica Biosystems, Nussloch, DE
pH Meter	WTW, inoLab, Weilheim, DE
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tecan Infinite M1000 Pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Zentrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, DE

2.2 Software

EndNote 20	Clarivate Analytics, Philadelphia Pennsylvania, USA
GIMP	The GIMP development team
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, San Diego, California, USA
ImageJ Fiji	National Institutes of Health, Maryland, USA
Irfan View	Irfan View, Rostock, DE
Leica Application Suite	Leica Biosystems, Nussloch, DE
Microsoft Excel, Powerpoint, Word	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
StepOnePlus Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.3 Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Albumin Fraction V	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Alizarin Rot S	Carl Roth, Karlsruhe, DE
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
Chlorophorm	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
Dako-Pen	DAKO GmbH, Jena, DE
DAPI	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Deckgläser	Engelbrecht, Erdmünde, DE
Diaminobenzidin (DAB) Substrate Kit	Zytomed, Berlin, DE
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
DNase	Qiagen, Hilden, DE
DTT	Qiagen, Hilden, DE
Einbetttschälchen Kunststoff	Medite, Bursdorf, DE
Eindeckmedium RotiHistokit II	Carl Roth, Karlsruhe, DE
ELISA Kit Adiponectin Rat	R&D Systems, Minneapolis, USA
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
Eosin B	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
Essigsäure 100 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 99,5 %	Zentralapotheke UKD, Düsseldorf, DE
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Wlatham, Massachusetts, USA
Formaldehylösung 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Formalin 4 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glasobjektträger	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen, DE
GoTaqR qPCR Master Mix	Promega, Mannheim, DE
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
HCl 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
Kernechtrot	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
KP-CryoCompund	Klinipath, Duiven, NL
Leica Eindeckmedium	Leica Biosystems, Nussloch, DE
Mayers Hämlaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, DE
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
Nuklease-freies Wasser	Promega, Mannheim, DE
PBS	BioFroxx, Einhausen, DE
QuantiTectR Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, DE
RDD Puffer	Qiagen, Hilden, DE
RNase Away	Carl Roth, Karlsruhe, DE
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trisaminomethan	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
Trizol	Sigma-Aldrich Chemie, München, DE
Tween 20 Detergent	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Xylol	VWR International, Darmstadt, DE

2.4 Organismen

Für die Untersuchungen wurden männliche Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*) verwendet. Hierfür gab es bereits etablierte Modelle zur Induktion der CKD, sodass diese für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen [33]. Wistar-Ratten wurden bereits in früheren Projekten dieser Art verwendet, sodass auf hohe Erfahrungswerte gesetzt werden konnte. Die Tierversuchsgenehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen wurde 2017 für das Projekt: „Einfluss von PPAR γ -Agonisten auf die Degeneration biologischer Prothesen im Kontext RAGE-assoziiierter Erkrankungen“ erteilt (Aktenzeichen 84-02.04.2017.A182).

3 Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Als Spender für die später implantierten Aortenkonduits (AK) dienten 60 Sprague Dawley Ratten. Es gab drei Gruppen mit jeweils zwei Entnahmezeitpunkten. Der erste Zeitpunkt lag nach 4 Wochen mit einer Kontrollgruppe (n = 10) sowie zwei experimentellen Gruppen, bei denen durch eine Futtergabe von 0,25 % Adenin eine CKD induziert wurde. Eine der experimentellen Gruppen erhielt zusätzlich täglich eine Behandlung in Form von 300 mg Pioglitazon pro Kilogramm Futter (CKD + Pio, n = 10), die andere Gruppe lediglich die Futterbeigabe von 0,25 % Adenin (CKD - Pio, n = 10). Der zweite Endpunkt lag bei 8 Wochen. Hier gab es neben der Kontrollgruppe (n = 10) ebenfalls eine CKD + Pio Gruppe (n = 10) sowie CKD - Pio Gruppe (n = 10).

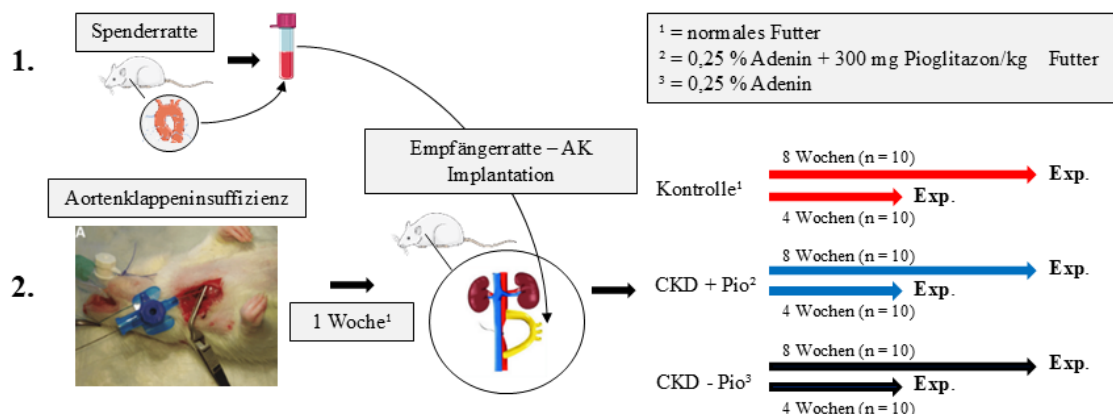


Abbildung 2: Versuchsaufbau mit Ablauf, Gruppeneinteilung und Zeitpunkten. Abkürzungen: AK = Aortenklappe, CKD + Pio = Niereninsuffizienz Tiere mit Pioglitazon, CKD - Pio = Niereninsuffizienz Tiere ohne Pioglitazon, Exp = Explantation.

3.1.1 Kryokonservierung von Aortenkonduits

Die explantierten AK wurden unter der Sterilbank in ein Kryo-Medium bestehend aus 0,7 ml DMEM (4,5 g/l), 1 ml DMSO sowie 2 ml FCS in ein Kryo-Reaktionsgefäß gegeben und durch langsames Abkühlen bei -80 °C bis zur Implantation gelagert.

3.1.2 Induktion einer Aorteninsuffizienz und Implantation der Konduits

Bei der Induktion der Aorteninsuffizienz und Implantation des Konduits handelt es sich um eine etablierte Methode in unserem Forschungslabor [66]. Um ein Öffnen und

Schließen der Aortenklappe des implantierten AK gewährleisten zu können, wurde die native Aortenklappe mechanisch manipuliert, um eine Insuffizienz hervorzurufen. Hierfür wurde unter Allgemeinanästhesie ein Katheter über die *Arteria (A.) carotis dextra* unter sonografischer Sicht bis zur Aortenklappe vorgeschoben und diese perforiert. Eine Woche nach der Induktion der Aortenklappeninsuffizienz wurde das AK implantiert. Unter Allgemeinanästhesie wurde die *Vena jugularis interna* kanüliert, hierüber wurde eine Heparinisierung durchgeführt. Mittels Laparotomie wurde die Aorta abdominalis dargestellt. Die Aorta wurde distal der *A. renalis* abgeklemmt und das AK wurde mittels 10-0 Propylennaht in einer End-Zu-Seit-Naht anastomosiert. Nach der proximalen Anastomose wurde die Aorta noch einmal kurzfristig durchlässig gemacht, bevor sie wieder abgeklemmt wurde. Anschließend erfolgte die distale Anastomose. Die Aorta wurde zwischen den Anastomosen abschließend ligiert, sodass der Blutfluss über das AK gewährleistet war. Alle Ratten wurden innerhalb einer Stunde der Abklemmung operiert.

3.1.3 Explantation

Der Thorax der Tiere wurde unter Anästhesie mittels medianer Laparotomie eröffnet. Es wurde 7,2 ml venöses Blut in mit 0,8 ml Heparin befüllte Aufziehspritzen entnommen. Das Blut wurde in vier Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 4 °C und 1000 rpm über 20 min zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde anschließend bei -80 °C weggefroren und der zelluläre Anteil verworfen. Das Myokard, die absteigende Aorta, die linke und rechte Niere sowie die AK-Regionen A1/A2/B1/B2 (s. Abbildung 3), native Aorta A1/A2/B1/B2 wurden entnommen und entsprechend der Explantationsgruppe entnommen. Für die PCR-Explantationsgruppe (n=6-7 je Gruppe) wurden die Organe in Kryo-Reaktionsgefäße mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bei der Histologie-Explantationsgruppe (n=4 je Gruppe) wurden die Organe in eingebettetem Kryocompound in zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlten Isopropanol eingefroren und bei -80 °C gelagert.

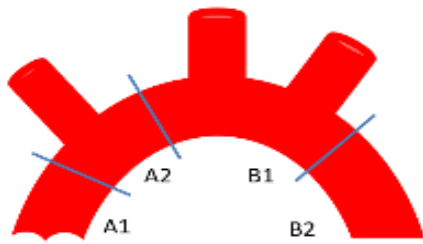


Abbildung 3: Konduitregionen eingeteilt in A1, A2, B1, B2. Die A1 Region entspricht dem Abschnitt von der Aortenklappe bis vor dem Abgang des Truncus brachiocephalicus. A2 ist bis nach dem Abgang des Truncus brachiocephalicus einzuordnen. Abschnitt B1 beinhaltet sowohl den Abgang der Arteria (A.) carotis communis sinistra als auch die A. subclavia sinistra. Der Abschnitte B2 ist ausschließlich der Teil der Aorta descendens ohne einen Abgang bis zum Ende des Aortenkonduits. Abkürzungen: A. – Arteria.

3.2 Blutprobenanalyse

Bei -80 °C gelagertes Plasma wurde langsam aufgetaut und 0,2 ml pro Versuchstier wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf analysiert. Folgende Parameter wurden bestimmt: Kalium, Kalzium, anorganisches Phosphat, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Gesamt-Cholesterin, Triglyceride, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Glucose, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT).

3.2.1 Adiponektin-ELISA

Zur Bestimmung des Adiponektinspiegels im Plasma wurde das „Rat Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit“ (R&D Systems, Minneapolis; Kat. Nr.: RRP300) verwendet. Der ELISA wurde entsprechend des dem Kit beiliegenden Handbuchs durchgeführt und in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M1000 PRO, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) ausgelesen. Die Verdünnung zur Analyse der Proben lag zwischen 1:1000 und 1:10000, eine Rückrechnung auf die ursprünglichen Spiegel fand statt.

3.3 Histologie und Immunhistochemie

3.3.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die histologischen Präparate wurden an dem Gefriermikrotom Leica CM1950 in 5 µm dünne Schnitte verarbeitet. Für jede Region (A1/A2/B1/B2) wurden mehrere Deckgläser mit Anschnitten aus verschiedenen Bereichen einer Region angefertigt und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Konduitregionen wurden pro aus der Gruppe der für die Histologie bestimmten Tiere jeweils drei Objektträger in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) gefärbt. Die Übersichtsfärbung wurde nach Standardprotokoll (s. Anhang 1) mit einer Hämatoxylin Färbezeit von 1 min und einer Eosin B Färbezeit von 12 min durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet und mithilfe des RotiHisto Kit II und einem Deckglas blasenfrei eingedeckt.

Die angefärbten Konduitregionen A2, B1 und B2 wurden an acht repräsentativen Stellen vermessen. Hierfür wurde maßstabsgetreu jeweils die Intima und Media der Aorta vermessen und eine Intima-Media-Ratio ermittelt (Intima/Media). Anschließend wurde aus den drei Objektträgern pro Konduitregion das Mittel gebildet, um eine repräsentative Breite der Intima und Media zu erhalten.

3.3.3 Von-Kossa-Färbung

Jede Konduitregion wurde mit einem Schnitt eingefärbt. Die von Kossa Färbung reduziert Kalzium und ersetzt es durch Silberablagerungen, welche als schwarzbraune Ablagerungen sichtbar werden. Die Färbung wurde nach Standardprotokoll (s. Anhang 2) mit einer 5 % Silbernitratlösung Einwirkzeit von 60 min, einer Reduzierung in Natriumkarbonat-Formaldehytlösung über 2 min sowie einer Fixierung in 5 % Natriumthiosulfatlösung über 5 min durchgeführt. Die Objektträger wurden anschließend eingedeckt (s.o.). Als Positivkontrolle wurde ein Objektträger mit verkalkter Aorta bei jedem Färbedurchgang mitgeführt.

Die Auswertung der Gewebeschnitte wurde mittels eines zuvor beschriebenen Scores (Assmann et al., 2014b) vorgenommen. Hierfür wurde jeweils die Intima, die Media und die Summe beider als Gesamtwert herangezogen. Der Gewebeschnitt der Regionen A2/B1/B2 wurden in acht gleichmäßig große Kreisabschnitte unterteilt und anschließend mit 0-5 Punkten versehen. Die Konduitregion A1 wurde an den drei Taschen der Aortenklappen inklusive Anulus und der Kommissur gemessen. Die Punktevergabe erfolgte nach den gleichen Kriterien. 0 = keine Kalzifizierung, 1 = Mikrokalzifizierung, schwache braune Verfärbungen, 2 = Mikrokalzifizierung, stärkere, großflächigere bräunliche Verfärbung, 3 = Makrokalzifizierungen < 50 % der Fläche, 4 = Makrokalzifizierungen 50 % bis 75 % der Fläche, 5 = Makrokalzifizierung > 75 % der

Fläche. Die Summe der Punkte ergab der Score-Wert der Kalzifizierung der entsprechenden Konduitregion.

3.3.4 Alizarin-Rot-S-Färbung

Je Konduitregion wurde ein Schnitt eingefärbt. Die Alizarinrot-S-Färbung (im Folgenden als Alizarin bezeichnet) weist Kalziumablagerungen in Gewebe nach, indem sich der Farbstoff als Chelat an das Kalzium lagert. Die Färbung wurde nach Standardprotokoll (s. Anhang 3) mit einer Einwirkzeit von 2 min in 2 % Alizarinlösung gefärbt und anschließend eingedeckt (s.o.). Als Positivkontrolle wurde ein Objektträger mit verkalkter Aorta bei jedem Färbedurchgang mitgeführt.

Die Quantifizierung der Verkalkung wurde adaptiert nach dem zuvor beschriebenen Score (Assmann et al., 2014b) und äquivalent mit rötlicher statt brauner Färbung durchgeführt. Weiterhin wurde die Zirkumferenz größerer Kalkschollen in Relation zum Gesamtumfang des AK gesetzt und somit eine Ausdehnung der Kalzifizierung in Prozent vom Gesamtumfang ermittelt. Die Bestimmung des Umfangs erfolgte maßstabsgetreu mittels ImageJ.

3.3.5 DAB-RAGE-Färbung

Ein Schnitt je Konduitregion wurde hierbei angefärbt. Als Positivkontrolle wurde natives Lungengewebe einer Spenderratte mitgeführt. Das Gewebe wurde mittels Dako Pen umrandet und 10 min in 4 % Formaldehyd fixiert. Anschließend folgte ein Waschschriff in PBS. Anschließend 10 min in 0,25 % Triton-X-Lösung sowie ein erneuter Waschschriff in PBS. Es folgte eine Blockierung für 60 min in 5 % BSA- + 0,1 % Tween-Lösung. Einer der beiden Gewebeschnitte wurde anschließend mit 50 µl Primärantikörper in einer 1:100 Verdünnung eines polyklonalen Kaninchen Antikörpers (AK) (abcam, ab3611) versehen. Der andere Gewebeschnitt diente als Negativkontrolle und wurde mit 50 µl PBS benetzt. Der Primär-AK wurde über 24 h in einer Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgte für 10 min ein H₂O₂-Block sowie ein Waschschriff. Der Sekundär-AK, welcher mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (Goat-anti-rabbit IgG, Jackson-Immuno 111.035.003), wurde mit einer 1:200 Verdünnung mit 50 µl auf beide Gewebeschnitte aufgetragen und für 45 min bei Raumtemperatur in einer lichtgeschützten Feuchtkammer inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend in Tris-Base-Puffer (TB-Puffer) abgestellt, in PBS gewaschen und anschließend wieder in TB-

Puffer für 10 min gegeben. Auf jeden Gewebeschnitt wurde anschließend für 2 min 50 µl DAB-Lösung, bestehend aus einem Stock von 1 ml DAB-Substrate-Buffer sowie 50 µl DAB Chromogen, hinzugegeben. Es folgten Waschschriffe sowie eine Kernfärbung über 1 min mittels Mayers Hämalanlösung. Anschließend folgten eine Fixierung sowie Dehydrierung und ein Eindecken der Objektgläser (s.o.).

Die Analyse der RAGE-Färbung wurde mithilfe eines erstellten ImageJ Fiji Makros durchgeführt. Hierfür wurde bei der A1 Region die Gesamtfläche und bei den übrigen Regionen die Intima und Media einmal getrennt und weiterhin als Gesamtfläche betrachtet. Der gewählte Threshold beläuft sich hierbei auf 105 als unteren Wert und 255 als oberen Wert (s. Abbildung 4). Durch Berechnung der Gesamtfläche und den positiven Flächen, erhielt man einen prozentualen Anteil DAB-positiver Bereiche (Angabe in %).

```
1 title = getTitle();
2
3 run("Colour Deconvolution", "vectors=[H DAB]");
4 selectWindow(title+"-(Colour_1)");
5 close();
6 selectWindow(title+"-(Colour_3)");
7 close();
8 run("Restore Selection");
9 setBackgroundColor(0, 0, 0);
10 run("Clear Outside");
11 setAutoThreshold("Default dark");
12 //run("Threshold...");
13 setThreshold(105, 255);
14 selectWindow(title+"-(Colour_2)");
15 run("Analyze Particles...", "size=1-Infinity clear summarize");
```

Abbildung 4: eigens erstelltes Makro zur RAGE-Quantifizierung. Abkürzungen: RAGE - *Receptor for advanced glycation endproducts*.

3.3.6 Anfertigung von fotomikroskopischen Bildern

Die wie oben beschrieben gefärbten Objektträger wurden anschließend unter 10-facher Vergrößerung schrittweise mithilfe des Durchlichtmikroskops Leica DM 2000 fotografiert. Die einzelnen Bilder wurden mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ zu einem Bild zusammengefügt und ausgewertet.

3.4 Semi-quantitative *real-time* PCR (*real-time* qPCR)

3.4.1 RNA-Isolation aus kryokonservierten Aortenkonduits

Die RNA aus den explantierten Aortenkonduits (n=6 pro Gruppe) wurde zur weiteren Analyse isoliert. Hierfür wurden die Konduits in 1 ml Trizol Reagenz überführt und mithilfe eines elektrischen Gewebehomogenisators homogenisiert. Nach 5 min wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und vermischt. Nach 3 min wurde das Gemisch bei

4 °C und 13000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit aufgereinigt.

3.4.2 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der isolierten RNA

Die RNA-Quantifizierung wurde mithilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Tecan Reader, infinite M1000 PRO) durchgeführt. Hierfür wurden 2 µl der isolierten RNA-Proben verwendet und anschließend quantifiziert.

Die Qualität der RNA mittels RIN-Wert Bestimmung wurde mit einem Nano Drop 1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt.

3.4.3 Umschreiben der RNA zu cDNA

Die RNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben in cDNA überschrieben. Hierfür wurde je nach zuvor gemessener RNA-Konzentration der Probe zum Probenvolumen RNase freies Wasser auf 12 µl aufgestockt und 2 µl gDNA Wipeout Buffer hinzugegeben. Das Probengemisch wurde im Thermocycler für 2 min erhitzt und anschließend pro Probe mit 4 µl Reverse Transkriptase (RT) Buffer und 1 µl RT Primer Mix sowie 1 µl RT zu einem Endvolumen von 20 µl versehen. Die Proben wurden anschließend für weitere 33 min erhitzt und bei -20 °C weggefroren.

3.4.4 Expressionsanalyse mittels *real-time* qPCR

Die cDNA-Proben wurden mit dem StepOnePlus™, Real Time PCR System nach Herstellerangaben quantifiziert. Als endogene Kontrolle wurde isolierte Leber-RNA einer Ratte herangezogen und für alle Analysen verwendet. Zur relativen Quantifizierung wurde ein Mittel aus den Referenz-Genen 18S, beta-Actin und RPL-13A verwendet. Die Auswertung der qPCR wurde die Software Step One Software Version 2.3 verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Die Daten wurden auf die endogene Kontrolle sowie die Referenz-Gene bezogen.

3.4.5 Primersequenzen

Zielgen	Vorwärtsprimer (5'→3')	Rückwärtsprimer (5'→3')
<i>18S (endogene Kontrolle, RG)</i>	CCGCAGCTAGGAATAATGGA	CCCTCTTAATCATGGCCTCA
<i>β-Actin (RG)</i>	CCCGCGAGTACAACCTTCT	CGTCATCCATGGCGAACT
<i>RPL-13A (RG)</i>	GAAAGGTGGTGGTTGTACGC	GAGACGGGTTGGTGTTCATC
<i>BMP-2</i>	GCTCAGCTTCCATCACGAA	AAGAAGCGTCGGGAAGTTT

<i>IL-1β</i>	AGGACCCAAGCACCTTCTTT	CATCATCCCACGAGTCACAG
<i>IL-6</i>	ACCACCCACAACAGACCAGT	AGTGCATCATCGCTGTTCAT
<i>LXR-α</i>	TGCATGCCTATGTCTCCATC	GAATGGACGCTGCTCAAAGT
<i>OCN</i>	AAGCAGGAGGGCAGTAAGGT	GTCCGCTAGCTCGTCACAAT
<i>OPN</i>	AAGCCTGACCCATCTCAGAA	ATGGCTTTCATTGGAGTTGC
<i>PIT-1</i>	TGTATTGTCGGTGCAACCAT	TGGAGAGACGAACCAAGACA
<i>RAGE</i>	TGAACTCACAGCCAATGTCC	TCAGAGGTTTCCCATCCAAG
<i>RUN-X2</i>	GATGACACTGCCACCTCTGA	GATGAAATGCCTGGGAACTG
<i>TNF-α</i>	GCTCCCTCTCATCAGTTCCA	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC

Tabelle 1: Primersequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer (je in 5'5' $\rightarrow$ 3' Richtung). Abkürzungen: RG = Referenzgen. 18S – 18S ribosomale RNA, RPL-13A – *Ribosomal protein L13A*, BMP-2 – *Bone morphogenetic protein 2*, IL-1 β – Interleukin-1 β , IL-6 – Interleukin-6, OCN – *Osteocalcin*, OPN – *Osteopontin*, PIT-1 – *Pituitary-specific positive transcription factor 1*, RAGE – *Receptor for advanced glycation endproducts*, RUN-X2 – *Runt-related transcription factor 2*, TNF- α – *Tumor necrosis factor- α* .

3.5 Statistische Analysen und grafische Aufarbeitung mittels GraphPad Prism

Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism 6. Hierfür wurde für den Vergleich der drei Versuchsgruppen stets ein Kruskal-Wallis Test und anschließend ein Dunn's Test für den Mehrfachvergleich durchgeführt wurde. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Graphen wurden ebenfalls mit GraphPad Prism 6 erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Gewichtsdokumentation, Nierenfunktion und Blutanalysen

4.1.1 Gewichtsdokumentation

Das Gewicht der Ratten wurde zum Zeitpunkt der Induktion der Aorteninsuffizienz sowie zur Implantation der AK und zur Explantation der AK gemessen. In der 4 Wochen Gruppe kam es zu einer signifikant niedrigeren Gesamtgewichtszunahme in der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle vs. CKD – Pio; + 153,6 g vs. + 107,2 g; p=0,01). In der 8 Wochen Gruppe zeigte sich eine signifikant höhere Gewichtszunahme der Kontrollgruppe im Vergleich zur CKD + Pio sowie zur CKD – Pio Gruppe (Kontrolle vs. CKD – Pio; + 218,6 g vs. + 103,3 g; p<0,0001; Kontrolle vs. CKD + Pio; + 218,6 g vs. + 126,6 g; p=0,001) (vgl. Abbildung 5).

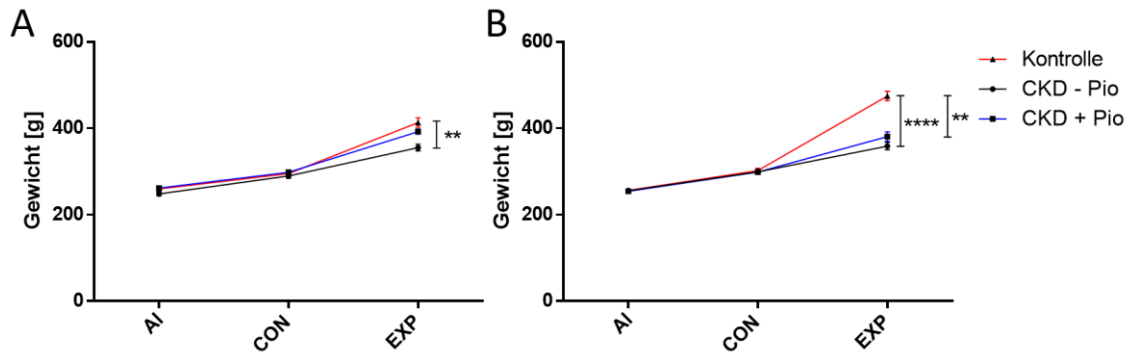


Abbildung 5: Gewichtsverlauf A: 4 Wochen Tiere B: 8 Wochen Tiere. Signifikant niedrigere Gewichtszunahme in der CKD – Pio Gruppe in der 4 Wochen Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikant höhere Gewichtszunahme in der Kontrollgruppe nach 8 Wochen im Vergleich zur CKD – Pio und CKD + Pio Gruppe. **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$. Abkürzungen: CKD – Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon, AI - Zeitpunkt der Aorteninsuffizienzinduktion, CON - Zeitpunkt der Konduitimplantation, EXP - Zeitpunkt der Konduitexplantation.

4.1.2 Induktion der Niereninsuffizienz

Durch die Zugabe von 0,25 % Adenin in das Rattenfutter wurde eine Niereninsuffizienz induziert. Hierdurch ergab sich in der 4 Wochengruppe ein durchschnittlicher Kreatininwert zum Zeitpunkt der Explantation in der CKD – Pio Gruppe von 0,9 mg/dl, in der CKD + Pio Gruppe von 0,66 mg/dl und im Vergleich hierzu in der Kontrollgruppe ein durchschnittlicher Kreatininwert von 0,22 mg/dl. In beiden Gruppen ergaben sich somit signifikant höhere Plasmakreatininwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$; $p = 0,003$). In der 8 Wochengruppe zeigte sich in der Kontrollgruppe durchschnittlich ein Kreatininwert von 0,28 mg/dl, in der CKD – Pio Gruppe von 1,91 mg/dl und in der CKD + Pio Gruppe von 2,15 mg/dl (Kontrolle vs. CKD – Pio $p = 0,001$; Kontrolle vs. CKD + Pio $p = 0,001$).

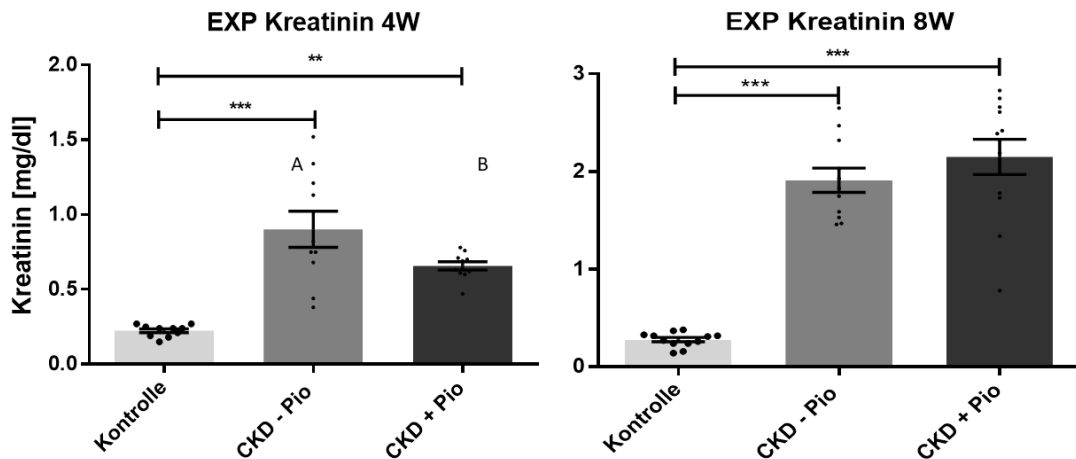


Abbildung 6: Plasmakreatinin zum Zeitpunkt der Explantation des Aortenkonduits. Es zeigt sich in beiden Zeitgruppen jeweils in der CKD + Pio und der CKD - Pio Gruppe ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höheres Plasmakreatinin, welche die Niereninsuffizienz bestätigt. Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. Abkürzungen: CKD - Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon, EXP – Zeitpunkt der Explantation, SEM – *standard error of the mean*.

Weiterhin zeigte sich eine signifikante Gewichtszunahme beider Nieren im Verlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abbildung 8; $p < 0,001$). Nach 4 Wochen zeigte sich in der Kontrollgruppe ein durchschnittliches Gewicht der linken Niere von 1,36 g und der rechten Niere von 1,35 g. In der CKD – Pio Gruppe links ein Gewicht von 2,51 g und rechts von 2,39 g. In der CKD + Pio Gruppe links ein Gewicht von 2,45 g und rechts von 2,49 g (Kontrolle vs. CKD – Pio; links: $p < 0,001$; rechts: $p = 0,001$; Kontrolle vs. CKD + Pio; links: $p = 0,001$; rechts: $p < 0,001$). Nach 8 Wochen zeigt sich in der Kontrollgruppe ein durchschnittliches Gewicht der linken Niere von 1,35 g und der rechten von 1,32 g. In der CKD – Pio Gruppe links ein Gewicht von 2,59 g und rechts von 2,26 g. In der CKD + Pio Gruppe links ein Gewicht von 2,46 g und rechts von 2,09 g (Kontrolle vs. CKD – Pio; links: $p < 0,0001$; rechts: $p < 0,0001$; Kontrolle vs. CKD + Pio; links: $p < 0,001$; rechts: $p < 0,001$).

Auch zeigten sich makroskopische Veränderungen beider Gruppen mit induzierter Niereninsuffizienz, bei den Tieren mit Niereninsuffizienz zeigt sich die keine glatte und homogene Oberfläche der Nieren wie in der Kontrollgruppe. (s. Abbildung 7).



Abbildung 7: Deutliche makroskopische Veränderungen der Nieren nach der Induktion der Niereninsuffizienz. Links: beide Nieren einer Ratte aus der Kontrollgruppe. Mittig: Nieren einer Ratte der CKD – Pio Gruppe. Rechts: Nieren aus der CKD + Pio Gruppe. Abkürzungen: CKD – Pio - Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon; CKD + Pio - Niereninsuffizienz mit Pioglitazon.

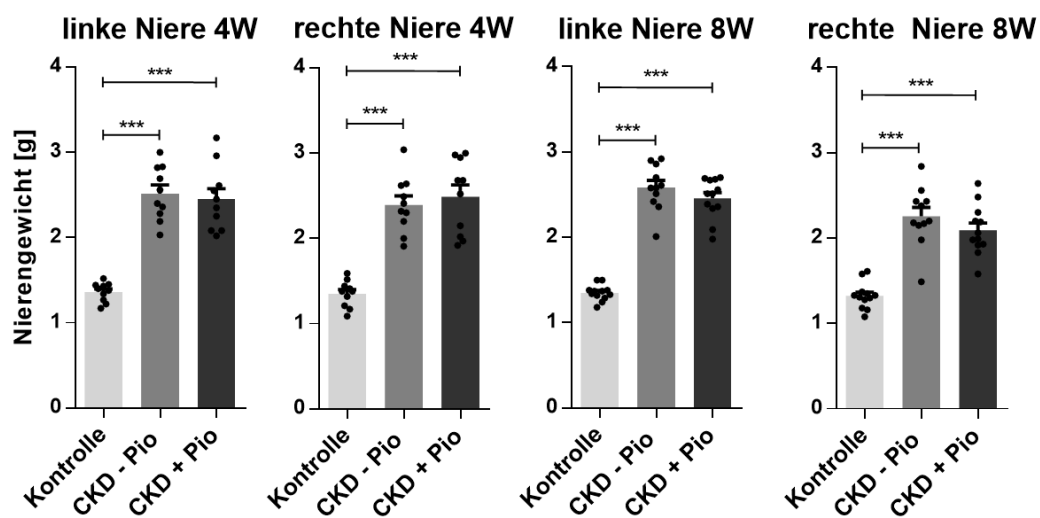


Abbildung 8: Nierengewicht. Sowohl nach 4 als auch nach 8 Wochen war das Gewicht der Nieren der beiden Gruppen mit Niereninsuffizienz (CKD + Pio und CKD – Pio) signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,001$). ***: $p < 0,001$. Abkürzungen: CKD – Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon.

4.1.3 Laborchemische Veränderungen im Blutplasma

Nach 4 Wochen zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe in der CKD – Pio Gruppe signifikant erhöhte Kaliumwerte (Kontrolle vs. CKD – Pio: 3,6 mmol/l vs. 4,2 mmol/l; $p = 0,02$). Die Phosphatlevel zeigten ebenfalls einen Anstieg in der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle vs. CKD – Pio: 2,13 mmol/l vs. 2,78 mmol/l; $p = 0,005$). Weiterhin war eine deutliche Reduktion des Harnstoffs in beiden CKD-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen (Kontrolle vs. CKD – Pio: 38,5 mg/dl vs. 21,2 mg/dl; $p = 0,0006$; Kontrolle vs. CKD + Pio: 38,5 mg/dl vs. 27,4 mg/dl; $p = 0,04$).

Das Gesamtcholesterin der CKD + Pio Gruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Kontrolle vs. CKD + Pio: 56,9 mg/dl vs. 73,6 mg/dl; $p=0,04$). Ebenso zeigte sich eine Erhöhung des LDL in der CKD + Pio Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle vs. CKD + Pio: 12,3 mg/dl vs. 19,7 mg/dl; $p=0,008$). In beiden CKD-Gruppen zeigte sich eine signifikante Reduktion der GPT im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle vs. CKD – Pio: 44,2 mg/dl vs. 29,9 mg/dl; $p=0,004$; Kontrolle vs. CKD + Pio: 44,2 mg/dl vs. 30,9 mg/dl; $p=0,01$).

Nach 8 Wochen zeigte sich im Vergleich der CKD-Gruppen zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Kaliumwerte (Kontrolle vs. CKD – Pio: 3,6 mmol/l vs. 5,1 mmol/l; $p<0,0001$; Kontrolle vs. CKD + Pio: 3,6 mmol/l vs. 4,1 mmol/l; $p=0,001$). Weiterhin zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Phosphatlevel (Kontrolle vs. CKD – Pio: 1,78 mmol/l vs. 3,48 mmol/l; $p<0,0001$; Kontrolle vs. CKD + Pio: 1,78 mmol/l vs. 2,91 mmol/l; $p=0,001$). Ebenso war eine Erhöhung im Gesamtcholesterin zu sehen (Kontrolle vs. CKD – Pio: 56,8 mg/dl vs. 94,8 mg/dl; $p=0,001$; Kontrolle vs. CKD + Pio: 56,8 mg/dl vs. 101,4 mg/dl; $p<0,0001$). In der CKD + Pio Gruppe zeigte sich eine Erhöhung der Triglyzeride im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle vs. CKD + Pio: 65,1 mg/dl vs. 96,9 mg/dl; $p=0,036$). Das HDL war ebenfalls in beiden CKD-Gruppen erhöht (Kontrolle vs. CKD – Pio: 31,3 mg/dl vs. 55,7 mg/dl; $p=0,0006$; Kontrolle vs. CKD + Pio: 31,3 mg/dl vs. 57,8 mg/dl; $p=0,0001$). Das LDL zeigte ebenfalls eine Erhöhung (Kontrolle vs. CKD – Pio: 13,3 mg/dl vs. 26,8 mg/dl; $p=0,005$; Kontrolle vs. CKD + Pio: 13,3 mg/dl vs. 34,8 mg/dl; $p<0,0001$). Die Glukose zeigte sich erniedrigt (Kontrolle vs. CKD – Pio: 283,8 mg/dl vs. 224,5 mg/dl; $p=0,01$; Kontrolle vs. CKD + Pio: 283,8 mg/dl vs. 195,9 mg/dl; $p<0,0001$). In der CKD + Pio Gruppe zeigte sich eine Reduktion der GPT im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle vs. CKD + Pio: 39,9 mg/dl vs. 28,6 mg/dl; $p=0,01$).

Ebenfalls zeigten sich im direkten Vergleich der CKD-Gruppen nach 8 Wochen signifikante Veränderungen der Proben, diese wurden mittels Mann-Whitney Test ausgewertet. So zeigte sich eine Erhöhung des Kaliums der CKD – Pio Gruppe ($p=0,04$), des Phosphats ($p=0,03$), der Glukose ($p=0,04$) und des GPT ($p=0,04$). Das LDL zeigte sich in der CKD – Pio Gruppe erniedrigt ($p=0,004$) (s. Tabelle 2).

4 Wochen	Kontrolle	CKD – Pio	CKD + Pio	p-Wert CKD – Pio vs. CKD + Pio
Kalium (mmol/l)	3,6 ± 0,6	4,2 ± 0,4 *	4,1 ± 0,4	ns
Kalzium (mmol/l)	2,24 ± 0,2	2,28 ± 0,16	2,4 ± 0,16	ns
Phosphat (mmol/l)	2,13 ± 0,53	2,78 ± 0,27 **	2,5 ± 0,45	ns
Harnstoff (mg/dl)	38,5 ± 5,2	21,2 ± 10,3 ***	27,4 ± 9,3 *	ns
Harnsäure (mg/dl)	0,35 ± 0,08	0,42 ± 0,19	0,46 ± 0,16	ns
Gesamtchol. (mg/dl)	56,9 ± 15,8	66,7 ± 8,6	73,6 ± 13,6 *	ns
Triglyzeride (mg/dl)	99,2 ± 39,5	91,2 ± 28	95,3 ± 27,7	ns
HDL (mg/dl)	33,6 ± 11,8	40,1 ± 8,5	45 ± 10,7	ns
LDL (mg/dl)	12,3 ± 4,9	16,5 ± 5,2	19,7 ± 3,8 **	ns
Glukose (mg/dl)	283,3 ± 30,9	276,9 ± 44,2	256 ± 47,3	ns
GOT (U/l)	58,1 ± 8,8	59,3 ± 10,3	62,2 ± 11,3	ns
GPT (U/l)	44,2 ± 8,4	29,9 ± 8 **	30,9 ± 6,6 *	ns
8 Wochen	Kontrolle	CKD – Pio	CKD + Pio	p-Wert CKD – Pio vs. CKD + Pio
Kalium (mmol/l)	3,4 ± 0,3	5,1 ± 1,3 *****	4,2 ± 0,4 **	0,0446
Kalzium (mmol/l)	2,23 ± 0,2	2,05 ± 0,13	2,08 ± 0,28	ns
Phosphat (mmol/l)	1,78 ± 0,33	3,48 ± 0,65 *****	2,91 ± 0,47 **	0,0304
Harnstoff (mg/dl)	44,3 ± 6,6	45 ± 8,8	53,4 ± 18,2	ns
Harnsäure (mg/dl)	0,33 ± 0,08	0,48 ± 0,54	0,53 ± 0,24	ns
Gesamtchol. (mg/dl)	56,8 ± 11,4	94,8 ± 19,3 **	101,4 ± 14,1 *****	ns
Triglyzeride (mg/dl)	65,1 ± 26,9	100 ± 51,2	96,9 ± 26,6 *	ns
HDL (mg/dl)	31,3 ± 10,7	55,7 ± 10 ***	57,8 ± 11,4 ***	ns
LDL	13,3 ± 2,4	26,8 ± 6,1 **	34,8 ± 6,6 *****	0,0042

(mg/dl)				
Glukose (mg/dl)	283,8 ± 31	224,5 ± 33,1 *	195,9 ± 29,3 ****	0,0455
GOT (U/l)	62,6 ± 12,4	62,6 ± 29,6	63,8 ± 17,6	ns
GPT (U/l)	39,9 ± 11,5	36,6 ± 10,4	28,6 ± 4,6 *	0,0487

Tabelle 2: Ergebnisse der Plasmaproben der 4 und 8 Wochen Tiere zum Zeitpunkt der Konduitlexplantation. Der statistische Test des Vergleichs der drei Gruppen erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und der Vergleich zwischen CKD – Pio und CKD + Pio erfolgte mittels Mann-Whitney Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. Abkürzungen: CKD – Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon, Gesamtchol. – Gesamtcholesterin, HDL – High density lipoprotein, LDL – Low density lipoprotein, GOT – Glutamat-Oxalat-Transaminase, GPT – Glutamat-Pyruvat-Transaminase.

4.1.4 Veränderungen des Adiponektinstoffwechsels

Nach vier Wochen zeigte sich in der Kontrollgruppe ein Adiponektinspiegel von 2,85 µg/ml, in der CKD – Pio Gruppe von 8,05 µg und in der CKD + Pio Gruppe von 15,1 µg/ml, was im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung darstellte ($p < 0,0001$). Nach acht Wochen zeigte sich in der Kontrollgruppe ein Adiponektinspiegel von 2,68 µg/ml, in der CKD – Pio Gruppe von 12,27 µg/ml und in der CKD + Pio Gruppe von 32,4 µg/ml (Kontrolle vs. CKD – Pio: $p = 0,02$; Kontrolle vs. CKD + Pio: $p < 0,0001$; CKD – Pio vs. CKD + Pio: $p = 0,02$; s. Abbildung 9).

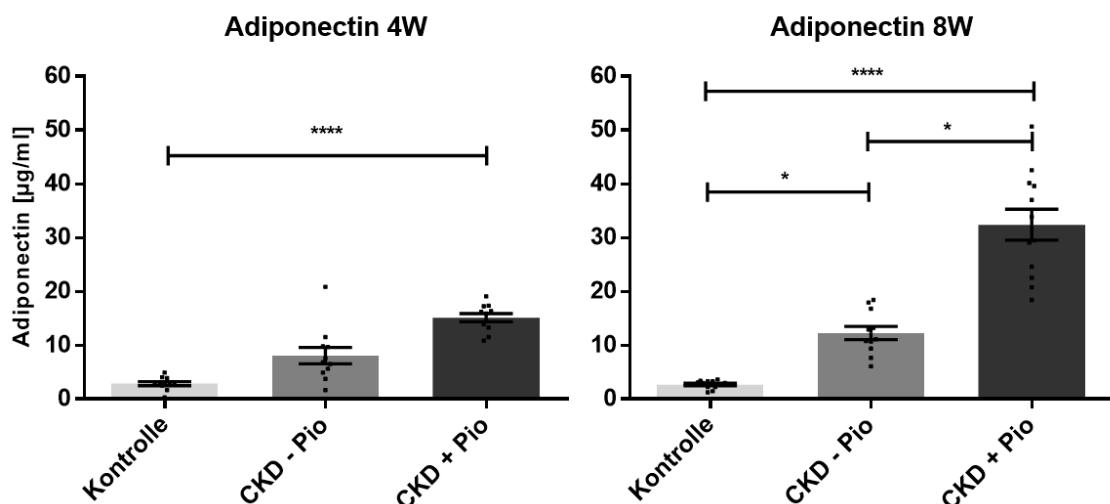


Abbildung 9: Adiponektinspiegel zum Zeitpunkt der Explantation mittels ELISA im Plasma gemessen. Es zeigen sich sowohl nach 4 als auch nach 8 Wochen signifikante Unterschiede der CKD + Pio Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und nach 8 Wochen ein signifikanter Unterschied der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur CKD + Pio Gruppe. *: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$. Abkürzungen: CKD – Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon.

4.2 Histomorphologische und molekularbiologische Gewebsveränderungen

4.2.1 Intimahyperplasie im Rahmen proliferativer Prozesse

In der 4 Wochen Gruppe ergab die gemittelte Intima über die drei Konduitregionen A2/B1/B2 in der Kontrollgruppe eine Dicke von 86,35 μm , in der CKD – Pio Gruppe 119,3 μm und in der CKD + Pio Gruppe 89,69 μm , was sich als statistisch nicht signifikant erwies. Die ermittelte Intima-Media-Ratio lag in der Kontrollgruppe bei 0,84, in der CKD – Pio Gruppe bei 0,94 und in der CKD + Pio Gruppe bei 0,78; ebenfalls nicht statistisch signifikant.

In der 8 Wochen Gruppe ergab die gemittelte Intima über die drei Konduitregionen A2/B1/B2 in der Kontrollgruppe 51,48 μm , in der CKD – Pio Gruppe 160,3 μm und in der CKD + Pio Gruppe 64,78 μm . Hierbei konnte eine signifikante Intimahyperplasie der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen nachgewiesen werden (Kontrolle vs. CKD – Pio: $p=0,006$; CKD – Pio vs. CKD + Pio: $p=0,026$). Die Intima-Media-Ratio lag in der Kontrollgruppe bei 0,42, in der CKD – Pio Gruppe bei 1,49 und in der CKD + Pio Gruppe bei 0,49, wobei ebenfalls eine statistisch signifikante Erhöhung der Ratio der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen zu erkennen war (Kontrolle vs. CKD – Pio: $p=0,004$; CKD – Pio vs. CKD + Pio $p=0,009$; s. Abbildung 10).

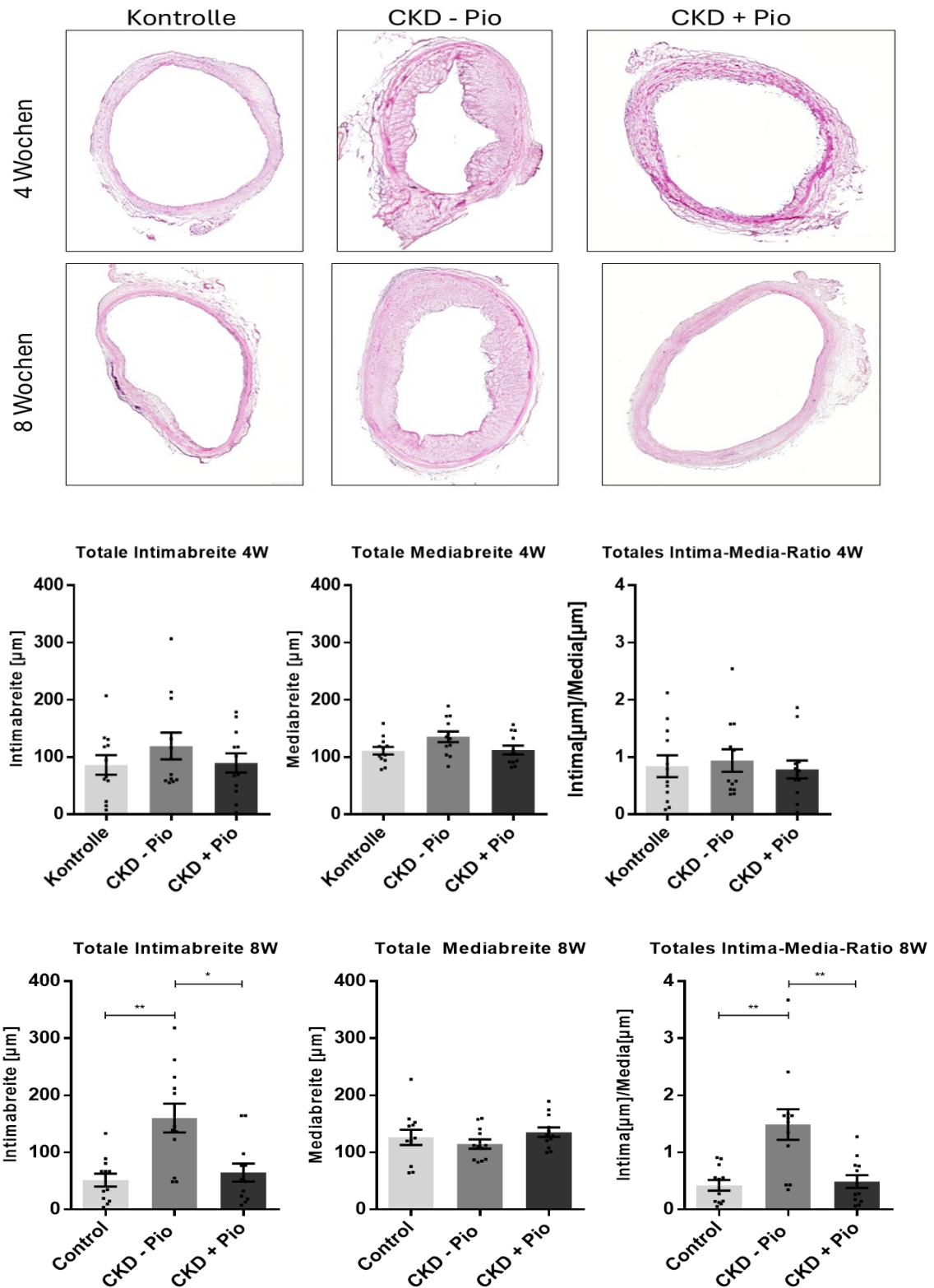


Abbildung 10: Darstellung der über die drei Konduitregionen A2/B1/B2 gemittelten Intimabreiten, Mediabreiten sowie der daraus hergeleiteten Intima-Media-Ratio der 4 und 8 Wochen Gruppe. Während in der 4 Wochen Gruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Intima- und Mediabreite sowie der Ratio zu sehen sind, so zeigt sich eine deutliche Signifikanz der Intimahyperplasie in der 8 Wochen Gruppe mit signifikantem Anstieg der Intima-Media-Ratio. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Abkürzungen: CKD - Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon.

4.2.2 Nachweis von Mineralisierungsprozessen im Konduktgewebe

Im Rahmen der von Kossa Färbung zeigten sich signifikant höhere von Kossa Scores in der A1 Region in der 4 Wochen Gruppe. Hierbei betrug der durchschnittliche Wert in der Kontrollgruppe 1,25 Punkte, in der CKD – Pio Gruppe 3,41 Punkte und in der CKD + Pio Gruppe 1,25 Punkte. Die CKD – Pio Gruppe zeigte hierbei signifikant höhere Punkte im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,04$) sowie zur CKD + Pio Gruppe ($p=0,03$) (s. Abbildung 8) (s. Abbildung 11). Außerdem zeigten sich in der B2 Region in der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur CKD + Pio Gruppe sowohl in der 4 Wochen Gruppe als auch in der 8 Wochen Gruppe signifikant höhere von Kossa Scores. Diese betrugen in der 4 Wochen Gruppe durchschnittlich 2 Punkte in der Kontrollgruppe, 3,5 Punkte in der CKD – Pio Gruppe und 0,75 Punkte in der CKD + Pio Gruppe (CKD – Pio vs. CKD + Pio $p=0,04$). In der 8 Wochen Gruppe betrug sich der Score auf durchschnittlich 0,75 Punkte in der Kontrollgruppe, 4,5 Punkte in der CKD – Pio Gruppe und 0,5 Punkte in der CKD + Pio Gruppe (CKD – Pio vs. CKD + Pio $p=0,04$). In der Gesamtschau über alle Regionen gerechnet zeigte sich eine deutliche Tendenz einer vermehrten Kalzifizierung in der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur CKD + Pio Gruppe, welche jedoch nicht signifikant war (s. Abbildung 12).

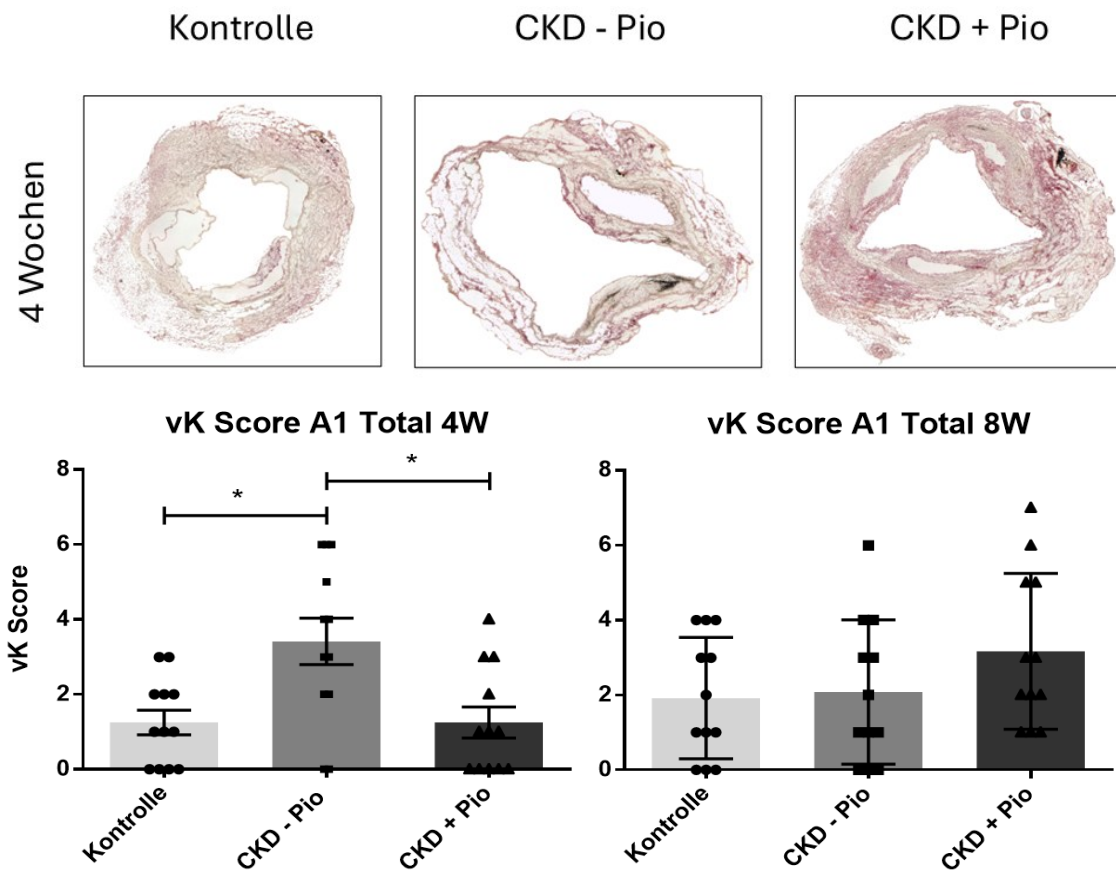


Abbildung 11: von Kossa-Score der A1-Region im Gesamtscore in der 4 und 8 Wochen Gruppe. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung des von Kossa-Scores der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und der CKD + Pio Gruppe in der A1-Region im Gesamtscore (Kontrolle vs. CKD – Pio $p=0,04$; CKD – Pio vs. CKD + Pio $p=0,03$). *: $p<0,05$. Abkürzungen: vK – von Kossa, CKD – Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon.

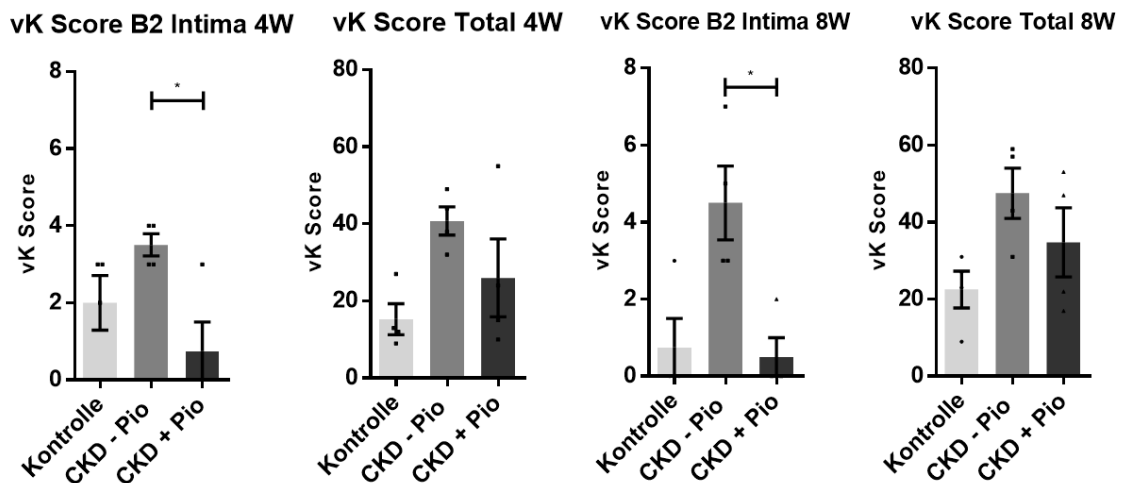
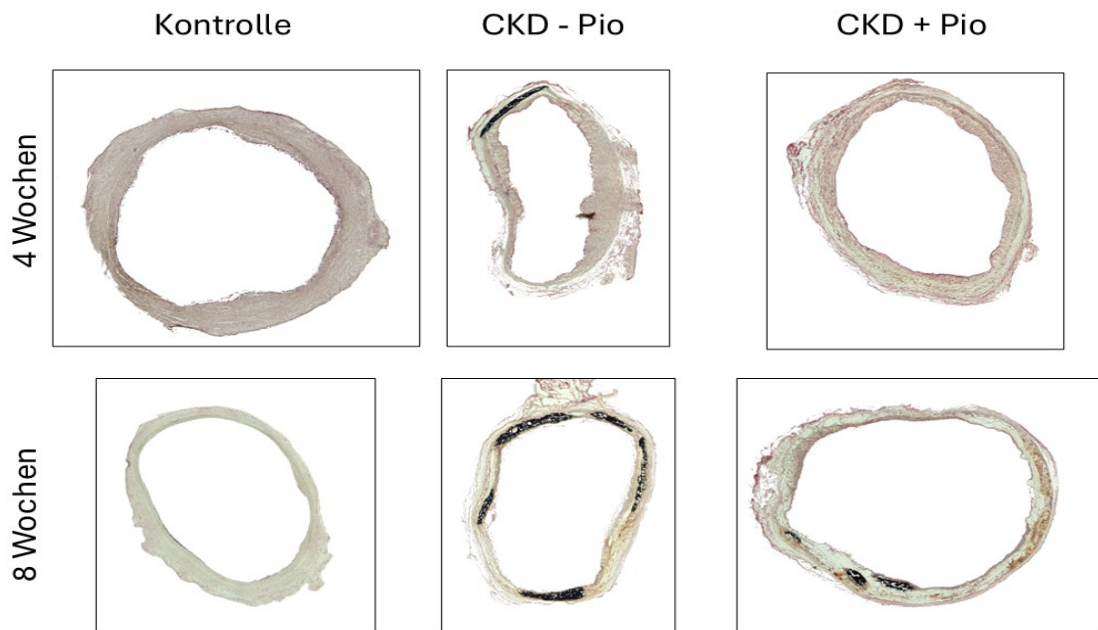
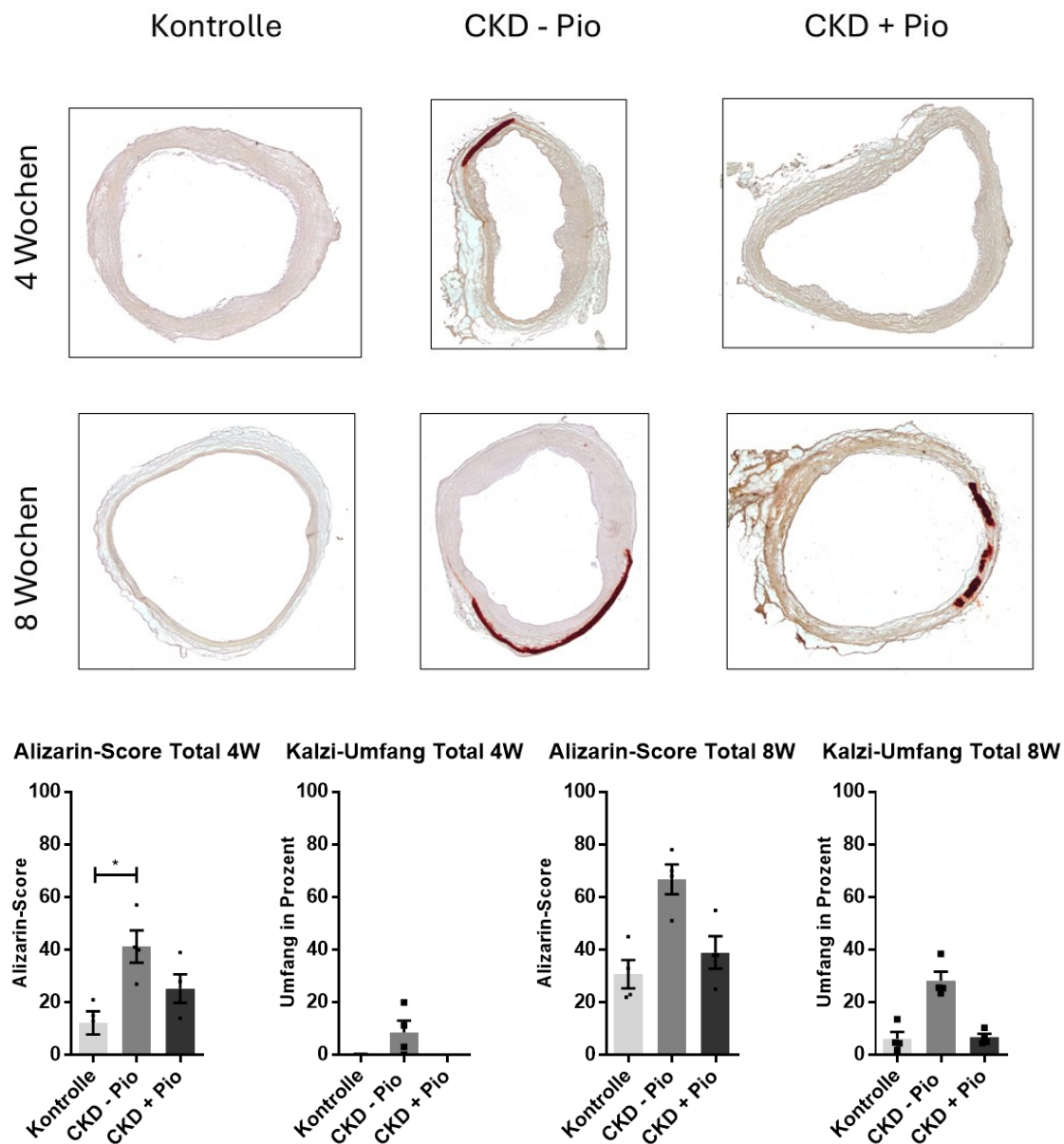


Abbildung 12: von Kossa-Score der B2-Region in der 4 und 8 Wochen Gruppe sowie der Gesamtscore über alle Konduitregionen gerechnet. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung des von Kossa-Scores der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur CKD + Pio Gruppe in der B2-Region jeweils in der 4 und 8 Wochen Gruppe (4 Wochen $p=0,04$; 8 Wochen $p=0,04$). Im Gesamtscore ist eine deutliche Tendenz mit erhöhtem von Kossa-Score in der CKD – Pio Gruppe zu sehen, welche jedoch statistisch nicht signifikant war. *: $p<0,05$. Abkürzungen: vK – von Kossa, CKD – Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon.

In der Alizarinfärbung zeigte sich im Alizarin-Score in beiden Zeitgruppen eine Tendenz zur vermehrten Kalzifizierung in der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur CKD + Pio Gruppe (CKD – Pio vs. CKD + Pio 4W $p=0,42$; 8W $p=0,23$). In der kalzifizierten Zirkumferenz zeigte sich ebenfalls eine deutliche Tendenz zu großflächigen Kalkschollen in der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur CKD + Pio Gruppe (4W $p=0,07$; 8W $p=0,12$) (s. Abbildung 13).



4.2.3 RAGE assoziierte Inflammation

In der RAGE DAB Färbung zeigten sich nach 4 Wochen in der Kontrollgruppe mit RAGE assoziierte Areale der ausgewerteten *Region of interest* von durchschnittlich 18,34 %, in der CKD – Pio Gruppe von 20 % und in der CKD + Pio Gruppe von 20,17 %. Die 8 Wochen Gruppe zeigte deutlich weniger Flächen mit durchschnittlich 2,98 % in der

Kontrollgruppe, 2,71 % in der CKD – Pio Gruppe und 4,34 % in der CKD + Pio Gruppe (s. Abbildung 14). Es zeigte sich somit eine deutlich vermehrte RAGE-assoziierte Inflammation innerhalb der ersten 4 Wochen im Vergleich zur 8 Wochen Gruppe.

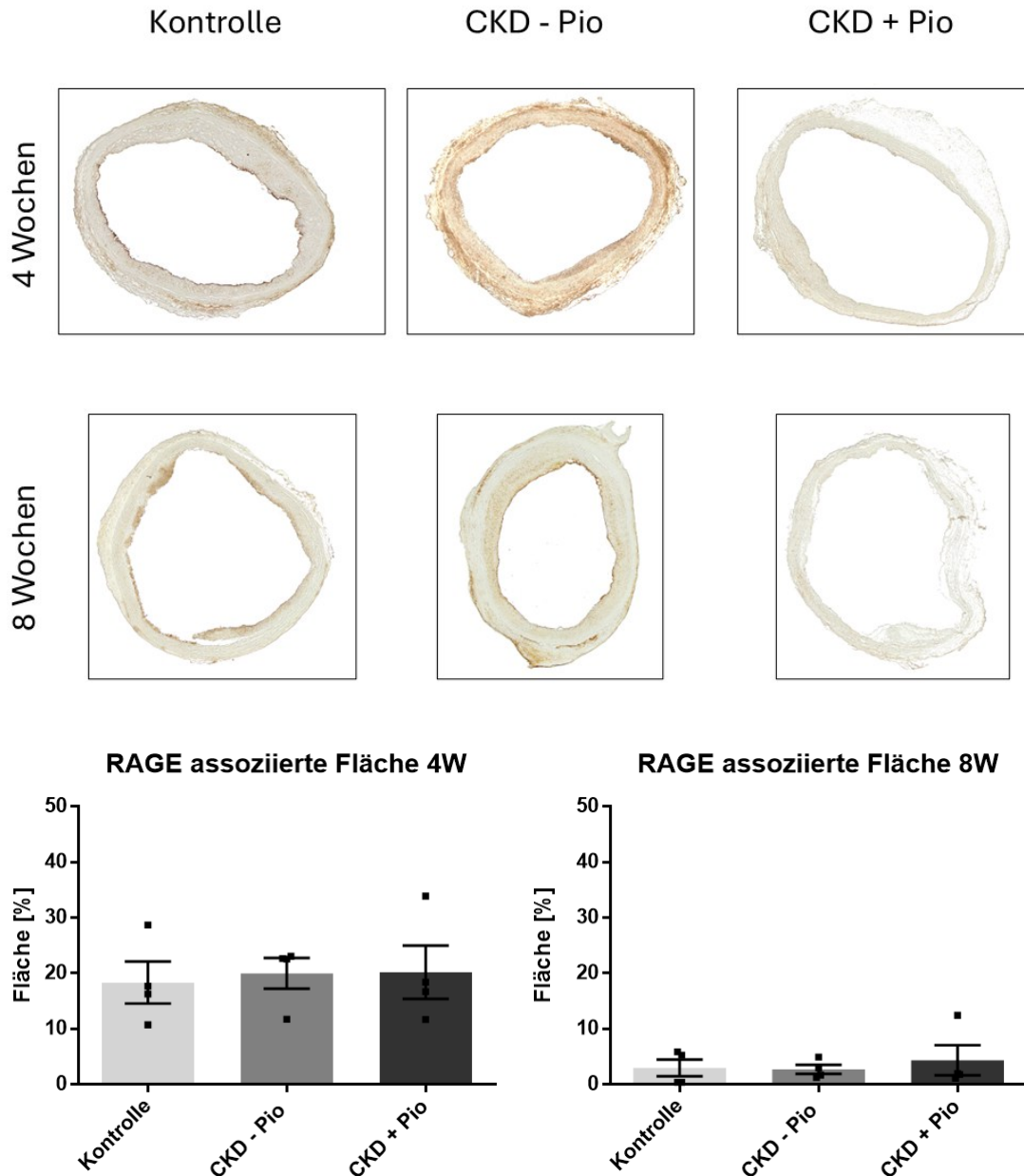


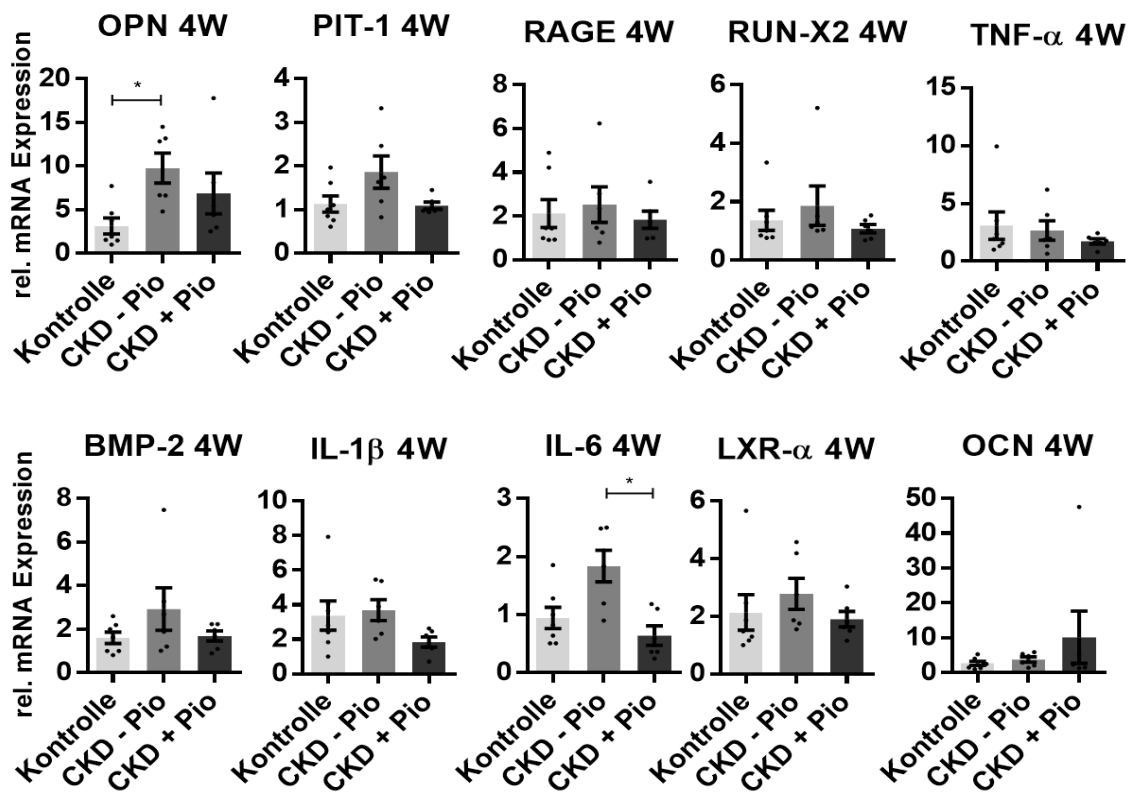
Abbildung 14: RAGE assoziierte Flächen der 4 und 8 Wochen Gruppen über alle Konduitregionen (A1/A2/B1/B2) in der dazugehörigen *Region of interest* gemittelt in Prozent angegeben. Es zeigen sich nach 4 Wochen deutlich mehr RAGE assoziierte inflammatorische Areale als in der 8 Wochen Gruppe (durchschnittlich 4W: 18,34 % in der Kontrollgruppe, 20 % in der CKD – Pio Gruppe, 20,17 % in der CKD + Pio Gruppe; 8W: 2,71 % in der Kontrollgruppe, 2,71 % in der CKD – Pio Gruppe, 4,34 % in der CKD + Pio Gruppe). Abkürzungen: RAGE – *Receptor for advanced glycation endproducts*, CKD – Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon.

4.2.4 Veränderungen inflammatorischer Genexpression

Die in der *real-time* qPCR untersuchte mRNA-Expression verschiedener Marker wie RAGE, TNF- α , LXR- α , die inflammatorische Signalkaskaden beeinflussen, zeigten keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Gruppen als auch zwischen den beiden Zeitpunkten. Die mRNA-Expression des Zytokins IL-6 hingegen zeigte nach 4 Wochen eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Expression in der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur CKD + Pio Gruppe ($p=0,01$, vgl. Abb. 14). Weiterhin zeigte sich nach 8 Wochen eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression von IL-1 β in der Kontrollgruppe im Vergleich zur CKD + Pio Gruppe ($p=0,05$, vgl. Abbildung 15).

4.2.5 Veränderungen chondro-osteogener Genexpression

Biomineralisierende Marker wie OCN, RUN-X2, BMP-2 und der Transkriptionsfaktor Pit-1 waren in ihrer mRNA-Expression sowohl in der 4 Wochen Gruppe als auch in der 8 Wochen Gruppe nicht signifikant erhöht. Der osteogene Marker OPN war in der CKD – Pio Gruppe signifikant im Vergleich zu Kontrollgruppe erhöht ($p=0,02$, vgl. Abbildung 15).



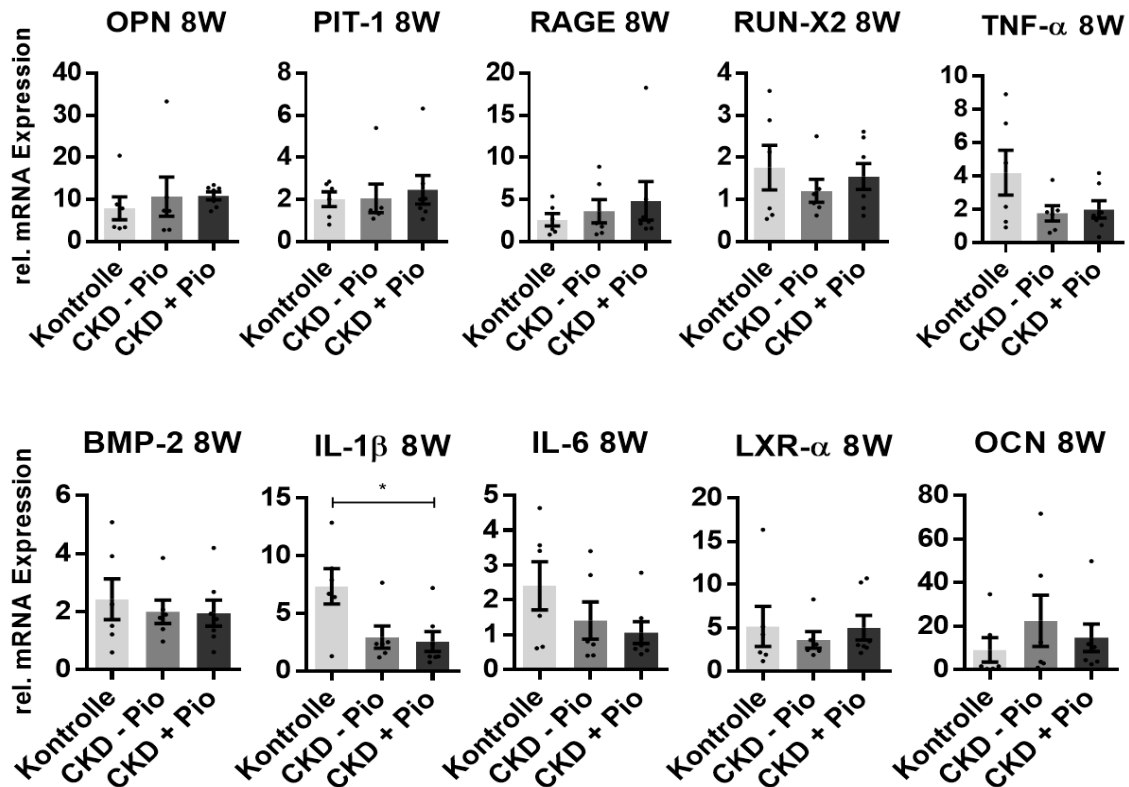


Abbildung 15: relative mRNA-Expression der inflammatorischen und chondro-osteogener sowie degenerativer Marker der 4 und 8 Wochen Gruppe. Es zeigte sich eine Zunahme der mRNA-Expression von IL-6 in der 4 Wochen CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur CKD + Pio Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 4 Wochen. Signifikant höhere Expression von IL-1 β in der Kontrollgruppe im Vergleich zur CKD + Pio Gruppe nach 8 Wochen sowie eine höhere Expression von OPN in der CKD – Pio Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 4 Wochen. *: $p < 0,05$. Abkürzungen: CKD – Pio – Niereninsuffizienz ohne Pioglitazon, CKD + Pio – Niereninsuffizienz mit Pioglitazon, mRNA – *Messenger ribonucleic acid*, BMP-2 – *Bone morphogenetic protein 2*, IL-1 β – *Interleukin-1 β* , IL-6 – *Interleukin-6*, OCN – *Osteocalcin*, OPN – *Osteopontin*, PIT-1 – *Pituitary-specific positive transcription factor 1*, RAGE – *Receptor for advanced glycation endproducts*, RUN-X2 – *Runt-related transcription factor 2*, TNF- α – *Tumor necrosis factor- α* .

5 Diskussion

5.1 Rattenmodell der chronischen Niereninsuffizienz mit Aortenkondukt

5.1.1 Modellvalidierung, Transfermöglichkeit, Limitierungen

Ein erster wichtiger Schritt der Forschungsarbeit war es, ein Tiermodell zu schaffen, das die menschliche Situation eines Patienten mit CKD und einem biologischen Ersatzverfahren möglichst genau nachbildet. Bereits in vorherigen Arbeiten unserer Forschungsgruppe konnte die Operationstechnik für ein Aorten-Allograft erfolgreich etabliert werden [61, 62, 64, 65, 67]. So war sichergestellt, dass der Operateur auf ein

breites Fundament an operativer Technik und Expertise der Forschungsgruppe zurückgreifen konnte.

Die Induktion der CKD mit 0,25 % Adenin führte zum signifikanten Anstieg des Kreatinins. Sowohl in der CKD – Pio Gruppe als auch in der CKD + Pio Gruppe lagen die Kreatininspiegel deutlich über denen der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis entspricht den Ergebnissen der Forschungsarbeiten, die dieses Rattenmodell zuvor beschrieben haben [33, 68]. Auch die Zunahme des Nierengewichts und die Veränderung der Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe entsprechen den Ergebnissen der genannten Studien. Die makroskopischen Bilder der Nieren mit mutmaßlich erkennbaren fibrotischen und ischämischen Anteilen stimmen mit der Beschreibung der Autoren überein, ebenso die Gewichtszunahme der Nieren. Weiterhin zeigte sich auch eine Zunahme der Harnsäurespiegel. Dies lässt sich durch die Umsetzung des Adenins über die Xanthinoxidase zu Harnsäure erklären. Die erhöhte Harnsäure ist unter anderem mit der CKD und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert [69]. Diese Ergebnisse werden in der Literatur mit dem Verlauf einer CKD eines Menschen verglichen und entsprechend als ein Vergleichsmodell herangezogen [32]. Auch die erhöhten Phosphatspiegel deuten auf einen biomineralisierenden Prozess hin, der mit dem fortschreitenden degenerativen Prozess der vaskulären Strukturen in Verbindung zu setzen sind, obwohl es zu keinem Anstieg des Kalziums gekommen ist. In einer weiteren Studie mit 0,75 % Adenin wurden diese Ergebnisse ebenfalls gefunden. Da es jedoch hierbei eher zu einem akuten Nierenversagen als einer CKD kam, ist dieses Modell nicht für unsere Forschungsfrage relevant [70]. Insgesamt kann man festhalten, dass das gewählte Modell den Ansprüchen gerecht wird. Bei einer längeren Versuchsdauer als den gewählten 8 Wochen kam es in Vergleichsstudien jedoch zum vorzeitigen Tod der Tiere, sodass wir bewusst einen Zeitraum von 8 Wochen gewählt haben. Sowohl die Konduitimplantation, die Induktion der Aortenklappeninsuffizienz sowie die Induktion der Niereninsuffizienz waren erfolgreich und konnten bemessen werden. Da es aufgrund der Tiergröße und der Schwierigkeiten und Risiken einer solchen Operation nicht möglich ist, die native Aorta und Aortenklappe inklusive Abgänge zu transplantieren, ist diese Technik mittels Konduitimplantation auf Höhe der Aorta abdominalis die einzige Möglichkeit, um den realen Bedingungen von transplantierten Patienten am nächsten zu kommen. Für eine realitätsnahe Operation müsste man ein größeres Tiermodell wählen. So gibt es bereits Forschungsarbeiten, die den Ersatz von Aortenklappen an Schafen getestet haben [71].

5.1.2 Metabolische Effekte von Pioglitazon im Modell der chronischen Niereninsuffizienz

Die CKD führt bekanntermaßen zu arteriosklerotischen Veränderungen des Gefäßsystems, insbesondere dann, wenn der Schweregrad der Erkrankung bereits den Mineral- und Knochenhaushalt des Patienten betrifft [72, 73]. Besonders kardiovaskuläre Erkrankungen und kardiovaskuläre Ereignisse wie die koronare Herzerkrankung, Schlaganfälle, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Arrhythmien, Herzinsuffizienz und thromboembolische Komplikationen führen zu einer deutlich erhöhten Mortalität der Patienten [74, 75]. Einige Therapeutika stehen hier bereits zur Verfügung, so werden *Sodium-Glucose Cotransporter-2* (SGLT2) Inhibitoren oder *Glucagon-like Peptide-1* (GLP-1) Rezeptoragonisten eingesetzt. Ebenso wird in den allermeisten Fällen eine Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern sowie eine Therapie mit *angiotensin-converting enzyme* (ACE) Hemmern durchgeführt [76]. Auch Statine zur Lipidsenkung finden routinemäßige Anwendung [77]. Die klinische Situation bleibt jedoch komplex – insbesondere bei Patienten mit CKD und einem Aortenklappenersatz, beispielsweise durch TAVI oder durch einen chirurgischen Aortenklappenersatz. In diesen Fällen kommt es häufig zu einem frühen Versterben [78].

Patienten mit CKD zeigen unter anderem erhöhte Kaliumwerte, die mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert sind [79, 80]. In Adenin-induzierten CKD-Tiermodellen sind Hyperkaliämien regelhaft beschrieben [81]. Auch in unserem Modell konnten in beiden CKD-Gruppen signifikant erhöhte Kaliumwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Während sich nach 4 Wochen jedoch nur eine nicht signifikante Tendenz von verminderten Kaliumwerten in der CKD + Pio Gruppe im Vergleich zur CKD – Pio Gruppe zeigte, so lässt sich nach 8 Wochen eine statistisch signifikante Reduktion der Kaliumwerte in der CKD + Pio Gruppe nachweisen. Auch die Phosphatkonzentrationen waren in den CKD-Gruppen deutlich erhöht. Nach 8 Wochen zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion in der CKD + Pio Gruppe im Vergleich zur CKD – Pio Gruppe. Erhöhte Phosphatspiegel sind – ähnlich wie Hyperkaliämien – mit einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko verbunden. Die Phosphatspiegel werden durch ein komplexes Zusammenspiel der Knochen, des Darms und der Niere reguliert [82]. Häufig zu beobachten bei CKD ist außerdem eine Verminderung des Serumkalziums durch verminderte 1,25-dihydroxy-Vitamin-D Spiegel [83]. In unserer Arbeit zeigte sich in beiden CKD-Gruppen eine Tendenz verminderter Kalziumspiegel, wenn auch nicht statistisch signifikant. In einer Vergleichsstudie unterschiedlicher CKD-

Tiermodelle zeigte sich ein ähnliches Bild hinsichtlich des Kalziumhaushalts bei Ratten unter 0,25 % Adeningabe [84, 85]. Verminderte GPT-Werte konnten ebenfalls in den CKD-Gruppen beobachtet werden, was sich mit den Daten bei Patienten mit CKD deckt [86]. Die zugrunde liegende Ursache hierfür ist Teil aktueller Studien und nicht abschließend geklärt. Durch die erhöhte Insulinsensitivität durch Pioglitazon lassen sich weiterhin die verminderten Plasmaglukosewerte erklären. Diese Tatsache ist ebenfalls bekannt und konnte ebenfalls in CKD-Kohorten nachgewiesen werden [87]. Gleichmaßen zeigte sich jedoch auch eine signifikante Erhöhung des LDL. In der Literatur wird hierbei teilweise zwischen *small dense LDL* (sdLDL) und größeren LDL unterschieden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das sdLDL niedriger war und die größeren LDL erhöht waren [88]. Hierdurch ließen sich die antiarteriosklerotischen Effekte durch Pioglitazon trotz Erhöhung des LDLs teilweise erklären, denn in unserer Arbeit konzentrierten wir uns ausschließlich auf das reguläre LDL. Weitere Untersuchungen bezüglich einer Differenzierung wären hierbei sinnvoll. Denn bekanntermaßen spielt das LDL eine große Rolle in der Atherogenese [89], scheint in unserem Modell jedoch trotz der nachgewiesenen positiven Effekte in der CKD + Pio Gruppe eine untergeordnete Rolle in der Atherogenese zu spielen.

5.1.3 Einfluss des Pioglitazons auf den Adiponektinstoffwechsel

Adiponektin nimmt eine besondere Stellung in der Reihe der Adipokine ein. Es nimmt in verschiedenen Geweben unterschiedliche Regulatorfunktionen wahr. So nimmt es im Fettgewebe eine Rolle ein, im Energiemetabolismus sowie in der Glukosehomöostase [90]. Das Adiponektin wird vom Fettgewebe in die Blutbahn ausgeschüttet und kann so an unterschiedlichen Stellen verschiedene weitere Funktionen übernehmen. Über eine Aktivierung des AMP-aktivierten Proteinkinase-Signalwegs (AMPK) und einer Hemmung des *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*-Signalwegs (NF-κB) kommt es zu einer systemischen Suppression von IL-6 und TNF-α, wodurch Adiponektin eine anti-inflammatorische Eigenschaft zugesprochen wird [91]. Im Skelettmuskel lässt sich eine insulinsensibilisierende Eigenschaft feststellen. Dies führt zu einer besseren Muskelfunktion und ebenso einer niedrigeren Inflammation [92]. Sehr hohe Adiponektinspiegel führen jedoch zu einer gegenteiligen Reaktion, da die vermehrte Phosphorylierung von AMPK die myotubulären Faserstärken vermindert und zu einem Zellschaden führen kann [93]. Die Frage, ob die steigenden Adiponektinspiegel zu einer besseren Konduktfunktion führen, muss kritisch hinterfragt werden. Die über

AMPK aktivierte Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) führt zu einer vermehrten NO-Produktion, was zu einer Gefäßprotektion und einer Gefäßdilatation durch zyklischem Guanosinmonophosphat (*cyclic Guanosine Monophosphate* - cGMP) führt [94]. Weiterhin inhibiert NO die Plättchenaggregation [45, 95, 96]. Antiarteriosklerotische Effekte von NO sind lange bekannt, dazu zählt die Hemmung von Leukozytenaggregation, antiapoptotische und antiinflammatorische Effekte [97]. Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren zeigen oft eine endotheliale Dysfunktion, die sich in einer verminderten Fähigkeit zeigt, ausreichend NO zu produzieren. Dieser Mangel an NO führt dazu, dass NO den oben genannten Funktionen nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung steht [98]. So konnte gezeigt werden, dass Adiponektin über AMPK und Cyclooxygenase-2 (COX-2) Signalwege eine Verminderung von Inflammation und Apoptose an Herzmuskelzellen herbeiführen konnte [99]. Gleichzeitig konnte man jedoch auch Situationen nachweisen, in denen erhöhte Adiponektinspiegel mit proinflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht wurden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass bei der rheumatoiden Arthritis erhöhte zirkulierende Adiponektinspiegel auftreten, obwohl die Höhe der Plasmaspiegel nicht mit der Aktivität der Erkrankung in Verbindung gesetzt werden konnte [100]. Die in unserem Modell herbeigeführte Erhöhung des Adiponektinspiegels als Zeichen einer erfolgreichen PPAR γ Aktivierung [101, 102] konnte bereits in vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe beschrieben werden [65]. Bei CKD-Patienten konnten diese Gegebenheiten ebenfalls festgestellt werden [87]. Die Ursache hierfür ist nicht abschließend geklärt. Möglicherweise gilt eine verminderte Ausscheidung über die Nieren bei fortschreitender CKD als Ursache. Für diese These würde die Tatsache sprechen, dass nach einer Nierentransplantation deutlich niedrigere Adiponektinspiegel festgestellt werden konnten als zuvor [103-105]. Der tatsächliche Nutzen erhöhter Adiponektinspiegel in Patientengruppen mit terminaler CKD ist jedoch umstritten. So wurde nachgewiesen, dass sich bei diesen Patientengruppen mit hohen Adiponektinspiegeln eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität feststellen ließ [106]. Genauere Untersuchungen zeigten jedoch die gesteigerte Mortalität lässt sich aufgrund eines *Protein-Energy-Wastings* (PEW) feststellen [107], welches im Zusammenhang mit hohen Adiponektinspiegeln steht [108]. Dass es sich hierbei also um einen unabhängigen Faktor bei CKD-Patienten handelt, gilt somit als unwahrscheinlich, zumal viele positive Eigenschaften von Adiponektin bekannt sind. In einem *Knock-out* Mausmodell konnte unter anderem ein direkter Zusammenhang zwischen einer deutlichen Intima-Media

Zunahme in den Karotiden festgestellt werden [109]. Weitere Studien über den genauen Zusammenhang zwischen hohen Adiponektinspiegeln, der arteriosklerotischen Achse und möglichen Begleitursachen sind zur abschließenden Klärung notwendig.

5.2 Modulierung des Aortenkonduits

5.2.1 *Early-Onset-Inflammation*

Im Rahmen einer Inflammation ist RAGE ein bekannter Mediator, der insbesondere in Phasen schwerer Inflammation wie z.B. eines septischen Krankheitsbildes vermehrt exprimiert wird [110]. Es konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass eine Inhibition von RAGE sowohl bei Typ 1-Diabetes als auch bei Typ 2-Diabetes zu einer Reduktion der arteriosklerotischen Ereignisse führt [111, 112]. Außerdem scheint es einen Zusammenhang zwischen der Expression von RAGE und dem klinischen Outcome von Patienten zu geben. Es bestand ein Zusammenhang zwischen vermehrter Expression und längerem Aufenthalt im Krankenhaus nach kardiovaskulären Operationen [113]. Ähnliche Konstellationen zeigten sich in klinischen Studien bei Patienten nach Lungentransplantationen mit einer erhöhten Expression von RAGE und einer *Primary Graft Dysfunction* [114]. In unserem Versuch konnten wir eine im Vergleich zur 8 Wochen Gruppe deutlich flächigere RAGE-assoziierte Fläche in der 4 Wochen Gruppe sehen, auch wenn sich zwischen den einzelnen Gruppen pro Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen. Nach ausführlicher Literaturrecherche konnten diesbezüglich keine vergleichbaren Daten gefunden werden. Möglicherweise ist dieses Phänomen auf die grundsätzlichen Inflammationsprozesse zurückzuführen, wenn auch in der *real-time qPCR* keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

5.2.2 Pioglitazons Einfluss auf weitere inflammatorische Parameter

Es konnte nachgewiesen werden, dass Pioglitazon zu anti-inflammatorischen Prozessen führt. So konnte unter anderem eine Reduktion von IL-6 und *monocyte chemoattractant protein-1*, einem Protein, das für die Initiierung lokaler Entzündungsprozesse bekannt ist, beobachtet werden. Weiterhin zeigten sich erhöhte Konzentrationen des pro-inflammatorischen Interleukin-10 [115]. In unserem Modell konnten wir eine signifikante Reduktion der IL-6 Expression in der Konduitregion unter der Applikation von Pioglitazon feststellen, was für eine lokale Wirksamkeit und Unterdrückung der pro-

inflammatorischen Eigenschaften des IL-6 spricht. Da IL-6 bekanntermaßen eine treibende Kraft für Graft-Degeneration ist, könnten diese Eigenschaften des IL-6 eine maßgebliche Rolle künftiger Entwicklungen darstellen [116, 117]. Weitere anti-inflammatorische Effekte von Pioglitazon konnten in unserem Modell nicht festgestellt werden, wenn auch bei TNF- α und IL-1 β deutliche Trends zu einer verminderten Expression zu erkennen waren. Mögliche Ursache könnte die Tatsache sein, dass Pioglitazon ein schwacher PPAR- α Agonist ist und die anti-inflammatorischen Eigenschaften insbesondere über den PPAR- α Signalweg vermittelt werden, sodass stärkere Effekte hier ausbleiben [118, 119]. Diese These wird durch die ebenfalls über den PPAR- α Signalweg vermittelte, im Fall von Pioglitazon jedoch ausbleibende Senkung der Triglycerid- und LDL-Spiegel gestützt [120].

5.2.3 Wirkung auf chondro-osteogene Prozesse

Die von uns untersuchten chondro-osteogenen Marker wie OPN, PIT-1, BMP-2 oder OCN zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der CKD – Pio und CKD + Pio Gruppe. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied von OPN nach 4 Wochen zwischen der Kontrollgruppe und der CKD – Pio Gruppe. Dieser Zusammenhang zwischen PPAR γ und erhöhter OPN-Expression wurde bereits im Rahmen einer diabetischen Nephropathie untersucht und festgestellt [121]. Auch hier zeigt sich eine Tendenz zu einer verminderten Expression in der CKD + Pio Gruppe im Vergleich zur CKD – Pio Gruppe. Möglicherweise liegt die erhöhte Expression der oben genannten Marker an einer bei der CKD vorbeschriebenen Hyperphosphatämie, bei der es zu einer Überexpression von OPN, RUNX2, ALPL und PIT-1 kommt [122]. Ursächlich könnte hier eine wie zuvor beschriebene verminderte RAGE-Expression sein, die bei chondro-osteogenen Prozessen eine wichtige Funktion einnimmt [123, 124].

5.2.4 Hemmung kalzifizierender proliferativer Prozesse am Aortenkonduit

Wir konnten nachweisen, dass sich in der CKD + Pio Gruppe signifikant geringere Kalzifikationen anhand des von-Kossa Scores feststellen ließen. Sowohl in der 4 Wochen als auch in der 8 Wochen Gruppe wurden insbesondere im Bereich der Intima geringere Kalzifikationen in der CKD + Pio Gruppe im Vergleich zur CKD – Pio Gruppe beobachtet. Zudem zeigte sich bereits nach 4 Wochen im Bereich der Aortenklappe des Konduits ein signifikant niedriger von-Kossa Score unter Pioglitazon, was auf eine

geringere Graftdegeneration hindeutet. Weiterhin zeigten sich deutliche Tendenzen in nahezu allen übrigen Bereichen des Aortenkonduits, die auf eine verminderte Kalzifikation in der Gruppe unter Pioglitazon hindeuten. Eine mögliche Ursache für fehlende statistische Signifikanz könnte die eher kleine Untersuchungsgruppe. Grundsätzlich liegt die Ursache der Mediaverkalkung zumeist an einer chronischen Erkrankung wie die CKD. Die Intimaverkalkung wird vermehrt mit arteriosklerotischen Ereignissen wie z.B. auf der Basis erhöhter Lipidlevel assoziiert [125]. Beide Mechanismen lassen sich in unserem Projekt identifizieren. Zum einen ließen sich die erhöhten LDL-Werte beschreiben, die sich durch die Aktivierung von PPAR γ und die damit verbundene Umstrukturierung des Fettstoffwechsels erklären lassen. Zum anderen zeigten sich in beiden CKD-Gruppen deutlichere Verkalkungen als in der Kontrollgruppe.

Des Weiteren konnte durch die Verabreichung von Pioglitazon eine Intimahyperplasie vermieden werden. Besonders nach 8 Wochen zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied. Die Fähigkeit von Pioglitazon, eine Intimahyperplasie zu verhindern, wurde bereits in weiteren Studien dargestellt [115, 126]. Diese Effekte waren auch unabhängig von der metabolischen Stoffwechsellage zu erkennen und untermauern einen direkten Einfluss von Pioglitazon auf die lokale Veränderung der Blutgefäße. Diese Tatsache ließ sich aufgrund gleicher Glukosewerte sowie gleicher Phosphat- und Kalziumwerte in unserem Modell bestätigen.

5.3 Ausblick auf weitere Forschung

Wir konnten in dieser Arbeit demonstrieren, dass Pioglitazon vielfältige positive Effekte auf die in-vivo Degeneration von Aorten-Allografts in einem Rattenmodell der CKD hat. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die CKD eine sehr komplexe Erkrankung ist, die im klinischen Alltag ein individuell angepasstes und vielschichtiges Therapieschema erfordert. Die exakte Nachbildung einer solchen klinischen Situation im Tiermodell – insbesondere, wenn hierzu noch eine weitere, sehr komplexe Situation wie die Implantation eines Aorten-Allografts hinzukommt, ist gewiss schwierig. Nichtsdestotrotz bleibt zu erwähnen, dass wir mit dieser Forschung ein bislang unerforschtes Feld innerhalb eines hochkomplexen Themas beleuchtet haben. Patienten mit einer CKD nehmen häufig viele verschiedene Medikamente ein, unter anderem deshalb, weil durch die verschiedenen therapeutischen Angriffspunkte ein möglichst umfassender Schutz erzielt werden kann. Gleichzeitig stellt Komedikation die Forschung vor schwierige

Aufgaben. Genauere Untersuchungen bezüglich des Lipidstoffwechsels hinsichtlich unterschiedlich gewichteter Lipide wären von großer Relevanz. Außerdem wären eine längere Dauer und größere Studienpopulation von Vorteil, um Ausschläge in ihrer Aussagekraft etwas relativieren zu können. Weiterhin ist auch die Untersuchung an größeren Tieren wie z.B. Schweinen interessant. Zusätzlich könnten retrospektive Daten von Patienten mit Pioglitazon in der Medikation genauere Aufschlüsse über Komedikation, Stoffwechsel und klinische Parameter liefern. Langfristig ist sicherlich auch eine randomisiert kontrollierte Studie eine wichtige Instanz, um die Aussagekraft der bisherigen Ergebnisse weiter zu erhöhen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Coffey, S., et al., *Global epidemiology of valvular heart disease*. Nat Rev Cardiol, 2021. **18**(12): p. 853-864.
2. Yi, B., et al., *Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories*. Aging (Albany NY), 2021. **13**(9): p. 12710-12732.
3. Yadgir, S., et al., *Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990–2017*. Circulation, 2020. **141**(21): p. 1670-1680.
4. Kraler, S., et al., *Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy*. Eur Heart J, 2022. **43**(7): p. 683-697.
5. Moncla, L.M., et al., *Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment*. Nat Rev Cardiol, 2023. **20**(8): p. 546-559.
6. Hulin, A., et al., *Macrophage Transitions in Heart Valve Development and Myxomatous Valve Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018. **38**(3): p. 636-644.
7. Driscoll, K., A.D. Cruz, and J.T. Butcher, *Inflammatory and Biomechanical Drivers of Endothelial-Interstitial Interactions in Calcific Aortic Valve Disease*. Circ Res, 2021. **128**(9): p. 1344-1370.
8. Frey, N., et al., *Symptoms, disease severity and treatment of adults with a new diagnosis of severe aortic stenosis*. Heart, 2019. **105**(22): p. 1709-1716.
9. Vahanian, A., et al., *2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)*. European Heart Journal, 2021. **43**(7): p. 561-632.
10. Kanwar, A., J.J. Thaden, and V.T. Nkomo, *Management of Patients With Aortic Valve Stenosis*. Mayo Clinic Proceedings, 2018. **93**(4): p. 488-508.
11. Chiang, Y.P., et al., *Survival and Long-term Outcomes Following Bioprosthetic vs Mechanical Aortic Valve Replacement in Patients Aged 50 to 69 Years*. JAMA, 2014. **312**(13): p. 1323.
12. Stassano, P., et al., *Aortic valve replacement: a prospective randomized evaluation of mechanical versus biological valves in patients ages 55 to 70 years*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(20): p. 1862-8.
13. Côté, N., P. Pibarot, and M.-A. Clavel, *Incidence, risk factors, clinical impact, and management of bioprosthesis structural valve degeneration*. Current Opinion in Cardiology, 2017. **32**(2): p. 123-129.
14. Jamieson, W.R., et al., *Re-operation for bioprosthetic aortic structural failure - risk assessment*. Eur J Cardiothorac Surg, 2003. **24**(6): p. 873-8.
15. Leontyev, S., et al., *Redo aortic valve surgery: early and late outcomes*. Ann Thorac Surg, 2011. **91**(4): p. 1120-6.
16. Nitsche, C., et al., *Determinants of Bioprosthetic Aortic Valve Degeneration*. JACC Cardiovasc Imaging, 2020. **13**(2 Pt 1): p. 345-353.
17. Rodriguez-Gabella, T., et al., *Aortic Bioprosthetic Valve Durability: Incidence, Mechanisms, Predictors, and Management of Surgical and Transcatheter Valve Degeneration*. Journal of the American College of Cardiology, 2017. **70**(8): p. 1013-1028.

18. Stevens, P.E., et al., *KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. Kidney International, 2024. **105**(4): p. S117-S314.
19. Hill, N.R., et al., *Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLOS ONE, 2016. **11**(7): p. e0158765.
20. Kunihiro, M., et al., *Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis*. The Lancet, 2010. **375**(9731): p. 2073-2081.
21. Matsushita, K., S.H. Ballew, and J. Coresh, *Cardiovascular risk prediction in people with chronic kidney disease*. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2016. **25**(6): p. 518-523.
22. Chen, T.K., D.H. Knicely, and M.E. Grams, *Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management*. JAMA, 2019. **322**(13): p. 1294.
23. Brandenburg, V.M., A. Schuh, and R. Kramann, *Valvular Calcification in Chronic Kidney Disease*. Advances in Chronic Kidney Disease, 2019. **26**(6): p. 464-471.
24. Palit, S. and J. Kendrick, *Vascular calcification in chronic kidney disease: role of disordered mineral metabolism*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(37): p. 5829-33.
25. Zentner, D., et al., *Prospective evaluation of aortic stenosis in end-stage kidney disease: a more fulminant process?* Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(5): p. 1651-5.
26. Giachelli, C.M., *The emerging role of phosphate in vascular calcification*. Kidney Int, 2009. **75**(9): p. 890-7.
27. Rossebø, A.B., et al., *Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(13): p. 1343-1356.
28. London, G.M., et al., *Calcification of the Aortic Valve in the Dialyzed Patient*. Journal of the American Society of Nephrology, 2000. **11**(4).
29. Askari, H., B. Seifi, and M. Kadkhodaei, *Evaluation of Renal-Hepatic Functional Indices and Blood Pressure Based on the Progress of Time in a Rat Model of Chronic Kidney Disease*. Nephrourol Mon, 2016. **8**(3): p. e37840.
30. Han, Y., et al., *Rutin ameliorates renal fibrosis and proteinuria in 5/6-nephrectomized rats by anti-oxidation and inhibiting activation of TGFβ1-smad signaling*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(5): p. 4725-34.
31. Ghosh, S.S., et al., *Curcumin ameliorates renal failure in 5/6 nephrectomized rats: role of inflammation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(5): p. F1146-57.
32. Yokozawa, T., et al., *Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats*. Nephron, 1986. **44**(3): p. 230-4.
33. Diwan, V., L. Brown, and G.C. Gobe, *Adenine-induced chronic kidney disease in rats*. Nephrology (Carlton), 2018. **23**(1): p. 5-11.
34. Coletta, D.K., et al., *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, 2009. **52**(4): p. 723-32.
35. Erdmann, E., et al., *Ten-year observational follow-up of PROactive: a randomized cardiovascular outcomes trial evaluating pioglitazone in type 2 diabetes*. Diabetes Obes Metab, 2016. **18**(3): p. 266-73.
36. Lebovitz, H.E., *Thiazolidinediones: the Forgotten Diabetes Medications*. Curr Diab Rep, 2019. **19**(12): p. 151.

37. Li, A.C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 523-31.
38. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications*. Vascu Pharmacol, 2006. **45**(1): p. 19-28.
39. Dormandy, J.A., et al., *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, 2005. **366**(9493): p. 1279-1289.
40. de Jong, M., et al., *Pioglitazone and the secondary prevention of cardiovascular disease. A meta-analysis of randomized-controlled trials*. Cardiovascular Diabetology, 2017. **16**(1): p. 134.
41. Lincoff, A.M., et al., *Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials*. Jama, 2007. **298**(10): p. 1180-8.
42. Kernan, W.N., et al., *Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack*. N Engl J Med, 2016. **374**(14): p. 1321-31.
43. Collins, A.R., et al., *Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(3): p. 365-71.
44. Viswakarma, N., et al., *Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression*. PPAR Res, 2010. **2010**.
45. Alheid, U., J.C. Frölich, and U. Förstermann, *Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets*. Thromb Res, 1987. **47**(5): p. 561-71.
46. Papaetis, G.S., *Pioglitazone in diabetic kidney disease: forgotten but not gone*. Archives of Medical Science – Atherosclerotic Diseases, 2022. **7**(1): p. 78-93.
47. Yen, C.-L., et al., *Pioglitazone Reduces Mortality and Adverse Events in Patients With Type 2 Diabetes and With Advanced Chronic Kidney Disease: National Cohort Study*. Diabetes Care, 2020. **43**(10): p. e152-e153.
48. Kasliwal, R., L.V. Wilton, and S.A. Shakir, *Monitoring the safety of pioglitazone : results of a prescription-event monitoring study of 12,772 patients in England*. Drug Saf, 2008. **31**(10): p. 839-50.
49. Erdmann, E., et al., *Pioglitazone use and heart failure in patients with type 2 diabetes and preexisting cardiovascular disease: data from the PROactive study (PROactive 08)*. Diabetes Care, 2007. **30**(11): p. 2773-8.
50. Betteridge, D.J., *Thiazolidinediones and fracture risk in patients with Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2011. **28**(7): p. 759-71.
51. Fong, D.S. and R. Contreras, *Glitazone use associated with diabetic macular edema*. Am J Ophthalmol, 2009. **147**(4): p. 583-586.e1.
52. Azoulay, L., et al., *The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study*. Bmj, 2012. **344**: p. e3645.
53. Lewis, J.D., et al., *Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study*. Diabetes Care, 2011. **34**(4): p. 916-22.
54. Schernthaner, G., C.J. Currie, and G.H. Schernthaner, *Do we still need pioglitazone for the treatment of type 2 diabetes? A risk-benefit critique in 2013*. Diabetes Care, 2013. **36 Suppl 2**(Suppl 2): p. S155-61.

55. Kanter, K.R., P.M. Kirshbom, and B.E. Kogon, *Redo aortic valve replacement in children*. Ann Thorac Surg, 2006. **82**(5): p. 1594-7.
56. Kowert, A., et al., *Outcome after homograft redo operation in aortic position*. Eur J Cardiothorac Surg, 2012. **41**(2): p. 404-8.
57. Jiang, C., A.T. Ting, and B. Seed, *PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 82-6.
58. Marx, N., et al., *PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis*. Circ Res, 2002. **90**(6): p. 703-10.
59. Ricote, M., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
60. Li, F., et al., *Pioglitazone attenuates progression of aortic valve calcification via down-regulating receptor for advanced glycation end products*. Basic Research in Cardiology, 2012. **107**(6).
61. Assmann, A., et al., *Development of a growing rat model for the in vivo assessment of engineered aortic conduits*. J Surg Res, 2012. **176**(2): p. 367-75.
62. Assmann, A.K., et al., *A Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists in Counteracting the Degeneration of Cardiovascular Grafts*. J Cardiovasc Pharmacol, 2021. **79**(1): p. e103-e115.
63. Lindman, B.R. and J.N. Patel, *Multimorbidity in Older Adults with Aortic Stenosis*. Clinics in Geriatric Medicine, 2016. **32**(2): p. 305-314.
64. Assmann, A.K., et al., *Impact of PPAR-gamma activation on the durability of biological heart valve prostheses in hypercholesterolaemic rats*. Eur J Cardiothorac Surg, 2022. **63**(1).
65. Katahira, S., et al., *PPAR-Gamma Activation May Inhibit the In Vivo Degeneration of Bioprosthetic Aortic and Aortic Valve Grafts under Diabetic Conditions*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(20).
66. Munakata, H., et al., *Aortic conduit valve model with controlled moderate aortic regurgitation in rats: a technical modification to improve short- and long-term outcome and to increase the functional results*. Circ J, 2013. **77**(9): p. 2295-302.
67. Sugimura, Y., et al., (*) *A Rat Model for the In Vivo Assessment of Biological and Tissue-Engineered Valvular and Vascular Grafts*. Tissue Eng Part C Methods, 2017. **23**(12): p. 982-994.
68. Diwan, V., et al., *Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2013. **68**(2): p. 197-207.
69. Cameron, J.S., *Uric Acid and renal disease*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2006. **25**(9-11): p. 1055-64.
70. Saito, H., et al., *Analysis of bone in adenine-induced chronic kidney disease model rats*. Osteoporos Sarcopenia, 2021. **7**(4): p. 121-126.
71. Theodoridis, K., et al., (*) *Six-Year-Old Sheep as a Clinically Relevant Large Animal Model for Aortic Valve Replacement Using Tissue-Engineered Grafts Based on Decellularized Allogenic Matrix*. Tissue Eng Part C Methods, 2017. **23**(12): p. 953-963.
72. Reiss, A.B., et al., *CKD, arterial calcification, atherosclerosis and bone health: Inter-relationships and controversies*. Atherosclerosis, 2018. **278**: p. 49-59.
73. Yamada, S. and T. Nakano, *Role of Chronic Kidney Disease (CKD)-Mineral and Bone Disorder (MBD) in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease in CKD*. J Atheroscler Thromb, 2023. **30**(8): p. 835-850.

74. Matsushita, K., et al., *Epidemiology and risk of cardiovascular disease in populations with chronic kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2022. **18**(11): p. 696-707.
75. Sarnak, M.J., et al., *Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Disease: JACC State-of-the-Art Review*. J Am Coll Cardiol, 2019. **74**(14): p. 1823-1838.
76. Jankowski, J., et al., *Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options*. Circulation, 2021. **143**(11): p. 1157-1172.
77. Baigent, C., et al., *The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2011. **377**(9784): p. 2181-92.
78. Jacquemyn, X., et al., *Transcatheter aortic valve implantation versus surgical aortic valve replacement in chronic kidney disease: Meta-analysis of reconstructed time-to-event data*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2024. **34**(5): p. 317-324.
79. Collins, A.J., et al., *Association of Serum Potassium with All-Cause Mortality in Patients with and without Heart Failure, Chronic Kidney Disease, and/or Diabetes*. American Journal of Nephrology, 2017. **46**(3): p. 213-221.
80. Costa, D., et al., *Hyperkalemia in CKD: an overview of available therapeutic strategies*. Frontiers in Medicine, 2023. **10**.
81. Ashour, W.M.R., et al., *Effect of fetuin-A on adenine-induced chronic kidney disease model in male rats*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2023. **26**(5): p. 511-516.
82. Barreto, F.C., et al., *Strategies for Phosphate Control in Patients With CKD*. Kidney International Reports, 2019. **4**(8): p. 1043-1056.
83. Felsenfeld, A.J., B.S. Levine, and M. Rodriguez, *Pathophysiology of Calcium, Phosphorus, and Magnesium Dysregulation in Chronic Kidney Disease*. Seminars in Dialysis, 2015. **28**(6): p. 564-577.
84. Shobeiri, N., M.A. Adams, and R.M. Holden, *Vascular Calcification in Animal Models of CKD: A Review*. American Journal of Nephrology, 2010. **31**(6): p. 471-481.
85. Neven, E., et al., *Disturbances in Bone Largely Predict Aortic Calcification in an Alternative Rat Model Developed to Study Both Vascular and Bone Pathology in Chronic Kidney Disease*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(12): p. 2313-24.
86. Ray, L., et al., *A comparative study of serum aminotransferases in chronic kidney disease with and without end-stage renal disease: Need for new reference ranges*. International Journal of Applied and Basic Medical Research, 2015. **5**(1): p. 31-35.
87. Zanchi, A., et al., *Pioglitazone Improves Fat Distribution, the Adipokine Profile and Hepatic Insulin Sensitivity in Non-Diabetic End-Stage Renal Disease Subjects on Maintenance Dialysis: A Randomized Cross-Over Pilot Study*. PLOS ONE, 2014. **9**(10): p. e109134.
88. Hanefeld, M., *The role of pioglitazone in modifying the atherogenic lipoprotein profile*. Diabetes Obes Metab, 2009. **11**(8): p. 742-56.
89. Qiao, Y.N., Y.L. Zou, and S.D. Guo, *Low-density lipoprotein particles in atherosclerosis*. Front Physiol, 2022. **13**: p. 931931.
90. Kuryszko, J., P. Sławuta, and G. Sapikowski, *Secretory function of adipose tissue*. Pol J Vet Sci, 2016. **19**(2): p. 441-6.

91. Chandrasekar, B., et al., *Adiponectin blocks interleukin-18-mediated endothelial cell death via APPL1-dependent AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and IKK/NF-kappaB/PTEN suppression*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24889-98.
92. Krause, M.P., K.J. Milne, and T.J. Hawke, *Adiponectin-Consideration for its Role in Skeletal Muscle Health*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(7).
93. Ito, R., et al., *Activation of adiponectin receptors has negative impact on muscle mass in C2C12 myotubes and fast-type mouse skeletal muscle*. PLoS One, 2018. **13**(10): p. e0205645.
94. Deng, G., et al., *Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(1): p. 165-71.
95. Busse, R., A. Lückhoff, and E. Bassenge, *Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1987. **336**(5): p. 566-71.
96. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide*. Br J Pharmacol, 1987. **92**(3): p. 639-46.
97. Dimmeler, S. and A.M. Zeiher, *Nitric oxide-an endothelial cell survival factor*. Cell Death Differ, 1999. **6**(10): p. 964-8.
98. Förstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
99. Rojas, E., et al., *The role of adiponectin in endothelial dysfunction and hypertension*. Curr Hypertens Rep, 2014. **16**(8): p. 463.
100. Lee, Y.H. and S.C. Bae, *Circulating adiponectin and visfatin levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: A meta-analysis*. Int J Rheum Dis, 2018. **21**(3): p. 664-672.
101. Iwaki, M., et al., *Induction of Adiponectin, a Fat-Derived Antidiabetic and Antiatherogenic Factor, by Nuclear Receptors*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1655-1663.
102. Maeda, N., et al., *PPAR γ Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein*. Diabetes, 2001. **50**(9): p. 2094-2099.
103. Chudek, J., et al., *Plasma adiponectin concentration before and after successful kidney transplantation*. Transplant Proc, 2003. **35**(6): p. 2186-9.
104. Halberg, N., et al., *Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin*. Diabetes, 2009. **58**(9): p. 1961-70.
105. Song, S.H., et al., *High serum adiponectin as a biomarker of renal dysfunction: Results from the KNOW-CKD study*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 5598.
106. Menon, V., et al., *Adiponectin and mortality in patients with chronic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2599-606.
107. Park, S.H., et al., *Adiponectin in chronic kidney disease has an opposite impact on protein-energy wasting and cardiovascular risk: two sides of the same coin*. Clin Nephrol, 2009. **72**(2): p. 87-96.
108. Hyun, Y.Y., et al., *Serum adiponectin and protein-energy wasting in predialysis chronic kidney disease*. Nutrition, 2017. **33**: p. 254-260.
109. Matsuda, M., et al., *Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37487-91.
110. Hofer, S., et al., *RAGE-mediated inflammation in patients with septic shock*. J Surg Res, 2016. **202**(2): p. 315-27.

111. Schmidt, A.M., et al., *Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis*. Circ Res, 1999. **84**(5): p. 489-97.
112. Wendt, T., et al., *RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes*. Atherosclerosis, 2006. **185**(1): p. 70-7.
113. Creagh-Brown, B.C., et al., *Association between preoperative plasma sRAGE levels and recovery from cardiac surgery*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 496031.
114. Christie, J.D., et al., *Plasma levels of receptor for advanced glycation end products, blood transfusion, and risk of primary graft dysfunction*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(10): p. 1010-5.
115. Hong, S.J., et al., *Cellular and Molecular Changes Associated With Inhibitory Effect of Pioglitazone on Neointimal Growth in Patients With Type 2 Diabetes After Zotarolimus-Eluting Stent Implantation*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010. **30**(12): p. 2655-2665.
116. Meng, Z., et al., *Sevelamer Attenuates Bioprosthetic Heart Valve Calcification*. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2021. **8**.
117. Sun, H., et al., *The Effects of C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- α in Rat Allograft Adventitial Inflammation and Allograft Arteriosclerosis*. Transplantation Proceedings, 2009. **41**(9): p. 3909-3912.
118. Orasanu, G., et al., *The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Agonist Pioglitazone Represses Inflammation in a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α -Dependent Manner In Vitro and In Vivo in Mice*. Journal of the American College of Cardiology, 2008. **52**(10): p. 869-881.
119. Sakamoto, J., et al., *Activation of Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Subtypes by Pioglitazone*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **278**(3): p. 704-711.
120. Han, C.-L. and C.-Z. Qu, *Cardiovascular Risk and Safety Evaluation of a Dual Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha/Gamma Agonist, Aleglitazar, in Patients With Type 2 Diabetes: A Meta-analysis*. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2020. **75**(4): p. 351-357.
121. Nicholas, S.B., et al., *Critical role for osteopontin in diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2010. **77**(7): p. 588-600.
122. Tani, T., et al., *Development of a novel chronic kidney disease mouse model to evaluate the progression of hyperphosphatemia and associated mineral bone disease*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 2233.
123. Belmokhtar, K., et al., *Receptor for advanced glycation end products: a key molecule in the genesis of chronic kidney disease vascular calcification and a potential modulator of sodium phosphate co-transporter PIT-1 expression*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2019. **34**(12): p. 2018-2030.
124. Cecil, D.L. and R.A. Terkeltaub, *Arterial calcification is driven by RAGE in Enpp1-/- mice*. J Vasc Res, 2011. **48**(3): p. 227-35.
125. Lee, S.J., I.K. Lee, and J.H. Jeon, *Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
126. Marx, N., et al., *Pioglitazone Reduces Neointima Volume After Coronary Stent Implantation*. Circulation, 2005. **112**(18): p. 2792-2798.

6 Anhang

1) HE-Färbung

- 1 min Hämatoxylin
- 1 min dH₂O
- 1 min 4-5 % Essigsäure
- 1 min dH₂O
- 2 min unter fließendem Leitungswasser
- 1 min 70 % Alkohol
- 12 min Eosin B
- 1 min 70 % Ethanol
- 2 x 1 min 96 % Ethanol
- 2 x 1 min 100 % Ethanol
- 2 x 1 min Xylol
- Trocknen lassen und mit RotiHisto Kit II eindecken

2) Von Kossa Färbung

- 8 min Aceton bei -20 °C
- 5 min Lufttrocknen
- Eintauchen in dH₂O
- 60 min in 5 % Silbernitratlösung unter einer Neonröhre
- 3 x 3 min spülen mit dH₂O
- 2 min Natriumkarbonat-Formaldehydlösung
- 10 min unter fließendem Leitungswasser
- 5 min in 5 % Natriumthiosulfatlösung
- 15 min unter fließendem Leitungswasser
- 3 min dH₂O
- 10 min Kernechtrot-Aluminiumsulfat
- 3 min dH₂O
- Entwässern über aufsteigende Alkoholreihe, je 2 min 50 %, 70 %, 90 %, 100 % Ethanol
- 2 x 5 min Xylol
- Trocknen lassen und mit RotiHisto Kit II eindecken

3) Alizarin-Rot-S-Färbung

- 10 min 4 % Formaldehydlösung
- 2 min in 2 % Alizarinlösung
- Überschüssiges Alizarin abschütteln
- Eintauchen in dH₂O
- 20 x in Aceton eintauchen
- 20 x in Aceton-Xylol (1:1) eintauchen
- 10 x in Xylol eintauchen, bis die Objektträger gesäubert sind
- Trocknen lassen und mit RotiHisto Kit II eindecken

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari. Schon früh im Studium konnte er mich für die Arbeit im Labor der Experimentellen Chirurgie begeistern. Seine Tätigkeit – die einzigartige Verbindung aus klinischer Praxis und Forschung – war für mich stets ein großes Vorbild.

Ebenso danke ich Frau Dr. Mareike Barth. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung hätte ich dieses Promotionsprojekt nicht vollenden können. Sie hatte stets ein offenes Ohr für mich. Fachlich wie menschlich habe ich viel von ihr gelernt. Ihre Fähigkeit, auch in herausfordernden Zeiten den Überblick zu behalten und alles perfekt zu organisieren, beeindruckt mich bis heute – und ist etwas, das ich mir immer zum Vorbild nehme.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Shintaro Katahira, der – fernab seiner Heimat Japan – mit großem Einsatz gemeinsam dieses Projekt vorangebracht hat.

Für die Übernahme der Zweitbegutachtung danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Jung, der mit seiner Bereitschaft einen wertvollen Beitrag zum Abschluss dieses Projekts geleistet hat.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine gute Freundin Frau Dr. Vera Schmidt. Ohne dich wäre meine Zeit im Labor nur halb so erträglich – und vor allem nur halb so lustig gewesen. Ich habe hier nicht nur eine hervorragende Wissenschaftlerin, sondern auch eine Freundin fürs Leben gefunden.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken.

Eure unerschütterliche Unterstützung, euer Vertrauen in meine Fähigkeiten und euer beständiger Rückhalt in allen Phasen meines Lebens haben mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Durch euch habe ich Liebe, Empathie und Zusammenhalt erfahren. Ihr habt mir beigebracht, dass es sich lohnt, weiterzumachen – selbst, wenn einmal etwas nicht auf Anhieb gelingt. Diese Werte und diese Kraft werden mich mein Leben lang begleiten. Danke!

Besonders danken möchte ich an dieser Stelle meinem Großvater Horst Döpp.

Deine Wissbegierde in allen Lebensbereichen hat mich zutiefst geprägt. Du hast dich nie mit einfachen Antworten zufriedengegeben und dich stets für alles begeistert, was ich getan habe. Dein wacher, intellektueller Geist war ein großes Vorbild für mich – und wird es immer bleiben. Auch wenn du den Abschluss dieser Arbeit nicht mehr erlebt hast, so weiß ich sicher, dass du sehr stolz auf mich bist. Danke für alles. Du fehlst mir.