

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

Einfluss der PPAR γ -Aktivierung auf die Degeneration klappentragender
Aortenbioprothesen in einem diabetischen Rattenmodell

Dissertation

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

Vorgelegt von
Sophia Luisa Grupp

2026

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Neukirchen

Diese Arbeit widme ich
in Liebe und tiefer Dankbarkeit
meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Katahira, S., Sugimura, Y., Grupp, S., Doepp, R., Selig, J. I., Barth, M., Lichtenberg, A., Akhyari, P. (2021). PPAR-Gamma Activation May Inhibit the In Vivo Degeneration of Bioprosthetic Aortic and Aortic Valve Grafts under Diabetic Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11081.

Zusammenfassung

Die Zahl kardiovaskulärer Bioprothesenimplantationen nimmt stetig zu – insbesondere im Bereich der Aortenklappen, deren Ersatz in den Industrienationen die häufigste Form des Herzklappenersatzes darstellt. Bioprothesen unterliegen jedoch einer kalzifizierenden Degeneration, wodurch ihre strukturelle Haltbarkeit begrenzt ist. Diabetes mellitus gilt in diesem Zusammenhang als bedeutender Risikofaktor für die beschleunigte Degeneration, da er inflammatorische und metabolische Prozesse fördert. Vor diesem Hintergrund rückt die Forschung zur Verbesserung der strukturellen Haltbarkeit bioprothetischer Klappen unter diabetischen Bedingungen zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus. Pioglitazon, ein Agonist des Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) aus der Klasse der oralen Antidiabetika, erwies sich in klinischen Studien als protektiv gegenüber der Progression der Arteriosklerose und wird mit antiinflammatorischen Effekten assoziiert. Experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass Pioglitazon die Kalzifikation nativer Aortenklappen hemmen kann. Ob und inwiefern sich diese Effekte auch auf kardiovaskuläre Bioprothesen unter diabetischen Bedingungen übertragen lassen, ist bislang jedoch unzureichend untersucht. Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, den Einfluss von Pioglitazon auf die in vivo-Degeneration klappentragender Aortenbioprothesen unter diabetischen Bedingungen in einem bereits etablierten Rattenmodell der heterotopen Implantation zu untersuchen. Drei Gruppen à 20 männlichen Wistar-Ratten (n=60) wurden allogene kryokonservierte klappentragende Aortenbioprothesen infrarenal an die Aorta abdominalis implantiert und nach 4 sowie 12 Wochen auf degenerative Veränderungen analysiert. Zwei der Gruppen (DM-Gruppe und DM+Pio-Gruppe; n=40) wurden vor der Implantation mittels intraperitonealer Streptozotocin-Injektion sowie einer high-fat diet eine diabetische Stoffwechsellage induziert. Eine dieser Gruppen (Pio-Gruppe, n=20) erhielt zusätzlich Pioglitazon über das Futter (150 mg/kg). Die Kontrollgruppe (n=20) erhielt normal-diätisches Futter. Die klappentragenden Aortenbioprothesen wurden nach 4 (Kurzzeitversuch) bzw. 12 Wochen (Langzeitversuch) explantiert und anschließend mittels histologischer, immunhistochemischer Verfahren sowie quantitativer PCR analysiert. Unter diabetischen Bedingungen wurde nach 4 Wochen eine signifikante Mediaproliferation beobachtet. Die zusätzliche Gabe von Pioglitazon führte sowohl nach 4 Wochen ($p = 0,0002$) als auch nach 12 Wochen ($p = 0,0107$) zu einer signifikanten Reduktion der Mediabreite. Darüber hinaus war die Kalzifikation der Media nach 12 Wochen unter Pioglitazon signifikant gehemmt ($p = 0,0079$). Die Genexpressionsanalyse ergab zudem nach 4 Wochen eine signifikante Abnahme der chondro-osteogenen Marker Osteopontin und BMP-2 unter Pioglitazon. Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Pioglitazon der strukturellen Degeneration von Bioprothesen unter diabetischen Bedingungen entgegenwirken kann. Bei der Einordnung der Ergebnisse sollten methodische Einschränkungen berücksichtigt werden, insbesondere die heterotope Implantation mit reduzierter hämodynamischer Belastung sowie die begrenzte Beobachtungsdauer in einem Kleintiermodell. Gleichwohl leistet die vorliegende Arbeit einen relevanten Beitrag zum Verständnis degenerativer Prozesse biologischer Transplantate unter diabetischen Bedingungen und liefert

experimentelle Hinweise auf einen potenziellen therapeutischen Ansatz durch die Aktivierung von PPAR γ . Um das therapeutische Potenzial von PPAR γ -Agonisten fundiert beurteilen zu können, sind sowohl weiterführende präklinische Untersuchungen zur Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen als auch translational ausgerichtete Studien erforderlich, um die klinische Relevanz dieser Therapieoption weiter zu prüfen.

Abstract

The number of cardiovascular bioprosthetic implantations continues to rise, particularly in the field of aortic valves, which represent the most frequently replaced heart valves in industrialized nations. However, bioprostheses are prone to calcific degeneration, which limits their structural durability. In this context, diabetes mellitus is considered a major risk factor for accelerated degeneration due to its promotion of inflammatory and metabolic processes. Accordingly, research aimed at improving the structural durability of bioprosthetic valves under diabetic conditions is receiving increasing scientific attention. Pioglitazone, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and a member of the class of oral antidiabetic agents, has demonstrated protective effects against the progression of arteriosclerosis in clinical studies and is associated with anti-inflammatory properties. Experimental findings further suggest that pioglitazone can inhibit the calcification of native aortic valves. However, whether and to what extent these effects also apply to cardiovascular bioprostheses under diabetic conditions remains largely unexplored. The aim of this experimental study was to investigate the effect of pioglitazone on the *in vivo* degeneration of valve-bearing aortic bioprostheses under diabetic conditions in an established rat model of heterotopic implantation. Sixty male Wistar rats ($n = 20$ per group) were divided into three groups. Allogeneic cryopreserved aortic conduits, including the aortic valve, were implanted infrarenally into the abdominal aorta and analyzed for degenerative changes after 4 and 12 weeks. In two groups (DM group and DM+Pio group; $n = 40$), a diabetic metabolic state was induced via intraperitoneal streptozotocin injection and a high-fat diet prior to implantation. One of these groups (DM+Pio group; $n = 20$) additionally received pioglitazone administered via the diet (150 mg/kg). The control group ($n = 20$) received a standard diet. Aortic conduits were explanted at 4 (short-term) and 12 weeks (long-term) and subsequently analyzed by histological and immunohistochemical methods as well as quantitative PCR. Under diabetic conditions, a significant medial proliferation was observed after 4 weeks. The addition of pioglitazone led to a significant reduction in medial thickness in both the short-term ($p = 0.0002$) and long-term experiments ($p = 0.0107$). Furthermore, medial calcification was significantly inhibited after 12 weeks of pioglitazone treatment ($p = 0.0079$). Gene expression analysis revealed a significant decrease in the chondro-osteogenic markers osteopontin and BMP-2 after 4 weeks of pioglitazone treatment. These findings support the hypothesis that pioglitazone may counteract structural degeneration of bioprostheses under diabetic conditions. When interpreting the results, methodological limitations should be considered—particularly the heterotopic implantation with reduced hemodynamic load and the limited observation period in a small animal model. Nevertheless, this study provides a valuable contribution to the understanding of degenerative processes in biological grafts under diabetic conditions and offers experimental evidence for a potential therapeutic approach via PPAR γ activation. To thoroughly assess the therapeutic potential of PPAR γ agonists, further preclinical investigations to elucidate the underlying molecular mechanisms, as well as translational studies, are warranted to evaluate their clinical applicability.

Abkürzungsverzeichnis

4W		4 Wochen
12W		12 Wochen
18S		ribosomale Ribonukleinsäure 18S
α-SMA		alpha-smooth muscle actin
Actb		Beta-actin
AGEs		fortgeschrittene Glykationsendprodukte (advanced glycation endproducts)
ALT		Alanin-Aminotransferase
ANOVA		Varianzanalyse (analysis of variance)
AST		Aspartat-Aminotransferase
BMP-2		Bone Morphogenetic Protein-2
BSA		Bovines-Serum-Albumin
BZ		Nüchternblutzucker
Ca		Calcium
CAVD		Kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (Calcific aortic valve disease)
cDNA		komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
Chol		Gesamtcholesterin
DAPI		4',6'-Diamidino-2'-phenylindol
dH₂O		destilliertes Wasser
DM		Diabetes mellitus
HDL		high-density lipoprotein
HE		Hämatoxylin-Eosin
HFD		high-fat diet
IL-1 β		Interleukin-1 β
IL-6		Interleukin-6
K		Kalium
KG		Körpergewicht
Krea		Kreatinin
LDL		low-density lipoprotein
mRNA		Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
OCN		Osteocalcin
OLETF		Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty

OPN	Osteopontin
OT	Objektträger
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pio	Pioglitazon
PPAR-γ	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor Gamma
PWV	Pulswellen-Geschwindigkeit (pulse wave velocity)
qPCR	semiquantitative real-time Polymerasekettenreaktion
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RPL13a	ribosomales Protein L13a
RQN	RNA quality number
RUNX2	Runt-Related Transcription Factor 2
SEM	Standardabweichung (standard error of the mean)
STZ	Streptozotocin
SVD	strukturelle Klappendegeneration (Structural Valve Deterioration)
TAVI	Transkatheter-Aortenklappenimplantation (Transcatheter Aortic Valve Implantation)
TG	Triglyzeride
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
vWF	von Willebrand-Faktor

Angelehnt an die Gennomenklatur der Human Genome Organisation wurden murine Gene kursiv mit großem Anfangsbuchstaben angegeben, während die zugehörigen Proteine regulär (nicht kursiv), aber in Großbuchstaben geschrieben wurden [1]. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit für Osteocalcin und Osteopontin die jeweilige Abkürzung (OCN bzw. OPN) durchgängig in Großbuchstaben verwendet, unabhängig davon, ob die Gen- oder Proteinexpression beschrieben wird.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Arteriosklerose und Aortenklappenstenose	1
1.1.1 Herzklappenersatz und die Degeneration von Bioprothesen	2
1.2 Diabetes mellitus	3
1.2.1 Definition und Epidemiologie	3
1.2.2 Einfluss von Diabetes mellitus auf die Degeneration von Bioprothesen ..	4
1.2.3 Das HFD/STZ-induzierte Diabetesmodell	6
1.3 Pioglitazon – ein PPAR γ -Agonist	1
1.3.1 Wirkmechanismus und klinische Relevanz	1
1.3.2 PPAR γ -Aktivierung als potenzieller therapeutischer Ansatz zur Vermeidung bioprothetischer Degeneration	2
1.4 Ziel der Arbeit	3
2 Material	5
2.1 Verbrauchsmaterialien	5
2.2 Chemikalien und Reagenzien	6
2.3 Pharmazeutika	7
2.4 Kits	8
2.5 Geräte und Apparaturen	8
2.6 Software	10
3 Methoden	11
3.1 Studiendesign	11
3.2 Versuchstiere	12
3.3 Explantation zur Konduitgewinnung	13
3.4 Kryokonservierung der Aortenkonduits	13
3.5 Generierung einer diabetischen Stoffwechsellage	14
3.6 Induktion einer Aortenklappen-Insuffizienz	15
3.7 Heterotope Reimplantation der Gefäßkonduits	15
3.8 Blutanalysen	16

3.9	Explantation für die Gewebeanalyse	17
3.10	Histologische Analyse	18
3.10.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	18
3.10.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	18
3.10.3	Versilberung nach Von Kossa	19
3.10.4	Alizarinrot-S-Färbung	20
3.10.5	Immunhistologie	21
3.10.6	Mikroskopische Fotoaufnahmen und Bildbearbeitung	23
3.10.7	Auswertung der Histologischen Färbungen	24
3.10.7.1	Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	24
3.10.7.2	Auswertung der Von Kossa-Färbung	24
3.10.7.3	Auswertung der Alizarinrot-S-Färbung	26
3.10.7.4	Auswertung der Immunhistologie	27
3.11	mRNA-Analyse	27
3.11.1	RNA-Isolation	27
3.11.2	Quantität und Qualität der mRNA	27
3.11.3	Reverse Transkription	28
3.11.4	Primersequenzen	28
3.11.5	Expressionsanalyse mittels semi-quantitativer PCR	29
3.12	Statistik	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Blutanalysen und Gewicht	31
4.1.1	Blutzuckermessung und Gewicht	31
4.1.2	Blutplasmaanalyse	35
4.2	Quantitative Auswertung der Neointima-Hyperplasie und Mediaproliferation	37
4.3	Quantifizierung der kalzifizierenden Degeneration	40
4.3.1	Aortenwandverkalkung	40
4.3.2	Kalzifizierende Degeneration der Klappenregion	43
4.4	Immunhistologie	47
4.5	Genexpressionsanalyse der explantierten Bioprothesen	47
4.5.1	Qualität der mRNA	50
5	Diskussion	51
5.1	Das Streptozotocin-induzierte Diabetesmodell und seine metabolischen Effekte in der Ratte	51

5.2	Lipidsenkende Effekte von Pioglitazon bei Typ-2-Diabetes	52
5.3	Einfluss von Pioglitazon auf klappentragende Aortenbioprothesen unter diabetischen Bedingungen	53
5.3.1	Neointimabildung und endotheliale-zu-mesenchymale Transition	53
5.3.2	Kalzifikation und Mediaproliferation der Aortenbioprothesen	55
5.3.3	Kalzifikation der Aortenklappenbioprothese	58
5.3.4	Chondro-osteogene Transdifferenzierung	60
5.4	Limitationen	62
5.5	Fazit und Ausblick	63
6	Literatur-und Quellenverzeichnis	65
7	Danksagung	75

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Versuchsaufbau	12
Abb. 2: End-zu-Seit-Anastomose zwischen dem Aortenkonduit-Implantat und Aorta abdominalis	16
Abb. 3: Unterteilung in die Subregionen des Konduits	17
Abb. 4: Unterteilung der Von Kossa-gefärbten Präparate in Oktanten	25
Abb. 5: Die drei Regionen: Taschen, Anuli und Kommissuren in Abgrenzung zueinander	26
Abb. 6: Blutzuckerwerte der 4W-Tiere im Zeitverlauf	32
Abb. 7: Blutzuckerwerte der 12W-Tiere im Zeitverlauf	33
Abb. 8: Körpergewicht der 4W-Tiere im Zeitverlauf	34
Abb. 9: Körpergewicht der 12W-Tiere im Zeitverlauf	35
Abb. 10: Repräsentative HE-Präparate der Konduits auf Gefäßebene für jede Gruppe	38
Abb. 11: Intima- und Mediabreite der Gefäßregionen A2, B1 und B2 der Konduitimplantate ..	39
Abb. 12 Intima- und Mediaverkalkung auf Gefäßebene nach vier Wochen	41
Abb. 13: Intima- und Mediaverkalkung auf Gefäßebene nach zwölf Wochen	42
Abb. 14: Verkalkungsfläche der Gefäßsubregionen A2-B2 der 12W-Tiere	43
Abb. 15: Verkalkung auf Klappenebene nach vier Wochen	44
Abb. 16: Verkalkung der Aortenklappen nach zwölf Wochen	45
Abb. 17: Ergebnisse der Alizarinrot-S-gefärbten Aortenklappenpräparate	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien	5
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien	7
Tabelle 3: Übersicht über die im Projekt verwendeten Pharmazeutika	8
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Kits	8
Tabelle 5: Geräte und Apparaturen	9
Tabelle 6: Software	10
Tabelle 7: Herstellung des Einfriermediums zur Kryokonservierung	14
Tabelle 8: Zusammensetzung des Citratpuffers	14
Tabelle 9: Herstellung der Eosin-Lösung und 5 % Essigsäure	19
Tabelle 10: Zusammensetzung der für die Von Kossa-Färbung notwendigen Lösungen	20
Tabelle 11: Erstellung der Alizarinrot-S-Lösung	21
Tabelle 12: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	22
Tabelle 13: Herstellung der für die Immunfluoreszenzfärbung notwendigen Lösungen	22
Tabelle 14: Primersequenzen für die qPCR	29
Tabelle 15: Blutplasmaergebnisse	36

1 Einleitung

1.1 Arteriosklerose und Aortenklappenstenose

Die Verkalkung arterieller Gefäße, auch als Arteriosklerose bezeichnet, wird klassischerweise in die Intima-betonte Atherosklerose sowie die mediabetonte Mönckeberg-Sklerose untergliedert [2]. Bei der Atherosklerose handelt es sich um einen aktiv regulierten, chronisch-entzündlichen Prozess, der durch endotheliale Dysfunktion, Lipidakkumulation, oxidativen Stress, Zytokinfreisetzung und mononukleäre Zellinfiltration in der Intima ausgelöst und durch entzündliche Prozesse aufrechterhalten wird. Trotz intensiver Forschung sind die molekularen Mechanismen weiterhin nur teilweise verstanden [3-7]. Das Vorliegen atherosklerotischer Veränderungen geht mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität einher, insbesondere bei Hochrisikopatienten mit Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus [8, 9]. Die mediabetonte Form der Arteriosklerose, die Mönckeberg-Sklerose, tritt insbesondere bei metabolischen Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus auf. Dieser Prozess betrifft primär die elastischen Fasern der Gefäßwand, verläuft ohne signifikante Lumeneinengung und wird ebenfalls durch metabolische und inflammatorische Faktoren begünstigt [2, 10]. Kalzifizierende Ablagerungen treten jedoch nicht nur an Blutgefäßen auf, sondern können auch die Herzklappen betreffen. Die am häufigsten erworbene Herzklappenerkrankung in den Industrienationen ist die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (CAVD, Calcific Aortic Valve Disease), die durch Verdickung, Fibrosierung und Verkalkung der Aortenklappe gekennzeichnet ist. Die CAVD reicht von einer milden Sklerose bis hin zur hämodynamisch relevanten Aortenklappenstenose. In den Industrienationen weist bereits etwa ein Drittel der über 65-Jährigen eine kalzifizierende Aortenklappensklerose auf [11]. Für das Jahr 2021 wurde die weltweite Prävalenz der CAVD auf circa 13,3 Millionen Fälle geschätzt. Basierend auf modellierten Daten der Global Burden of Disease Study wird bis zum Jahr 2050 ein Anstieg auf rund 30 Millionen Fälle prognostiziert [12]. Dies unterstreicht die klinische und gesundheitsökonomische Relevanz der Erkrankung, insbesondere im Hinblick auf die demografische Entwicklung und den damit verbundenen steigenden Versorgungsbedarf.

Das Sterberisiko steigt kontinuierlich mit dem Schweregrad der Stenose an: Eine moderate Aortenklappenstenose ist mit einer 5-Jahres-Mortalität von über 50 % assoziiert [13], während Patienten mit schwerer Aortenstenose ohne Intervention eine 5-Jahres-Mortalität von etwa 93 % aufweisen [14]. Bei einer hochgradigen Stenose stellt der Herzklappenersatz derzeit die einzige kausale Therapieform dar und ist daher meist unvermeidbar [15].

1.1.1 Herzklappenersatz und die Degeneration von Bioprothesen

Zum aktuellen Zeitpunkt stehen zwei Formen von Endoprothesen zum Ersatz der Aortenklappe zur Verfügung: mechanische und biologische Aortenklappenprothesen. Die Entscheidung für eine mechanische Prothese ist mit einer lebenslangen Antikoagulationstherapie mit Vitamin-K-Antagonisten verbunden [15]. Diese erfordert eine engmaschige Kontrolle, da sowohl Über- als auch Unterdosierungen mit einem erhöhten Risiko für Blutungen bzw. thromboembolische Ereignisse einhergehen [16].

Die Implantation biologischer Herzklappenprothesen hat sich in den letzten Jahren zunehmend als bevorzugte Therapieoption etabliert. Sie ermöglicht nicht nur den Verzicht auf eine langfristige Antikoagulation, sondern kann auch im Rahmen der minimalinvasiven Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI) eingesetzt werden [17].

Biologische Herzklappen bestehen überwiegend aus Rinderperikard oder Schweineaortenklappen, während Homografts in der klinischen Praxis nur selten zur Anwendung kommen [18]. Trotz bedeutender Fortschritte in der Entwicklung biologischer Herzklappenprothesen ist deren Lebensdauer aufgrund degenerativer Veränderungen weiterhin begrenzt [19]. Die sogenannte strukturelle Klappendegeneration (SVD, structural valve deterioration) beschreibt irreversible, intrinsische Veränderungen des Klappengewebes [20]. Dieser fortschreitende Prozess ist charakterisiert durch fibrotische und kalzifizierende Umbauvorgänge sowie eine zunehmende Verdickung und Versteifung der Klappensegel. In fortgeschrittenen Stadien kann es zu Rissen oder Perforationen der Segel kommen, was eine hämodynamische Dysfunktion in Form einer Stenose, einer Insuffizienz oder einer Kombination beider zur Folge haben kann [21].

In einer prospektiven Studie von Bourguignon et al. betrug die mittlere Haltbarkeit einer biologischen Aortenklappenprothese 19,7 Jahre [22]. Eine Langzeitstudie mit 12.569 Patienten zeigte, dass bei Patienten unter 60 Jahren die Explantationsrate aufgrund einer SVD nach 20 Jahren bei 46 % lag [23]. Reinterventionen infolge einer SVD nach bioprothetischem Aortenklappenersatz sind jedoch mit einer erhöhten Mortalität assoziiert [24, 25], sodass die Relevanz einer zielgerichteten Therapie zur Verlangsamung der SVD-Progression deutlich wird. Eine effektive medikamentöse Therapie zur Verlangsamung oder Verhinderung der SVD steht bislang nicht zur Verfügung. Vor diesem Hintergrund ergibt sich ein dringender Bedarf an translationaler Forschung zur Entwicklung pharmakologischer Ansätze zur Prävention der SVD.

Bei der SVD spielen neben dem Alter zum Zeitpunkt des Protheseneinsatzes auch klassische Risikofaktoren der Atherosklerose, darunter Rauchen, arterielle Hypertonie, chronische Niereninsuffizienz, Dyslipidämie und das metabolische Syndrom, eine wesentliche Rolle [17]. Besonders hervorzuheben ist der Typ-2-Diabetes mellitus, dessen zunehmende Inzidenz in westlichen Ländern seine klinische Relevanz als Risikofaktor weiter verstärkt [26].

1.2 Diabetes mellitus

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Diabetes mellitus (DM), kurz Diabetes, bezeichnet eine heterogene Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, deren gemeinsames Leitsymptom eine chronische Hyperglykämie ist, eine anhaltende Erhöhung des Blutglukosespiegels infolge gestörter Insulinsekretion, -wirkung oder beidem [27]. Diabetes mellitus wird überwiegend in Typ 1 und Typ 2 unterteilt, wobei Typ 2 über 90 % aller Fälle betrifft [26]. Gestationsdiabetes sowie genetische, pankreoprive oder medikamentös bedingte Subtypen sind deutlich seltener.

Typ-1-Diabetes mellitus ist eine meist im Kindes-, Jugend- oder jungen Erwachsenenalter manifestierende Erkrankung, die durch eine autoimmune Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas gekennzeichnet ist. Infolge des absoluten Insulinmangels ist eine lebenslange Insulinsubstitution erforderlich [28]. Die Ätiologie des Typ-1-Diabetes ist multifaktoriell und beruht auf einem Zusammenspiel genetischer

Prädispositionen (v.a. HLA-assoziiert) sowie Umweltfaktoren, wobei Virusinfektionen, frühkindliche Ernährung und ein verändertes intestinales Mikrobiom diskutiert werden [29, 30].

Typ-2-Diabetes mellitus ist eine chronisch-progrediente Erkrankung, die durch eine periphere Insulinresistenz sowie einen fortschreitenden Funktionsverlust der pankreatischen Betazellen gekennzeichnet ist. Dies führt zu einer unzureichenden Insulinsekretion und in der Folge zu einer anhaltenden Hyperglykämie [31].

Zu den zahlreichen Risikofaktoren für die Entstehung eines Typ-2-Diabetes zählen Bewegungsmangel und eine hyperkalorische Ernährung, etwa durch fettreiche oder zuckerreiche Kost, die über metabolische und mikrobielle Mechanismen zur Entwicklung von Adipositas und Insulinresistenz beitragen können [32, 33]. Adipositas zählt in diesem Zusammenhang zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung und Progression des Typ-2-Diabetes [34].

Im Jahr 2024 wurde die weltweite Prävalenz des Diabetes mellitus bei Erwachsenen im Alter von 20 bis 79 Jahren auf 589 Millionen Fälle geschätzt, wobei Typ-2-Diabetes den überwiegenden Anteil ausmacht. Bis 2045 wird ein Anstieg um 45 % auf 853 Millionen erwartet, was die Relevanz dieser Erkrankung als eine der größten globalen gesundheitlichen Herausforderungen der kommenden Jahrzehnte sowie als Risikofaktor für die SVD unterstreicht [26].

1.2.2 Einfluss von Diabetes mellitus auf die Degeneration von Bioprothesen

Diabetes mellitus ist nicht nur ein etablierter Risikofaktor für die Entwicklung von Atherosklerose, sondern spielt auch eine zunehmend anerkannte Rolle in der Pathogenese der CAVD sowie in der Degeneration bioprothetischer Implantate – sowohl auf Gefäß- als auch auf Klappenebene [35-38].

Die Pathophysiologie der SVD zeigt deutliche Parallelen zur Atherosklerose sowie zur CAVD. In allen drei Entitäten finden sich gemeinsame histopathologische Merkmale wie eine Infiltration durch Makrophagen und T-Lymphozyten, Lipidablagerungen sowie die Expression proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) [39-42]. Zudem zeigen Studien, dass eine ossäre Transdifferenzierung von Zellen innerhalb des Prothesengewebes – begleitet von einer

vermehrten Expression von Knochenmarkern wie Bone Morphogenetic Protein-2 (Bmp- 2), Osteocalcin (OCN) und Osteopontin (OPN) – sowohl in der Pathogenese der CAVD [43] als auch in der Degeneration biologischer Herzklappen- und Gefäßprothesen [42, 44] eine zentrale Rolle spielt. Im Kontext des Diabetes mellitus sind diese degenerativen Prozesse deutlich akzentuiert. Chronische Hyperglykämie fördert die Bildung sogenannter Advanced Glycation Endproducts (AGEs), die über die Bindung an den RAGE-Rezeptor (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) inflammatorische und prokalzifizierende Signalkaskaden aktivieren [45, 46]. Dieser Mechanismus wurde sowohl für native als auch für bioprothetische Klappen beschrieben und gilt als zentraler Vermittler der diabetesspezifischen Gewebeschädigung [47, 48]. Bioprothesen sind dabei besonders vulnerabel, da ihnen endogene Reparaturmechanismen, wie vaskuläre Versorgung oder Zellregeneration, weitgehend fehlen [18]. Studien zeigen, dass oxidativer Stress, Glykation und Matrixveränderungen bei diabetischer Stoffwechsellage zu einer frühzeitigen Kalzifikation und mechanischen Degeneration des xenogenen Gewebes führen [49]. In einer prospektiven, multizentrischen Kohortenstudie belegten Lorusso et al., dass Patienten mit Typ-2-Diabetes ein signifikant höheres Risiko für eine beschleunigte SVD aufweisen als Nichtdiabetiker – mit konsekutiv reduzierter Haltbarkeit der Prothesen [50]. Pathophysiologische Vergleiche zwischen nativem und bioprothetischem Gewebe unter diabetischer Stoffwechsellage, wie sie Yeghiazaryan et al. vorgenommen haben, zeigen in beiden Gewebetypen eine verstärkte Inflammation und Matrixdegradation [51]. Auch Typ-1-Diabetes ist mit einem deutlich erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert und geht im Vergleich zu Typ-2-Diabetes mit einem noch höheren Risiko für CAVD einher [52, 53]. Da pathophysiologische Mechanismen wie Inflammation, Lipidakkumulation und Glykationsprozesse auch bei Typ-1-Diabetes relevant sind [54-56], erscheint eine vergleichbare oder sogar verstärkte Beteiligung an der Bioprothesendegeneration naheliegend. Bislang fehlen jedoch systematische Untersuchungen, die den Einfluss von Typ-1-Diabetes auf die Degeneration bioprothetischer Herzklappen analysieren, sodass hier weiterer Forschungsbedarf besteht. Angesichts der klinischen Relevanz gewinnt die Frage nach präventiven Strategien zur Verzögerung der Prothesendegeneration zunehmend an Bedeutung, insbesondere im Hinblick auf medikamentöse Ansätze, die diabetesspezifische Schädigungsmechanismen gezielt modulieren.

1.2.3 Das HFD/STZ-induzierte Diabetesmodell

Um diabetische Versuchsbedingungen zu etablieren, entschieden wir uns für ein von Mansor et al. beschriebenes Modell, das die Kombination einer fettreichen Diät (HFD) mit einer niedrig dosierten Streptozotocin-(STZ)-Injektion beinhaltet [57]. Dieses Modell soll die klinisch beobachtete Abfolge von Insulinresistenz und nachfolgendem β -Zell-Versagen nachbilden und wird in der experimentellen Forschung insbesondere zur Untersuchung fortgeschrittener Stadien des Typ-2-Diabetes eingesetzt [58].

Die HFD induziert dabei eine Hyperinsulinämie und Insulinresistenz, die den ersten Schritt in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes darstellen [59]. Im zweiten Schritt wird STZ appliziert, eine Substanz, die ursprünglich als Chemotherapeutikum entwickelt wurde, jedoch seit vielen Jahren experimentell zur Induktion diabetischer Stoffwechsellagen eingesetzt wird, da sie selektiv toxisch auf pankreatische β -Zellen wirkt [60]. Eine hohe Dosis führt zu einer massiven β -Zell-Nekrose mit konsekutivem vollständigem Ausfall der Insulinproduktion und damit zur Manifestation eines Typ-1-Diabetes [61]. In niedriger Dosierung induziert STZ hingegen eine partielle Reduktion der β -Zell-Masse und somit einen relativen Insulinmangel [62]. In Kombination mit der durch die HFD bedingten Gewichtszunahme lässt sich auf diese Weise innerhalb einer kurzen Versuchszeit eine diabetische Stoffwechsellage etablieren, die dem klinischen Bild eines Typ-2-Diabetes nahekommt [63]. Da die durch STZ induzierte β -Zellschädigung in dieser Form beim Menschen nicht vorkommt, bildet das Verfahren die Pathophysiologie des menschlichen Typ-2-Diabetes nicht exakt ab. Es ist daher vielmehr als Hybridmodell zu betrachten, das neben Insulinresistenz auch Typ-1-ähnliche Komponenten umfasst [62].

Nach Evaluation der STZ-Applikation mit zwei Dosierungen (25 und 30 mg/kg KG) in einem Pilotprojekt mit sechs männlichen Wistar-Ratten entschieden wir uns für die niedrigere Dosis für die folgenden Experimente.

1.3 Pioglitazon – ein PPAR γ -Agonist

1.3.1 Wirkmechanismus und klinische Relevanz

Pioglitazon ist ein orales Antidiabetikum aus der Klasse der Thiazolidindione (TZDs), das seit Ende der 1990er-Jahre zur Behandlung des Typ-2-Diabetes zugelassen ist und heute insbesondere bei Patienten mit ausgeprägter Insulinresistenz und kardiovaskulären Begleiterkrankungen eingesetzt wird [64]. Es wirkt als selektiver Agonist des nukleären Transkriptionsfaktors Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ), der insbesondere im Fettgewebe, aber auch in Leber, Skelettmuskulatur und Endothelzellen exprimiert wird. Die Aktivierung von PPAR γ induziert die Transkription zahlreicher Gene, die die Insulinwirkung verstärken und an der Regulation des Glukose- und Lipidstoffwechsels beteiligt sind [65]. Dies führt zu einer verbesserten Insulinsensitivität in peripheren Zielgeweben, einer Senkung des Plasmainsulinspiegels und damit zu einer optimierten glykämischen Kontrolle [66].

Der Einsatz von Pioglitazon erfordert eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Abwägung, da die Therapie mit Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, Flüssigkeitsretention und einem erhöhten Risiko für Herzinsuffizienz assoziiert sein kann [67]. Infolgedessen wird Pioglitazon in den deutschen Leitlinien nicht als Standardtherapie, sondern lediglich als Drittlinienoption eingestuft.

Gleichzeitig zeigen präklinische und klinische Studien, dass Pioglitazon über seine glykämischen Effekte hinaus auch antiinflammatorische, antioxidative und antiapoptotische Eigenschaften besitzt, die auf eine protektive Wirkung im Gewebe hindeuten [65, 68]. Zudem kristallisierte sich heraus, dass Pioglitazon mit einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse einhergeht und damit einen kardioprotektiven Effekt aufweist [67, 69]. Ergänzend hierzu konnte in einem Kleintiermodell chronischer Niereninsuffizienz gezeigt werden, dass Pioglitazon degenerative Veränderungen kardiovaskulärer Bioprothesen abschwächt [70] und damit sowohl kardioprotektive als auch renoprotektive Eigenschaften aufweist.

Diese Erkenntnisse rücken Pioglitazon zunehmend in den Fokus translationaler Forschung, die das Potenzial einer PPAR γ -aktivierenden Therapie jenseits der Blutzuckerkontrolle

untersucht, insbesondere im Hinblick auf degenerative Prozesse an biologischen Implantaten.

1.3.2 PPAR γ -Aktivierung als potenzieller therapeutischer Ansatz zur Vermeidung bioprothetischer Degeneration

In der PROactive-Studie, einer prospektiven, randomisierten, multizentrischen Untersuchung mit 5.238 Patienten mit Typ-2-Diabetes und manifester Makroangiopathie, wurde erstmals gezeigt, dass Pioglitazon über seine glukosesenkende Wirkung hinaus zu einer signifikanten Reduktion des sekundären kombinierten Endpunkts aus Gesamtmortalität, nicht-tödlichem Myokardinfarkt und Schlaganfall führte und damit den Nachweis für einen direkten kardiovaskulären protektiven Effekt erbrachte [67]. Ergänzend zeigte die CHICAGO-Studie, dass Pioglitazon im Vergleich zu Glimepirid die Progression der Intima-Media-Verdickung der Arteria carotis signifikant verlangsamt, was auf einen antiarteriosklerotischen Effekt hinweist [71]. Diese klinischen Daten liefern eine entscheidende Grundlage für die Hypothese, dass Pioglitazon auch bei der Vermeidung struktureller Degeneration an biologischen Implantaten therapeutisches Potenzial entfalten könnte.

Auf molekularer Ebene wurden in präklinischen Modellen zahlreiche Mechanismen identifiziert, über die Pioglitazon potenziell protektiv wirkt. Igarashi et al. demonstrierten in einem Rattenmodell einer balloninduzierten Gefäßverletzung, dass Pioglitazon die Proliferation glatter Muskelzellen hemmt und das Verhältnis von Neointima zu Media signifikant reduzierte – ein Hinweis auf antiproliferative Effekte [72]. Weiterhin modulieren PPAR γ -Agonisten zentrale Entzündungssignalwege, insbesondere durch Hemmung der NF- κ B-Aktivierung, und reduzieren dadurch die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 [65]. Die antiinflammatorische Wirkung von PPAR γ -Agonisten ist insbesondere im Kontext des Diabetes mellitus von Relevanz: Chronische Hyperglykämie und Insulinresistenz begünstigen die Akkumulation proinflammatorischer Mediatoren und fördern über AGE-RAGE-vermittelte Mechanismen vaskuläre und valvuläre Schädigungsprozesse. Mehrere Studien verdeutlichen diesen Zusammenhang: In einem diabetischen Rattenmodell zeigte Wang et al., dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon die Proliferation glatter Muskelzellen sowie die Expression von RAGE signifikant reduzierte [73]. Darüber hinaus

demonstrierten Li et al., dass Pioglitazon die Kalzifikation von nativen Aortenklappen durch Hemmung von RAGE-Signalwegen abschwächte [47].

Zusätzlich fördert Pioglitazon die Expression von Adiponektin, einem Adipozytokin mit antiinflammatorischen und antiatherosklerotischen Eigenschaften. In klinischen Studien konnte ein signifikanter Anstieg der Adiponektin-Spiegel im Serum beobachtet werden, der mit einer Abnahme systemischer Entzündungsmarker wie CRP und TNF- α assoziiert war [74]. Da reduzierte Adiponektin-Konzentrationen mit endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischer Plaquebildung assoziiert sind [68], könnte die durch Pioglitazon vermittelte Hochregulation von Adiponektin ein zentraler Mechanismus seiner gefäßprotektiven Wirkung darstellen [75].

In einem Kaninchenmodell der Aortenklappenkalzifikation führte die Behandlung mit Pioglitazon in vivo zu einer verminderten Expression von OPN in nativen Aortenklappen. In kultivierten porzinen valvulären interstitiellen Zellen inhibierte Pioglitazon die Transdifferenzierung zu osteoblastenähnlichen Zellen und unterdrückte die durch AGEs induzierte Hochregulation der osteogenen Marker BMP-2, Runx2 und OPN, was auf eine anti-kalzifizierende Wirkung hinweist [47]. Eine ergänzende Studie von Assmann et al. zeigte darüber hinaus, dass eine PPAR γ -Aktivierung unter hypercholesterinämischen Bedingungen die Kalzifikation innerhalb der Intima biologischer, klappentragender Gefäßtransplantate reduzieren kann [76]. Trotz dieser vielversprechenden Befunde bleibt bislang unklar, ob Pioglitazon die strukturelle Degeneration bioprothetischer Klappen, insbesondere unter diabetischer Stoffwechsellage, hemmen kann. Diese Fragestellung bildet die Grundlage für die im Folgenden vorgestellte Forschungsarbeit.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Degeneration bioprothetischer Herzklappen stellt trotz ihrer weiten klinischen Anwendung ein ungelöstes Problem dar. Risikofaktoren und pathophysiologische Mechanismen ähneln denen der Atherosklerose, wobei Diabetes mellitus eine besondere Rolle spielt. Chronische Hyperglykämie begünstigt über AGE/RAGE-vermittelte Signalwege entzündliche und degenerative Umbauprozesse, die die strukturelle Integrität bioprothetischer Implantate beeinträchtigen können. Präklinische Daten deuten darauf hin, dass Pioglitazon diese Mechanismen abschwächen und protektive Effekte entfalten kann. Ob dies auch für Bioprothesen unter diabetischen Bedingungen zutrifft, ist jedoch

unklar. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von Pioglitazon auf degenerative Veränderungen klappentragender Aortenbioprothesen in einem diabetischen Tiermodell zu untersuchen. Hierzu wurde ein Modell der heterotopen Implantation einer klappentragenden Aorta (Konduit) mit einem auf fettreicher Diät und niedrig dosiertem STZ basierenden Diabetesmodell kombiniert. Verglichen wurden normoglykämische Kontrollen sowie diabetische Tiere mit und ohne Behandlung mit Pioglitazon. Mittels histologischer und molekularbiologischer Untersuchungen sowie ergänzender Blutanalysen wurde untersucht, ob Pioglitazon protektive Effekte im Sinne einer Hemmung inflammatorischer und kalzifizierender Umbauprozesse entfaltet.

2 Material

Im Folgenden werden die im Projekt verwendeten Verbrauchsmaterialien, sowie Chemikalien und Pharmazeutika, Geräte und Software tabellarisch aufgeführt.

2.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
8-0-Monofilament-Nylon	Ethicon Endo-Surgery GmbH (Johnson & Johnson), Norderstedt, DE
Kryoröhrchen	VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvania, USA, Ref. 4791262
Butterfly Kanüle	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA, Ref. 367286
Deckgläser	Engelbrecht, Erdmünde, DE, Ref. K12450
Einbetttschälchen	Medite GmbH, Burgdorf, DE, Ref. 48-6303-00
Filterpapier	Macherey- Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE, Ref. 572018
HFD-Futter	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE, Ref. E15741-34
KP-CryoCompound	Klinipath, Duiven, Niederlande, 1620C
Glasobjektträger (SuperFrost Plus)	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE, Ref. 030060
Roti-Histokitt II (Eindeckmedium)	Carl Roth, Karlsruhe, DE, Ref. T160.1
Silikonstift Dako-Pen	DAKO GmbH, Jena, DE, S2002
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- & Medizintechnik, Emmerdingen, DE, Ref. 03-0060
6-Well-Platte	Cellstar, Germer Bio-One, Frickenhausen, DE, Ref. 657160

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Produktbezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Aceton	Merck Millipore, Darmstadt, DE	1.00003.1000
Alcianblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	A5268-25G
Alizarinrot-S	Carl Roth, Karlsruhe, DE	0.348.2
Ammoniumhydroxid 30 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE	CP17.1
Brilliant Crocein R	Waldeck GmbH & Co. KG Münster, DE	1B-109
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	037K3734
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	31966-021
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	D8418
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA,	R0862
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	236489-100G
Eosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	861006
Essigsäure 100 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE	6755.2
Ethanol (versch. %)	Zentralapotheke UKD, Düsseldorf, DE	111934-04/-27/-62
Ethanol reinst	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	34852
4 % Formaldehyd-Lösung (Rotifix)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	P087.3
Formaldehyd 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE	4979.1
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	F7524
Hämatoxylin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	6765009
HCl 32-37 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE	2601.1
Jod	Carl Roth, Karlsruhe, DE	7935.2
Kaliumjodid	Carl Roth, Karlsruhe, DE	8491.1

0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe	04801702
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	72049-260G
Phosphat-gepufferte Salzlösung, (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	14190-094
Phosphotungstic Acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	P4006-250G
Pikrinsäure	VWR International GmbH Bruchsal, DE	84512.260
RNAse freies Wasser	VWR International GmbH Bruchsal, DE	1.15333.2500
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, DE	9370.1
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	72049-250G
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, DE	1-06392.1000
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	Carl Roth, Karlsruhe, DE	N069.1
RDD Puffer	Quiagen N.V., Venlo, Niederlande	79254
Safran du Gatinais	Waldeck GmbH & Co. KG Münster, DE	5A-394
Säurefuchsin	Carl Roth, Karlsruhe, DE	T128.1
Trizol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	T9424
Xylol	VWR International GmbH Bruchsal, DE	28975.325

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

2.3 Pharmazeutika

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
Amphotericin B	Cheplapharm, Greifswald, DE	05104483
Betaisodona	Mundipharma, Frankfurt am Main, DE	01970433
Carprofen	Norbrook Laboratories Ltd, Newry, UK	226-793
Heparin	Ratiopharm, Ulm, DE	03029820
Isofluran	Piramal Critical Care Bethlehem, PA, USA	9714675

Esketaminhydrochlorid	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, DE	16021197
Natriumchlorid 0,9%	Fresenius Kabi Ag, Bad Homburg, DE	00809090
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	15140-122
Pioglitazon (Actos)	Takeda Pharmaceutical Company Ltd, Osaka, Japan	21100AMZ00642
Streptozotocin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	S0130

Tabelle 3: Übersicht über die im Projekt verwendeten Pharmazeutika

2.4 Kits

Kit	Hersteller	Artikelnummer
GoTaq qPCR Master Mix	Promega, Madison, Wisconsin, USA	A6002
Quiagen RNeasy Mini Kit	Quiagen N.V., Venlo, Niederlande	74106
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Quiagen N.V., Venlo, Niederlande	205313

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Kits

2.5 Geräte und Apparaturen

Beschreibung	Hersteller
Blutglukosemessgerät	StatStrip Express 2, Nova Biomedical GmbH, Waltham, MA, USA
Autoklav	VX-95, Systec Bergheim, DE
Feinwaage BP 110 S	Sartorius, Göttingen, DE
5200 Fragment Analyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA, M5310AA
Gewehomogenisator Gentle MACS Dissociator M-Tuber	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
Kryostat	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland, CM1959
Kühlblock	Nalge Nunc International Corporation, Rochester, New York, USA
Leuchtstoffröhre	Osram, München, DE

Magnetrührer, Rotilabo®	Carl Roth, Karlsruhe, DEMH15
Mikroskopkamera	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE, DFC425C
Durchlichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, DE, Leica DM 2000
Fluoreszenzlampe	Leica, Wetzlar, DE, DFC425 C
Narkosegerät	UGO Basile S.R.L., Comerio, Italien, Modell 7025
Ultraschallgerät Philips HD X11E	Philips GmbH, Hamburg DE
OP-Lampe	Dr. March GmbH & Co. KG, Ebersberg, Deutschland, Triaflex
OP-Mikroskop	Nikon Instruments, Amsterdam Niederlande, SMZ-1-Zoom-Stereomikroskop
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
ph-Sonde, Easyform Plus VP 120	Hamilton Company, Reno, NV, USA, 238633-1111
Sterile Werkbank	Kendro, Langenselbold, DE
StepOnePlus Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tecan Reader, infinite M1000 PRO	Tecan Trading AG, Männedorf. Schweiz
Thermocycler T3000	Biometra® GmbH, Göttingen, DE
Ultraschallgerät	Philips Healthcare, HD11 XE Ultrasound system, 15 MHz Schallkopf, Hamburg, Deutschland,
Waage	Sartorius BP 110S, Göttingen, DE
Wärmeschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, DE, UT 20
Zentrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Kühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Schwabach, Deutschland, Ser-Nr.: 040107658
Kühltruhe -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Revco, Modell PULT14903-V12

Tabelle 5: Geräte und Apparaturen

2.6 Software

Software	Hersteller
Gimp Version 2.10	GIMP Development Team (Open Source)
Microsoft® Excel 2019 Version 16.0	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Graphdpad Prism Version 8.1.1	La Jolla, CA, USA
Image J Version 2.0	National Institutes of Health, Maryland, USA
StepOnePlus, Real Time PCR System	Applied Biosystems Inc., Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
StepOne™ Software v2.3	Applied Biosystems Inc., Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikrotitrierplatten-Lesegerät Tecan i-control™ V7.2	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

Tabelle 6: Software

3 Methoden

3.1 Studiendesign

Um die Experimente der vorliegenden Arbeit durchzuführen, wurde ein Kleintiermodell benötigt, das die In-vivo-Evaluation degenerativer Prozesse in einem kardiovaskulären Implantat sowie der systemischen Einflüsse des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon ermöglichte.

Hierfür wurde ein in unserer Forschungsgruppe etabliertes Rattenmodell der heterotopen Implantation von Aortenkonduits verwendet [77]. Spenderratten wurde der Aortenbogen mit zugehöriger Aortenklappe, im Folgenden als Konduit bezeichnet, entnommen. Nach Kryokonservierung wurden die U-förmigen Konduits in Empfängerratten infrarenal an die Aorta abdominalis implantiert. Um möglichst physiologische Bedingungen für die Implantate zu bilden, wurde eine Woche zuvor an der nativen Aortenklappe der Empfängertiere eine Insuffizienz mithilfe eines vorgeschobenen Drahtes generiert. Die chirurgischen Eingriffe wurden von Shintaro Katahira durchgeführt, während der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Aufbereitung der entnommenen Proben sowie deren Analyse lag.

Das Projekt beinhaltete insgesamt 60 Empfängertiere, die in drei Gruppen à 20 Ratten aufgeteilt wurden. In zwei der Versuchsgruppen (DM und DM+Pioglitazon [DM+Pio]) wurden die Ratten einer diabetischen Stoffwechsellage ausgesetzt. Dazu erhielten die Versuchstiere eine überdurchschnittlich fettreiche Diät (HFD, high-fat diet) ab dem Zeitpunkt des Versuchsbeginns. Nach zwei Wochen wurde diesen beiden Versuchsgruppen STZ appliziert. Eine der beiden Gruppen (DM+Pio) erhielt zusätzlich zur HFD den PPAR γ -Agonisten Pioglitazon (150 mg/kg Futter). Die Tiere der Kontrollgruppe wurden mit Standardfutter versorgt und erhielten weder Pioglitazon noch STZ. Die Konduit-Implantate wurden in allen drei Gruppen nach 4 Wochen (4W) (DM, DM+Pio und Kontrolle je n=10) und 12 Wochen (12W) (DM, DM+Pio und Kontrolle je n=10) nach dem Implantationszeitpunkt explantiert und zur Analyse verwendet.

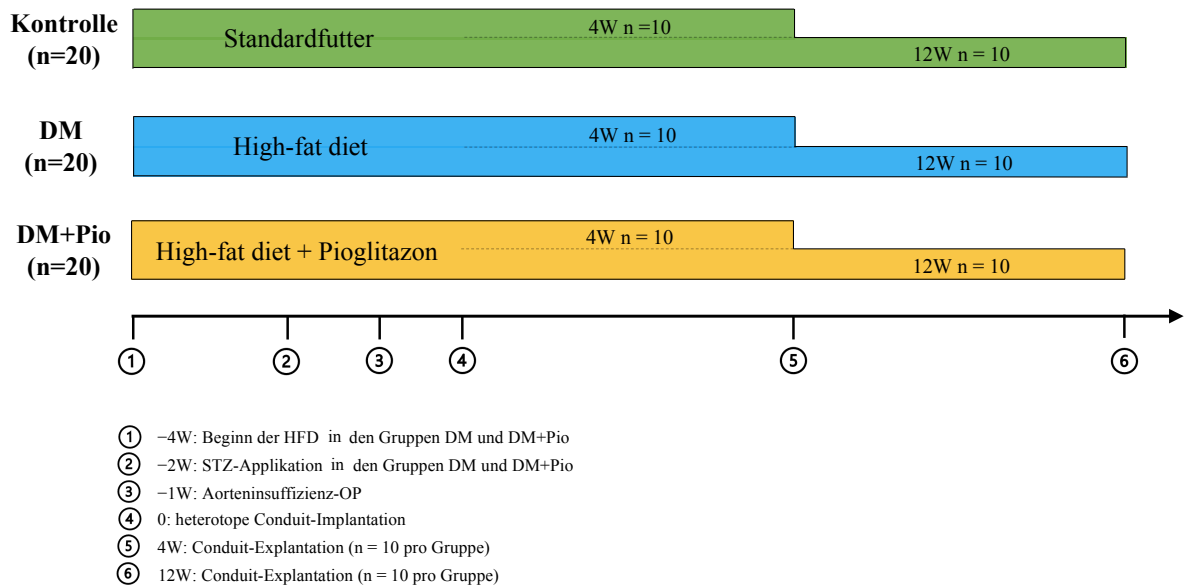


Abb. 1 Versuchsaufbau

Sechzig Empfängerratten wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Zwei Gruppen erhielten nach zweiwöchiger HFD eine intraperitoneale STZ-Applikation. Eine Woche später wurde den Ratten jeder Versuchsgruppe eine Aorteninsuffizienz generiert. Das implantierte Aorten-Konduit wurde nach 4 oder 12 Wochen entnommen. HFD = High-fat diet; STZ = Streptozotocin; DM = Diabetes mellitus; W = Wochen; Pio = Pioglitazon. Angelehnt an [78].

3.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Wistar-Ratten mit einem Initialgewicht von 250 bis 300 g. Diese entstammten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf und wurden dort über den gesamten Versuchsverlauf gehalten. Die Versuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) mit dem Aktenzeichen 84-02.04.2017.A182 genehmigt und nach geltender Tierschutz-Versuchstierverordnung durchgeführt. Die Verfasserin absolvierte erfolgreich die FELASA-zertifizierte Schulung für Personen, die Verfahren an Versuchstieren durchführen (Funktion A), sowie für die Euthanasie von Versuchstieren (Funktion D). Die verwendeten Tiere erhielten über den gesamten Versuchsverlauf hinweg, mit Ausnahme der vierstündigen Nüchternperioden vor den Messungen des Nüchternblutzuckers (BZ), Wasser und Futter ad libitum.

3.3 Explantation zur Konduitgewinnung

Als Spendertiere dienten 60 männliche ausgewachsene Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250 bis 350 g. Die Entnahme der Aortenkonduits erfolgte nach intraperitonealer Injektion von Xylazin (10 mg/kg KG) und Ketamin (100 mg/kg KG) in Vollnarkose. Nach einer medianen Thorakotomie wurde mittels Heparin-Applikation von 100 IE/kg Körpergewicht (KG) in die Vena cava inferior eine effektive Antikoagulation erzeugt. Das Herz und die Aorta thoracica wurden vom umliegenden Gewebe frei präpariert und entnommen. Unter mikroskopischer Sicht bei 10-facher Vergrößerung wurde ein U-förmiges Aortenkonduit mit schmalem Myokardsaum präpariert. Die Koronararterien wurden mit 8-0-Monofilamentnähten ligiert. Anschließend wurde das Konduit mit Natriumchlorid und Heparin (12,5 IE/ml) gespült. Die Gefäßkonduits wurden vor der Weiterbehandlung mit einer Lösung aus Amphotericin B und Streptomycin/Penicillin in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) in einer 6-Well-Platte gespült, um mögliche Kontaminationen zu verhindern. Jedes Konduit wurde dabei zweimal in einem Well mit einer Lösung gleicher Anteile Amphotericin B und Penicillin-Streptomycin im Verhältnis 2:100 in PBS und anschließend in einem Well mit PBS gespült.

3.4 Kryokonservierung der Aortenkonduits

Als Konservierungsmethode der explantierten Aortenkonduits bis zur Reimplantation in die Empfängerratten wurde die Kryokonservierung gewählt. Kryokonservierte Transplantate unterliegen einem gewissen Remodellierungsgrad nach Implantation [79]. Da die vorliegende Arbeit die potenziell hemmende Wirkung von Pioglitazon auf degenerative Prozesse wie der Remodellierung der Extrazellulären Matrix untersuchen sollte, wählten wir eine Methode, die dies vorantreiben konnte.

Dafür wurden die Explantate unter einer sterilen Werkbank mit einer autoklavierten Pinzette in je ein steriles Kryoröhrchen mit 1 ml Einfriermedium überführt. Diese wurden anschließend unter kontrollierter Kühlung (ca. 1 °C pro Minute) in einem mit Propan-2-ol gefüllten Kühlblock bis -80 °C eingefroren und gelagert.

10 ml Einfriermedium
7 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium
1 ml Dimethylsulfoxid
2 ml Fetales Kälberserum

Tabelle 7: Herstellung des Einfriermediums zur Kryokonservierung

3.5 Generierung einer diabetischen Stoffwechsellaage

Zur Generierung einer diabetischen Stoffwechsellaage nach dem Modell von Mansor et al. [57] wurde den zwei Gruppen DM und DM+Pio ab dem Zeitpunkt des Versuchsbeginns eine überdurchschnittlich fettreiche Nahrung mit einem Fettanteil von 60 % (HFD) verabreicht. Die Makronährstoffverteilung des Futtermittels bestand darüberhinaus aus 21 % Kohlenhydraten und 19 % Eiweiß. Zwei Wochen nach Beginn der HFD erhielten beide Gruppen eine einmalige intraperitoneale Injektion von STZ (25 mg/kg KG). STZ wurde kurz vor der Injektion in einer Konzentration von 15 mg/ml in einem Citratpuffer gelöst. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich eine einmalige intraperitoneale Injektion des Citratpuffers in der äquivalenten Menge.

Um den Erfolg des Modells zu überprüfen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die BZ-Werte in Doppelbestimmung mit einem Blutzuckermessgerät über die Schwanzvenen der Versuchstiere gemessen. Der Nahrungsentzug wurde jeweils vier Stunden vor den im Folgenden aufgeführten Messungen begonnen.

1. Vor dem Start der HFD (−4W)
2. Vor der STZ- und Citrat-Injektion (−2W)
3. Vor der Operation zur Induktion einer Aorteninsuffizienz (−1W)
4. Vor der Konduitimplantation
5. Vor der Explantation (4W und 12W)

Citratpuffer
10 mM Trinatriumcitrat
0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung
pH = 4,5, filtrieren, aliquotieren, Lagerung bei −20 °C

Tabelle 8: Zusammensetzung des Citratpuffers

3.6 Induktion einer Aortenklappen-Insuffizienz

Um eine möglichst physiologische Öffnung und Schließung der heterotop implantierten Aortenklappen zu gewährleisten, wurde eine hämodynamische Belastung über den Implantaten erzeugt. Dies erfolgte durch einen operativen Eingriff an den nativen Aortenklappen der Empfängertiere, der eine Aortenklappeninsuffizienz zur Folge hatte. Auf diese Weise konnte ein größeres Pendelvolumen mit erhöhter Blutdruckamplitude und verstärktem Blutrückfluss erzielt werden. Da die Durchführung dieses Eingriffs nicht Teil der vorliegenden Arbeit war, wird auf eine detaillierte methodische Beschreibung verzichtet und auf das in unserer Arbeitsgruppe etablierte Modell nach Munakata et al. verwiesen [80].

3.7 Heterotope Reimplantation der Gefäßkonduits

Die kryokonservierten Gefäßkonduits wurden zur heterotopen Implantation in die Empfängerratten in einem $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ Kühlschrank aufgetaut und gewaschen. Dies erfolgte in sechs Waschschritten in einer 6-Well-Platte. Die ersten drei Wells waren dabei zu gleichen Anteilen mit Amphotericin B und Pencillin-Streptomycin in Jonosteril im Verhältnis 2:100 gelöst, befüllt. Die letzten drei Waschschrritte wurden in mit lediglich Jonosteril befüllten Wells durchgeführt.

Die heterotope Implantation der kryokonservierten Aortenkonduits erfolgte nach einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Modell [77, 80]. Die Implantate wurden hierbei End-zu-Seit an die infrarenale Aorta anastomosiert, mit Positionierung der Aortenklappe an der proximalen Anastomose. Die Abgänge des Aortenbogens wurden mit einem Clip verschlossen. Zur Sicherstellung eines ausschließlich über das Implantat erfolgenden Blutflusses wurde zusätzlich die abdominale Aorta zwischen den beiden Anastomosen ligiert.

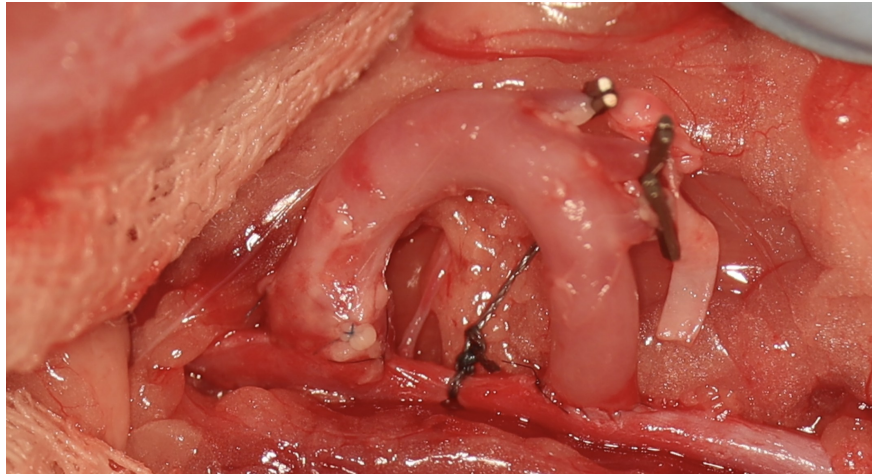


Abb. 2: End-zu-Seit-Anastomose zwischen dem Aortenkonduit-Implantat und Aorta abdominalis

Das aus Empfängerratten stammende Aortenkonduit wurde infrarenal End-zu-Seit an die Aorta abdominalis anastomosiert. Die aortalen Abgänge wurden geklippt und die native Aorta zwischen den Anastomosen ligiert.

3.8 Blutanalysen

Vor der Explantation der Organe wurde aus der unteren Hohlvene mithilfe einer Butterfly-Kanüle Blut entnommen. Das Blut wurde auf vier 2 ml Spritzen aufgeteilt, deren Innenraum vorher gänzlich mit Heparin benetzt wurde. Dabei wurden 200 µl Heparin in der Spritze belassen, sodass schließlich eine 1:10 Lösung mit dem aufgezogenen Blut vorlag. Das Blut wurde auf acht 1 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, welche bei 1000 rcf und einer Temperatur von 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert wurden. Das Serum wurde abpipettiert und bis zur Laboranalyse bei –80 °C gelagert. Die Blutplasmaanalyse erfolgte im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Universitätsklinik Düsseldorf und beinhaltete die Parameter Kalium, Calcium, Phosphat, Kreatinin, Gesamtcholesterin, Triglyzeride (TG), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT).

3.9 Explantation für die Gewebeanalyse

Die Explantation erfolgte in jeder der drei Gruppen (DM, DM+Pio und der Kontrollgruppe) 4W oder 12W nach Konduitimplantation à 10 Tiere.

Die Narkose wurde in analoger Weise zu der Narkose, welche in den zwei vorausgehenden Operationen erfolgte, angewandt (siehe 3.6). Der Zugang zum Herzen und zum Implantat erfolgte durch eine Sternotomie und eine mediane Laparotomie. Zur Antikoagulation wurde zunächst Heparin (100 IE/kg KG) über die Vena cava inferior appliziert. Es wurde schließlich eine Inzision des rechten Vorhofs gesetzt, sodass ein Tod in Vollnarkose durch Exsanguination des Tieres einsetzte. Das Konduitimplantat wurde in toto explantiert. Die Konduits wurden mit Natriumchlorid und Heparin (12,5 IE/ml) gespült und mit einem Skalpell in die vier Subregionen A1, A2, B1 und B2 unterteilt. Die Subregion A1 stellt hierbei die Aortenklappenebene dar. Die Subregion A2 bezieht sich auf die Aorta ascendens und den proximalen Anteil des Aortenbogens. Die Subregion B1 spiegelt den distalen Teil des Aortenbogens wider und die Subregion B2 bezieht sich auf die Aorta descendens.

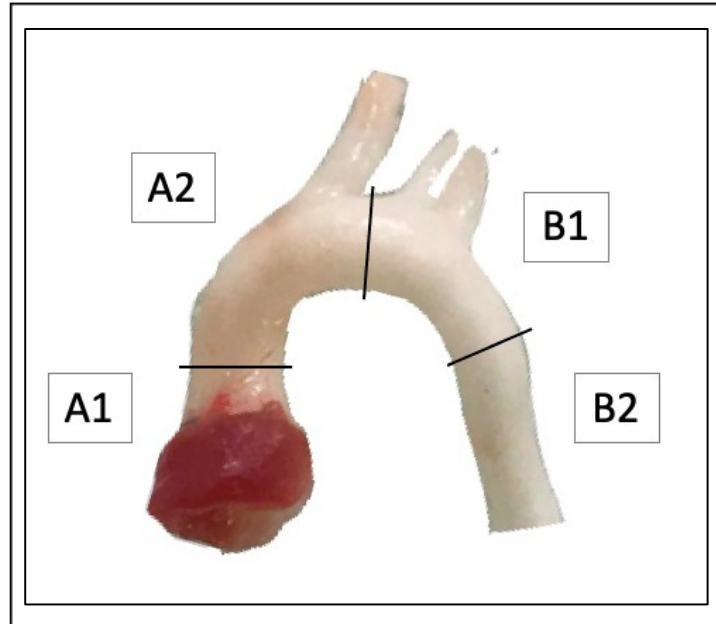


Abb. 3: Unterteilung in die Subregionen des Konduits

Makroskopische Aufnahme eines explantierten Konduits mit schematischer Darstellung der vier Subregionen, in die das Explantat vor der histologischen Einbettung unterteilt wurde. A1 stellt die Aortenklappenebene dar. Die Grenze zwischen A2 und B1 liegt am höchsten Punkt des Aortenbogens. Die Aorta descendens wurde in zwei ungefähr gleich große Abschnitte B1 und B2 unterteilt.

Vier von zehn Tieren jeder Gruppe zu jedem Zeitpunkt dienten der histologischen Analyse. Hierzu wurden die Subregionen der Konduits separat in Kryocompound eingebettet. Die eingebetteten Präparate wurden mithilfe von Isopentan, das zuvor durch Stickstoff gekühlt wurde, in Kryoblöcke schockgefroren ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Konduits der übrigen sechs Tiere pro Gruppe dienten der Analyse von mRNA (Boten-Ribonukleinsäure, messenger ribonucleic acid). Die Subregionen dieser sechs Ratten wurden bis zur weiteren Untersuchung in Kryoröhrchen in Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.10 Histologische Analyse

Zur histologischen Analyse wurden die Konduits von jeweils vier von zehn Tieren in jeder der drei Gruppen (DM, DM+Pio und Kontrolle) zu jeweils beiden Explantationszeitpunkten (nach 4W oder 12W) verwendet.

3.10.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

An einem Kryo-Mikrotom wurden bei $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gewebeschnitte der Schnittdicke $5\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt und auf Objektträger (OT) aufgezogen, die anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Dabei trug jeder OT zwei Gewebeschnitte (rechts und links). Von allen Subregionen A1–B2 wurden Gewebeschnitte von mindestens 30 OT angefertigt, jeweils aus drei repräsentativen Stellen mit einem Abstand von $200\text{ }\mu\text{m}$. Die Gewebeschnitte der Subregionen A2–B2 bildeten den Querdurchmesser der Aorta ab. Gewebequerschnitte der Subregion A1 auf Klappenebene wurden so angefertigt, sodass alle drei Taschen in einem Gewebepreparat abgebildet vorlagen.

3.10.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gilt als Übersichtsfärbung, mit der die Unterscheidung verschiedener Gewebebestandteile gut gelingt. Hierbei werden basophile Zellbestandteile, wie Desoxyribonukleinsäuren (DNA) im Zellkern durch Hämatoxylin blau gefärbt, während Eosin azidophile Strukturen wie Zellplasmaproteine hellrot färbt.

Auf Gefäßebene der Subregionen A2-B2 wurden je drei OT zur HE-Färbung herangezogen. Dabei wurden die OT so ausgewählt, dass die zugehörigen Gewebeschnitte Querschnittsebenen im Präparat darstellten, die 200 µm voneinander entfernt lagen. Auf Klappenebene A1 wurde für jedes Aortenkonduit ein OT gefärbt.

Eosin-Lösung	5 % Essigsäure
1 g Eosin	10 ml Essigsäure (100%)
100 ml dH ₂ O	190 ml dH ₂ O
100 ml 100 % Ethanol	
200 µl Essigsäure	
Vor der Färbung filtrieren	

Tabelle 9: Herstellung der Eosin-Lösung und 5 % Essigsäure

Der erste Schritt bestand in der einminütigen Färbung der Gefrierschnitte in Hämatoxylin, welches zuvor durch einen Papierfilter filtriert wurde. Darauf folgte eine 1-minütige Spülung in dH₂O (destilliertes Wasser) und eine Bläuung in 5 %iger Essigsäure für 1 Minute. Nach einem weiteren 1-minütigen Spülschritt mit dH₂O folgte ein zweiter Spülschritt für 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Daraufhin kam 70 %iges Ethanol für 1 Minute zum Einsatz, bevor die OT für 12 Minuten in einer Eosin B-Lösung gefärbt wurden. Zur Entwässerung wurden die OT in einer aufsteigenden Ethanolreihe für jeweils 1 Minute wie folgt behandelt: einmal 70 %iges Ethanol, zweimal 96 %iges Ethanol und zweimal 100 %iges Ethanol. Abschließend wurden die OT zweimal für jeweils 1 Minute in Xylol geklärt. Nach der Trocknung folgte eine Eindeckung mit einem Rotihisto-Kitt II und einem Deckglas.

3.10.3 Versilberung nach Von Kossa

Die Von Kossa-Färbung wurde zum Nachweis von Mikroverkalkungen herangezogen, welche als pathomorphologisches Korrelat degenerativer Prozesse vorliegen können. Verkalkungen können mikroskopisch als Mineralablagerungen in Form von Kalzium-Phosphat-Komplexen [9] sichtbar gemacht werden. Dem Prinzip der Färbung liegt ein indirekter Nachweis von Kalzium im Gewebe zu Grunde.

Silberionen der Silbernitrat-Lösung reagieren mit Carbonat- und Phosphationen in den gespeicherten Kalkablagerungen und verdrängen die Kalziumionen in kalzifizierten Arealen. Durch starke Lichteinwirkung werden die Silberionen zu metallischem Silber

reduziert und damit mikroskopisch als schwarzbraune Ablagerungen sichtbar. Die Gegenfärbung mit Kernechtrot ermöglicht die konträre Darstellung der Zellkerne in einem roten Ton.

5 % Silbernitrat-Lösung	Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung	5 % Natriumthiosulfat-Lösung
200 ml dH ₂ O 10 g Silbernitrat	150 ml dH ₂ O 50 ml Formaldehyd 10 g Natriumcarbonat	200 ml dH ₂ O 10 g Natriumthiosulfat
lichtgeschützt lagern		lichtgeschützt lagern

Tabelle 10: Zusammensetzung der für die Von Kossa-Färbung notwendigen Lösungen

Für jede der Subregionen A2-B2 wurde je ein Von Kossa-Präparat angefertigt. Bei jedem Färbedurchgang wurde ein Präparat kalzifizierter Mäuseaorten als Positivkontrolle (freundliche Gabe von Dr. Mareike Barth) mitgeführt. Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Gewebeschnitte 8 Minuten lang in -20 °C kaltes Aceton gestellt. Nach einer Lufttrocknung von 5 Minuten wurden sie kurz in dH₂O getaucht und anschließend für 60 Minuten in einer 5 %igen Silbernitratlösung unter einer Leuchtstoffröhre platziert. Nach einer dreimaligen Spülung für je 3 Minuten in dH₂O folgte eine 2-minütige Reduktion in einer Natriumcarbonat-Formaldehydlösung. Nach einem weiteren Spülschritt für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten in 5 %iger Natriumthiosulfat-Lösung fixiert. Die Spülung für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser ging einer 3-minütigen Spülung in dH₂O voraus. Die Färbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat erfolgte über 10 Minuten. Es schloss sich erneut eine Spülung mit dH₂O für 3 Minuten an. In einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Präparate für je 2 Minuten in 50 %igem, 70 %igem, 96 %igem und 100 %igem Ethanol entwässert und anschließend zweimal für 5 Minuten in Xylol gebadet. Die OT wurden nach der Färbung luftgetrocknet und mit dem RotiHisto Kitt II eingedeckt.

3.10.4 Alizarinrot-S-Färbung

Die Alizarinrot-S-Färbung diente zur Überprüfung der Ergebnisse der Von Kossa-Färbung sowie der Darstellung der Verkalkung der 12W-Tiere auf Klappenebene A1. Von jeder Subregion A1-B2 wurde je ein Präparat gefärbt. Alizarinrot-S bildet Chelatkomplexe mit Kalziumphosphat, welches somit nachgewiesen werden kann.

2 %ige Alizarinrot-S-Lösung

1 g Alizarinrot-S

50 ml dH₂O

pH = 4,1-4,23, filtrieren

Tabelle 11: Erstellung der Alizarinrot-S-Lösung

Die Alizarinrot-S-Färbung wurde durchgeführt, nachdem die OT mit den Gefrierschnitten aus der -20 °C Lagerung nach einigen Minuten Wartezeit Raumtemperatur (ca. 20 °C) erreicht hatten. Zuerst wurden die Präparate für 10 Minuten in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Das Formaldehyd wurde daraufhin von den OT kurz abgeschüttelt, bevor diese für 2 Minuten in 2%iger Alizarinrot-S-Lösung inkubiert wurden. Nach erneutem Abschütteln wurde das ungebundene Alizarinrot-S durch einmaliges Eintauchen der OT in destilliertes Wasser (dH₂O) entfernt. Darauffolgend wurden die Präparate durch 20-maliges Eintauchen in Aceton, durch 20-maliges Eintauchen in ein Aceton-Xylol-Gemisch (in einem Verhältnis von 1:1) dehydriert und durch fünfmaliges Eintauchen in Xylol gesäubert. Nach einer kurzen Trocknungszeit wurden die Gefrierschnitte mit jeweils einem Tropfen des Roti-Histokitts II und mit einem Deckglas eingedeckt.

3.10.5 Immunhistologie

Immunhistologisch wurden die Konduit-Subregionen A2-B1 aller drei Gruppen untersucht, die 12W nach der Implantation explantiert wurden. Dabei wurde je ein OT jeder Subregion gefärbt. Es wurde eine Doppelfärbung mit den Primärantikörpern gegen α -smooth-muscle-actin (α -SMA) und von Willebrand-Faktor (vWF) durchgeführt. Ziel war es, durch die Darstellung des vWFs, welcher in Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet wird, die luminale Beschaffenheit und Integrität der Aortenkonduits zu evaluieren. Das Protein α -SMA kommt insbesondere in glatten Gefäßmuskelzellen vor und wird von Myofibroblasten im Rahmen einer fibrotischen Reaktion vermehrt exprimiert [81].

Als Sekundär-Antikörper wurden Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper verwendet, die in Tabelle 12 aufgeführt sind. Von Willebrand-Faktor wurde nach der folgend aufgeführten Färbung durch eine grüne Fluoreszenz und α -SMA durch eine rote Fluoreszenz dargestellt. Für eine kontrastreiche Darstellung der Zellkerne in blauer Fluoreszenz kam

4',6'-Diamidino-2'-phenylindol (DAPI) zum Einsatz, das aufgrund seiner hohen Affinität zu doppelsträngiger DNA an diese bindet [82]. Innerhalb jedes Färbedurchgangs wurde ein Gewebeschnitt einer Myokardprobe als Positivkontrolle mitgeführt.

Primär-Antikörper	vWF	DakoCytomation	1:300
	rabbit anti-human	Glostrup, Dänemark,	
	polyklonal	Art.-Nr.: A0082	
	α -SMA	Sigma-Aldrich	1:300
	mouse anti-human	Saint Louis, MO, USA	
	monoklonal	Art.-Nr.: A5228	
Sekundär-Antikörper	Alexa 546	Invitrogen	1:200
	goat anti-mouse	Carlsbad, CA, USA	
	polyklonal	Art.Nr.: A11003	
	Alexa 488	Invitrogen	1:200
	goat anti-rabbit	Carlsbad, CA, USA	
	polyklonal	Art.-Nr.: A11008	

Tabelle 12: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

0,25 % Triton X-Lösung	0,1 % Tween 20-Lösung	5 % BSA-Lösung	1 % BSA-Lösung
250 µl Triton X	700 µl Tween 20	5 g BSA	0,25 g BSA
100 ml PBS	700 ml PBS	100 ml 0,1 % Tween 20	25 ml 0,1 % Tween 20
		Bei -20 °C lagern	Bei -20 °C lagern

Tabelle 13: Herstellung der für die Immunfluoreszenzfärbung notwendigen Lösungen

Jeder OT enthielt jeweils zwei Schnitte. Vor Beginn der Färbung wurden mithilfe eines DAKO-Pens die zwei Gewebeschnitte umrandet, um eine Fixierung der Reagenzien innerhalb des gezogenen Kreises zu gewährleisten. Die rechten Gewebeschnitte dienten als Negativkontrolle, welche nachweisen sollten, dass die fluoreszierenden Sekundär-Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingehen. Im Ersten Schritt wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten in 4%igem Formalin fixiert. Es folgten drei Waschgänge mit PBS für jeweils 1 Minute. In einer 0,25 %igen Triton X-Lösung wurden die OT für 10 Minuten inkubiert, was dazu dienen sollte, die Membran zu permeabilisieren.

Nach drei weiteren einminütigen PBS-Waschschritten folgte eine Inkubation in einer 5%igen BSA-Lösung (Bovines-Serum-Albumin) über 60 Minuten, die eine unspezifische Bindung der im späteren Verlauf eingesetzten Primär-Antikörper blockieren sollte. Daran schlossen sich drei Spülungen mit einer 0,1 %igen Tween-20-Lösung sowie zwei Waschschritte von jeweils 1 Minute an.

Im nächsten Schritt wurden auf die linken Gewebeschnitte der OTs 40 µl der Primär-Antikörper-Lösung (vWF und α -SMA 1:300 in 1 %iger BSA-Lösung) und auf die rechten Gewebeschnitte 40 µl der 1 %igen BSA-Lösung pipettiert. Es folgte eine Inkubation in einer Feuchtkammer bei 37 °C über 60 Minuten. Anschließend wurden die OT erneut dreimal mit 0,1 %iger Tween 20-Lösung über 5 Minuten und zweimal mit PBS über 1 Minute gewaschen. Aufgrund einer Lichtempfindlichkeit des Sekundär-Antikörpers wurden alle folgenden Schritte ohne direkte Lichteinwirkung durchgeführt. Auf beide Gewebeschnitte des OTs wurden 40 µl der Sekundär-Antikörper-Lösung (Alexa 488 und Alexa 546 1:200 in 1 %iger BSA-Lösung) pipettiert und über 45 Minuten in der Feuchtkammer bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde auf jeden der beiden Schnitte 40 µl der DAPI-Lösung pipettiert und die OT für 10 Minuten in die Feuchtkammer gelegt. Anschließend wurde dreimal 5 Minuten mit PBS sowie 1 Minute mit dH₂O gewaschen und die OT einmal kurz in 100 %iges Ethanol getaucht. Nach dem Trocknen wurden die OT mit Leica Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckt. Die Präparate wurden bis zur Dokumentation der Immunfluoreszenzfärbung am nächsten Tag lichtgeschützt gelagert.

3.10.6 Mikroskopische Fotoaufnahmen und Bildbearbeitung

Die Betrachtung aller histologischen Präparate erfolgte im Durchlichtmikroskop in 10-facher Vergrößerung und wurden in digitaler Form über die Software Leica Microsystems LAS V3.8 und einer Kamera mit einem 10×-Objektiv fotografiert. Die einzelnen Aufnahmen der histologischen Präparate wurden mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ (Version 2.0) über das Plugin „Stitching“ [83] zu einem Foto zusammengefügt und im JPEG-Format gespeichert.

Die Immunfluoreszenzpräparate wurden unter einer Fluoreszenzlampe und mit einem 20×-Objektiv aufgenommen. Dabei wurden je acht repräsentative Fotos von jedem Präparat der Gefäßabschnitte A2, B1 und B2 aufgenommen. Die Präparate der

Klappenregion A1 wurden jeweils an den Kommissuren, den Anuli und den Taschen fotografiert, sodass von jedem Präparat neun Fotos entstanden.

3.10.7 Auswertung der Histologischen Färbungen

3.10.7.1 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-gefärbten Präparate dienten einerseits zum orientierenden Überblick, zum anderen wurden anhand dieser die Mediabreite sowie die Intimabreite der Gefäßquerschnitte gemessen um eine mögliche Neo-Intima-Hyperplasie sowie eine Proliferation der Media zu quantifizieren. Aus den Subregionen A2, B1 und B2 wurden dabei jeweils drei OT verwendet, die am Kryo-Mikrotom im Abstand von 200 µm zueinander angefertigt wurden. Nach der Fotodokumentation wurden die Breite der Tunica media sowie die Breite der Tunica intima der Gefäßquerschnitte mithilfe des Programms Image J an acht zirkulär nebeneinander angeordneten Stellen mit ungefähr demselben Abstand zueinander ausgemessen. Aus den jeweils acht Messwerten wurde ein Mittelwert gebildet.

3.10.7.2 Auswertung der Von Kossa-Färbung

Zur quantitativen Auswertung der Kalzifizierung der Gewebeschnitte wurde ein Score verwendet, angelehnt an das Scoring-System von Assmann et al. unserer Arbeitsgruppe [84]. Dabei wurden die fotografierten histologischen Präparate der Subregionen A2, B1 und B2 in acht zirkulär nebeneinander liegende Oktanten unterteilt. In jedem Oktanten wurde die Media getrennt von der Intima beurteilt, wobei jeweils 0 – 5 Punkte vergeben wurden. Die Auswertung der fotografierten Präparate erfolgte verblindet. Null Punkte wurden vergeben, wenn keine Verkalkungen sichtbar waren. Ein Punkt erhielt die Media oder Intima eines Oktanten beim Vorliegen von Mikroverkalkungen. Makroverkalkungen erhielten mindestens zwei Punkte, wobei für zwei Punkte weniger als 25% der Fläche betroffen sein durfte. Drei Punkte bedeuteten, dass 25–50 % der Fläche verkalkt waren. Ein Punktwert von vier wurden bei einer Verkalkung von 50–75 % der Fläche vergeben und fünf Punkte ab einer Verkalkung von mindestens 75 % der Fläche innerhalb eines Oktanten. Die Punkteanzahl aller acht Oktanten wurde für die Media getrennt von der Punkteanzahl der Intima zusammengezählt.

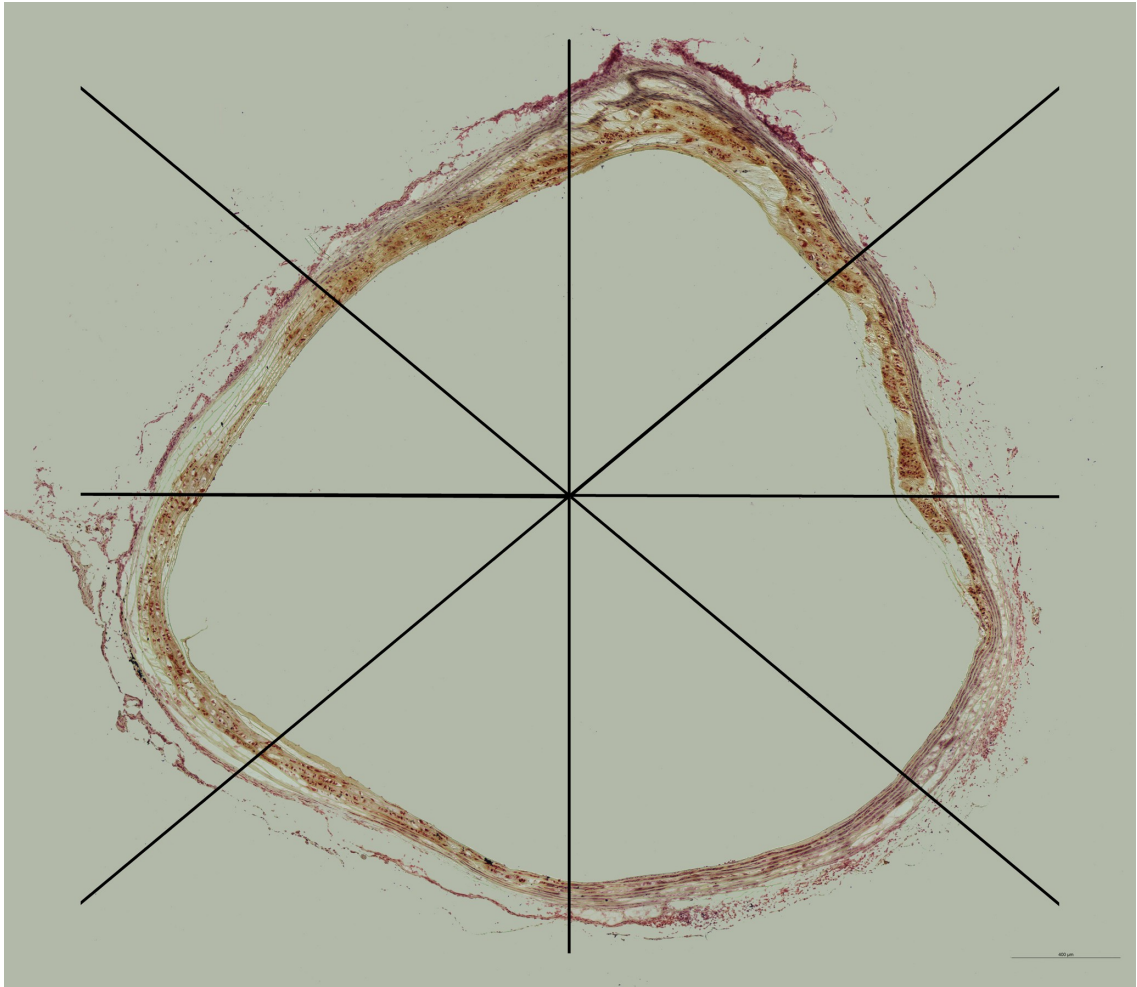


Abb. 4: Unterteilung der Von Kossa-gefärbten Präparate in Oktanten

Beispielhafte Darstellung der Unterteilung der Von Kossa-gefärbten Konduitpräparate der Gefäßsubregionen A2-B2 in acht zirkulär angeordneten Oktanten zur Auswertung der Verkalkungsgrade.

Die Subregion A1 wurde ebenfalls mithilfe des aufgeführten Scores ausgewertet. Hierbei wurden jedoch keine Oktanten gebildet, sondern die in jedem Präparat vorliegenden drei Taschen-, drei Anuli-Regionen sowie die drei Kommissuren-Regionen getrennt voneinander mit 0–5 Punkten bewertet. Die Punkte wurden anschließend für jedes einzelne Präparat summiert.

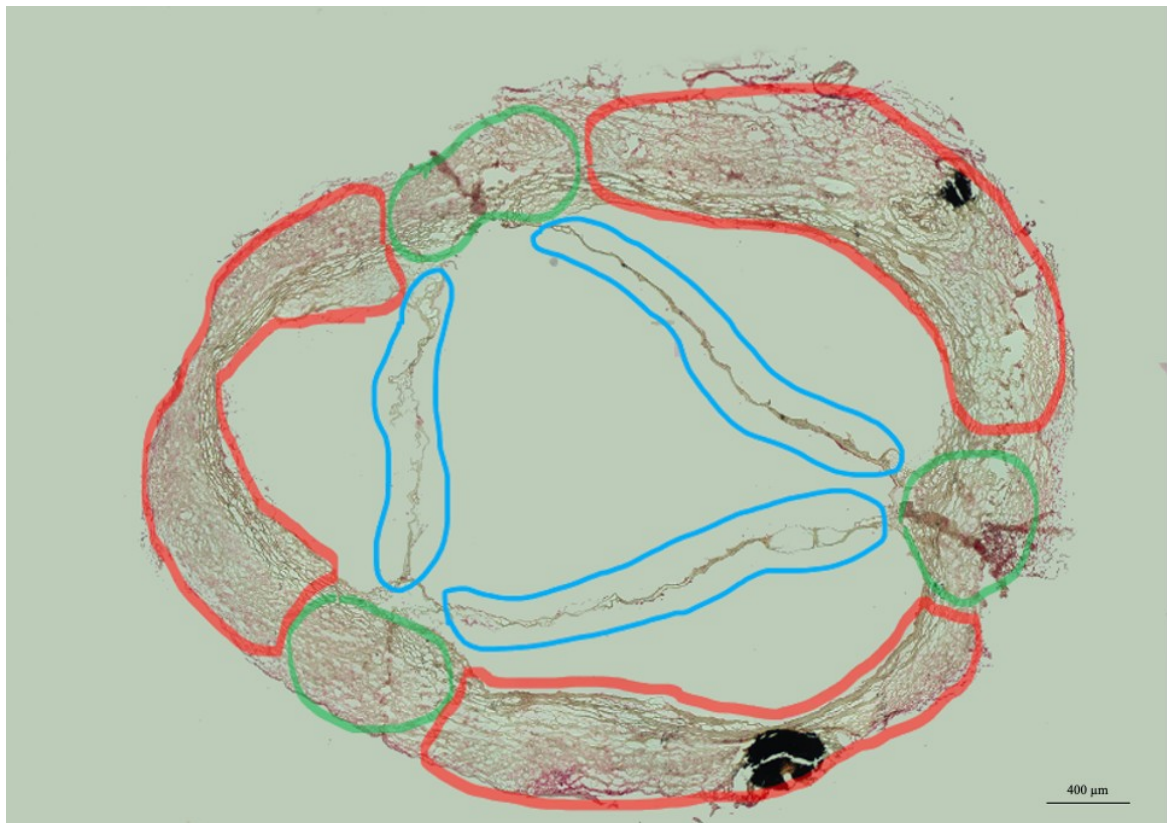


Abb. 5: Die drei Regionen: Taschen, Anuli und Kommissuren in Abgrenzung zueinander

Anhand eines Von Kossa-gefärbten und fotografierten Präparates der Klappenebene A1 sind die Regionen der Klappentaschen (blau), der Anuli (rot) und der Kommissuren (grün) in Abgrenzung zueinander umrandet markiert dargestellt. Diese wurden jeweils separat mithilfe eines Scores zur quantitativen Beurteilung der Klappenverkalkung bewertet; Maßstab: 400 µm.

3.10.7.3 Auswertung der Alizarinrot-S-Färbung

Die Ergebnisse der Von Kossa-Färbung der 12W-Tiere sollten mithilfe der Alizarinrot-S-Färbung, die ebenfalls Kalzifizierungen darstellen kann, überprüft werden. Die fotografierten Präparate der Subregionen A1–B2 wurden mithilfe des Programms Image J ausgewertet. Der prozentuale Anteil der verkalkten Areale wurde ausgemessen und berechnet. Die Fläche der durch Alizarinrot-S-markierten Verkalkungen wurde dabei zur Gesamtfläche der Intima und Media ins Verhältnis gesetzt.

3.10.7.4 Auswertung der Immunhistologie

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit α -SMA und vWF erfolgte deskriptiv durch den Vergleich der Einzelaufnahmen in 20-facher Vergrößerung. Dabei wurden die Verteilung und Koexpression beider Marker innerhalb der Gefäßwand visuell beurteilt.

3.11 mRNA-Analyse

Für die molekularbiologische mRNA-Analyse dienten pro Gruppe (DM, DM+Pio und Kontrolle) und Explantationszeitpunkt (4W und 12W nach Konduit-Implantation) je sechs von zehn Tieren. Dabei wurden die Subregionen A1, A2, B1 und B2 der explantierten Konduits für jedes Tier zusammengefasst verarbeitet und untersucht.

3.11.1 RNA-Isolation

Um mRNA-Material der explantierten Konduits mithilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu analysieren, musste im ersten Schritt eine Isolierung aus dem Konduit-Gewebe erfolgen. Jedes Konduit der Tiere, die für die mRNA-Analyse bestimmt waren, wurde isoliert für ca. 3 Minuten in 1 ml Trizol mithilfe eines elektrischen Metallhomogenisators zerkleinert bis makroskopisch keine Gewebeteilchen mehr zu erkennen waren. Das hergestellte Homogenisat wurde jeweils in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Hinzufügen von 200 μ l Chloroform wurden diese für 15 Sekunden stark geschüttelt und anschließend 25 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und das Volumen bestimmt. Das gleiche Volumen an 70 %igem Ethanol wurde hinzugefügt und mit einer Pipette durchmischt. Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem Qiagen Rneasy Mini Kit nach Herstellerangaben („RNA Cleanup“ Protokoll, S. 67–69 ab Punkt 3, einschließlich des Appendix D „Eliminating genomic DNA contamination“ S. 82).

3.11.2 Quantität und Qualität der mRNA

Die Quantifizierung der isolierten und aufgereinigten RNA wurde unmittelbar im Anschluss photometrisch mithilfe eines Tecan Readers und dem Programm i-control™ durchgeführt. Dafür wurden 2 μ l pro Probe auf eine NanoQuant Plate™ pipettiert, deren

optische Dichte gemessen und damit die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt werden konnte. Zur Bestimmung des Leerwertes dienten 2 µl RNase-freies Wasser. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei –80 °C gelagert.

Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde gemäß der MIQE Guidelines (Minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments) [85] eine fluoreszenzbasierte Kapillarelektrophorese durch das Genomics & Transcriptomics Labor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mithilfe des 5200 Fragment Analyzers durchgeführt. Für jede Probe wurde die RNA quality number (RQN) bestimmt, welche die Integrität der RNA auf einer Skala von 1–10 bewertet. Ein RQN-Wert von 1 repräsentiert dabei eine vollständig degradierte und fragmentierte RNA, während ein RQN-Wert von 10 hingegen für eine intakte RNA von sehr hoher Qualität steht [86]. Ein RQN-Wert von >5 wurde als ausreichend gut betrachtet.

3.11.3 Reverse Transkription

Für die mRNA-Expressionsanalyse mittels semiquantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR) ist eine vorausgehende Umschreibung der extrahierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) notwendig, da eine Amplifikation durch die Polymerasen nur am DNA-Strang möglich ist.

Die reverse Transkription erfolgte unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kits nach Herstellerangaben. Pro Probe wurde 1 µg Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese verwendet. Die Temperaturwechsel, die für die Reverse Transkription Voraussetzung sind, wurden mithilfe eines Thermocyclers durchgeführt. Die cDNA wurde anschließend durch Zugabe von 180 µl RNase-freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl verdünnt und bis zur Durchführung der qPCR bei –20 °C gelagert.

3.11.4 Primersequenzen

Zielgen	Vorwärtsprimer (5' → 3')	Rückwärtsprimer (5' → 3')
Tnf- α	GCTCCCTCTCATCAGTTCCA	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC
Il-1 β	AGGACCCAAGCACCTTCTTT	CATCATCCCACGAGTCACAG
Il-6	ACCACCCACAACAGACCAGT	AGTGCATCATCGCTGTTCAT

Rage	TGAACTCACAGCCAATGTCC	TCAGAGGTTTCCAAG
Bmp-2	GCTCAGCTTCCATCACGAA	AAGAAGAAGCGTCGGAAGT
OCN	AAGCAGGAGGGCAGTAAGGT	GTCCGCTAGCTCGTCACAAT
OPN	AAGCCTGACCCATCTCAGAA	ATGGCTTTCATTGGAGTTGC
Runx2	GATGACACTGCCACCTCTGA	GATGAAATGCCTGGGAACTG
Rpl13a	GAAAGGTGGTGGTTGTACGC	GAGACGGGTGGTGTTCATC
Actb	CCCGCGAGTACAACCTTCT	CGTCATCCATGGCGAACT
18s	CCGCAGCTAGGAATAATGGA	CCCTCTTAATCATGGCCTCA

Tabelle 14: Primersequenzen für die qPCR

3.11.5 Expressionsanalyse mittels semi-quantitativer PCR

Die mRNA-Expression wurde mittels qPCR quantifiziert. Anhand dieser Methode ist eine Vervielfältigung von Nukleinsäuren sowie eine Quantifizierung in Echtzeit durch die Messung eines Fluoreszenzfarbstoffes möglich. Als Fluoreszenzfarbstoff diente BRYT Green®, der sich an doppelsträngige DNA anlagert. Das Fluoreszenzsignal steigt somit proportional zur Amplifikationsrate.

Es wurde mit dem GoTag® qPCR Master Mix Kit und dem Referenzfarbstoff Carboxy-X-Rhodamin (CXR) nach Herstellerangaben gearbeitet. Acht Gene wurden untersucht, die inklusive der Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer in Tabelle 14 aufgeführt sind. Zusätzlich dienten die Gene für ribosomales Protein L13a (Rpl13a), Beta-Actin (Actb) und die 18S-ribosomale RNA (18S) als Referenzgene (housekeeper genes). Mithilfe der Referenzgene war es möglich, Unterschiede in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA auszugleichen. Pro 96-Well-Platte kam für jedes Gen eine Negativkontrolle zum Einsatz, bei der anstelle von cDNA RNase-freies Wasser verwendet wurde. Alle Proben wurden in Duplikaten mithilfe des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems und der StepOne™ Software v2.3 gemessen.

Um die Spezifität der Fluoreszenzfarbstoffanlagerung zu überprüfen, wurden die Schmelzkurven nach der PCR analysiert. Die Zyklusanzahl, bei der die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird als C_T -Wert angegeben und dient als Schwellenwert. Proben, deren Schmelzkurven doppelte Peaks aufwiesen, deren Doppelbestimmung >1 cycle threshold- (C_T -)Wert auseinander lagen oder deren C_T -Werte >34 betrugen, wurden wiederholt gemessen und bei weiterhin bestehender Abweichung

von der Auswertung ausgeschlossen. Zur Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode [87] angewandt.

3.12 Statistik

Die in der Arbeit erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft® Excel 2019 in Tabellen gesammelt. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism.

Um nicht-normalverteilte Variablen wie beispielsweise die Plasmawerte der Tiere in den verschiedenen Gruppen zu vergleichen, wurde ein non-parametrischer Kruskal–Wallis test angewendet. Anschließend folgte ein paarweiser Vergleich aller Gruppen und eine Korrektur durch einen Dunn's multiple comparisons test. Die einzelnen Gruppen wurden zudem deskriptiv anhand ihrer Mittelwerte, Standardabweichungen und Spannweiten der Werte miteinander verglichen.

Für die Analyse von zwei beeinflussenden Variablen, wie der BZ-Werte der drei Gruppen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten wurde eine two-way analysis of variance (ANOVA) mit anschließendem Tukey's multiple comparisons test verwendet.

Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Werte $> 0,05$ bis $\leq 0,055$ galten als nahezu signifikant, und p-Werte $> 0,055$ bis $\leq 0,07$ wurden als Trend interpretiert.

4 Ergebnisse

4.1 Blutanalysen und Gewicht

4.1.1 Blutzuckermessung und Gewicht

Über den Versuchsverlauf hinweg wurde bei allen Tieren der drei Versuchsgruppen zu fünf definierten Zeitpunkten das Gewicht und die Nüchternblutzuckerwerte nach 4 Stunden einer Nüchternperiode gemessen.

Dies sollte zur Überprüfung des Behandlungserfolges des angewandten diabetischen Modells (3.5) in den zwei Gruppen DM und DM+Pio dienen. Das Ziel des Modells war es, Übergewichtigkeit sowie erhöhte Blutzuckerwerte bei den Versuchstieren zu generieren, wie es auch bei einem Typ-2-Diabetes vorliegt.

Messzeitpunkte

1. Vor dem Start der HFD (−4W)
2. Vor der STZ- und Citrat-Injektion (−2W)
3. Vor der Operation zur Induktion einer Aorteninsuffizienz (−1W)
4. Vor der Konduitimplantation
5. Vor der Explantation (4W oder 12W)

Die BZ-Werte der Gruppen DM und DM+Pio waren ab einer Woche nach der STZ-Behandlung (−1W) zu allen Messzeitpunkten jeweils signifikant höher als die BZ-Werte der Kontrollgruppe sowohl bei den 4W-Tieren (−1W: DM $187,6 \pm 15,7$ mg/dl; DM+Pio $170,5 \pm 12,1$ mg/dl; Kontrolle $112,9 \pm 3,3$ mg/dl, Zeitpunkt 0: DM $167,5 \pm 10,7$ mg/dl; DM+Pio $165,4 \pm 10,5$ mg/dl; Kontrolle $126,0 \pm 4,0$ mg/dl, Explantationszeitpunkt 4W: DM $197,7 \pm 9,5$ mg/dl; DM+Pio $185,6 \pm 6,8$ mg/dl; Kontrolle $126,1 \pm 4,6$ mg/dl) als auch bei den 12W-Tieren (−1W: DM $167,3 \pm 13,5$ mg/dl; DM+Pio $171,5 \pm 13,4$ mg/dl; Kontrolle $121,8 \pm 3,7$ mg/dl, Zeitpunkt 0: DM $163,8 \pm 5,9$ mg/dl; DM+Pio $157,5 \pm 7,1$ mg/dl; Kontrolle $124,9 \pm 4,4$ mg/dl, Explantationszeitpunkt 12W: DM $203,6 \pm 6,8$ mg/dl; DM+Pio $174,0 \pm 6,8$ mg/dl; Kontrolle $118,6 \pm 6,8$ mg/dl).

Zudem waren die BZ-Werte innerhalb der Gruppen DM und DM+Pio zu beiden Explantationszeitpunkten (4W und 12W) jeweils signifikant höher als die BZ-Werte zu Versuchsbeginn (4W-Tiere: DM $113,8 \pm 2,5$ mg/dl; DM+Pio $112,5 \pm 2,96$ mg/dl, 12W-Tiere: DM $108,1 \pm 4,0$ mg/dl; DM+Pio $105,7 \pm 3,5$ mg/dl). Die Ratten der Kontrollgruppe, denen anstelle des STZs nur das Vehikel Citratpuffer injiziert wurde, zeigten zum Zeitpunkt der Explantation (4W oder 12W) keine signifikant erhöhten BZ-Werte im Vergleich zu den Werten zu Versuchsbeginn (4W-Tiere: $113,2 \pm 2,8$ mg/dl; 12W-Tiere: $114,4 \pm 2,4$ mg/dl).

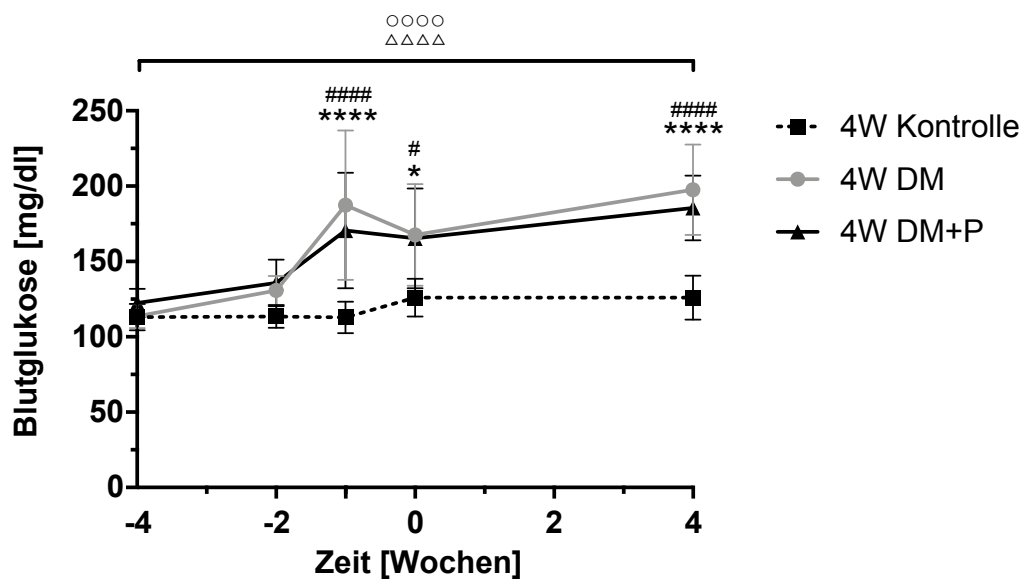


Abb. 6: Blutzuckerwerte der 4W-Tiere im Zeitverlauf

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM (standard error of the mean) der gemessenen BZ-Werte in den drei Gruppen 4W Kontrolle (n = 10), 4W DM (n = 10) und 4W DM+Pio (n = 10) zu fünf Zeitpunkten im Versuchsverlauf: zum Start der high-fat diet (-4W), vor der Streptozotocin/Citrat-Applikation (-2W), vor der Operation zur Induktion einer Aorteninsuffizienz (-1W), vor der Konduit-Implantation (0W), vor der Explantation (4W). Signifikanzen wurden berechnet mit two-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test: # $p \leq 0,05$ zwischen den Gruppen 4W Kontrolle und 4W DM; * $p \leq 0,05$ zwischen 4W Kontrolle und 4W DM+Pio; ##### $p \leq 0,0001$ zwischen 4W Kontrolle und 4W DM; **** $p \leq 0,0001$ zwischen 4W Kontrolle und 4W DM+Pio; ○○○○ $p \leq 0,0001$ innerhalb der 4W DM- Gruppe; △△△△ $p \leq 0,0001$ innerhalb der 4W DM+Pio-Gruppe. BZ = Blutzucker; DM = Diabetes mellitus; P/Pio = Pioglitazon; W = Wochen.

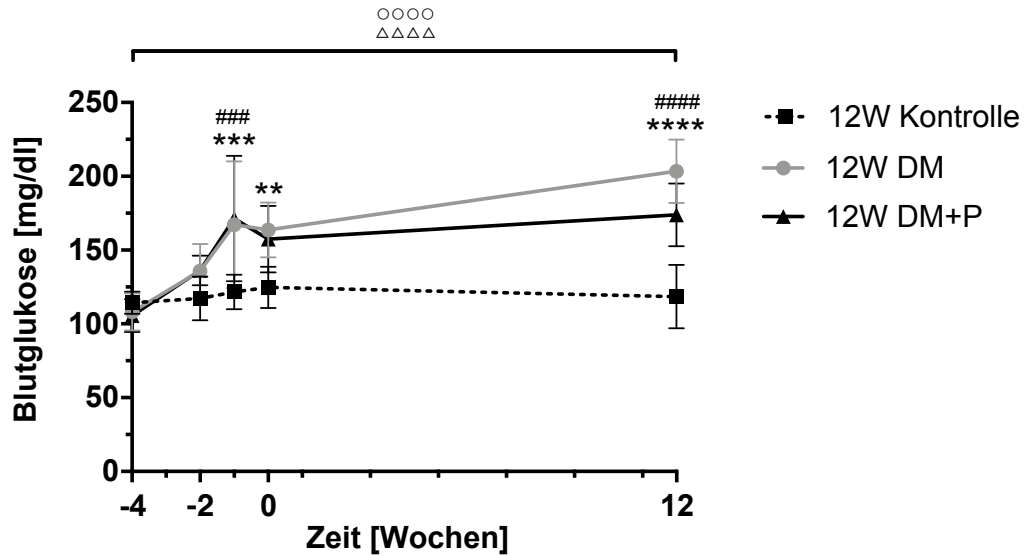


Abb. 7: Blutzuckerwerte der 12W-Tiere im Zeitverlauf

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der gemessenen BZ-Werte der drei Gruppen 12W Kontrolle (n=10), 12W DM (n=10) und 12W DM+Pio (n=10) zu fünf Zeitpunkten im Versuchsverlauf: zum Start der high-fat diet (-4W), vor der Streptozotocin/Citrat-Applikation (-2W), vor der Operation zur Induktion einer Aorteninsuffizienz (-1W), vor der Konduit-Implantation (0W) und vor der Explantation (12W). Signifikanzen wurden berechnet mit two-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test: # $p \leq 0,05$ zwischen den Gruppen 12W Kontrolle und 12W DM; * $p \leq 0,05$ zwischen 12W Kontrolle und 12W DM+Pio; #### $p \leq 0,0001$ zwischen 12W Kontrolle und 12W DM; **** $p \leq 0,0001$ zwischen 12W Kontrolle und 12W DM+Pio; oooo $p \leq 0,0001$ innerhalb der 12W DM-Gruppe; aaaa $p \leq 0,0001$ innerhalb der 12W DM+Pio-Gruppe. BZ=Blutzucker; DM = Diabetes mellitus; P/Pio = Pioglitazon; W = Wochen.

Das Gewicht der Ratten stieg in allen drei Gruppen über den gesamten Zeitverlauf des Versuches an und war jeweils innerhalb der Gruppen zu den Explantationszeitpunkten 4 und 12W nach Konduit-Implantation signifikant höher als zum Startzeitpunkt der HFD (4W-Tiere: DM $492,0 \pm 13,5$ mg/dl versus $270,7 \pm 6,3$ mg/dl; DM+Pio $519,6 \pm 23,4$ mg/dl versus $273,5 \pm 7,2$ mg/dl; Kontrolle $433,2 \pm 3,9$ mg/dl versus $274,8 \pm 4,4$ mg/dl, 12W-Tiere: DM $668,8 \pm 23,2$ mg/dl versus $263,2 \pm 5,5$ mg/dl; DM+Pio $701,5 \pm 19,5$ mg/dl versus $260,3 \pm 3,4$ mg/dl; Kontrolle $535,9 \pm 14,3$ mg/dl versus $271,2 \pm 3,6$ mg/dl). Zum Explantationszeitpunkt konnte ein signifikant höheres Gewicht der diabetischen Gruppen (DM und DM+Pio) im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

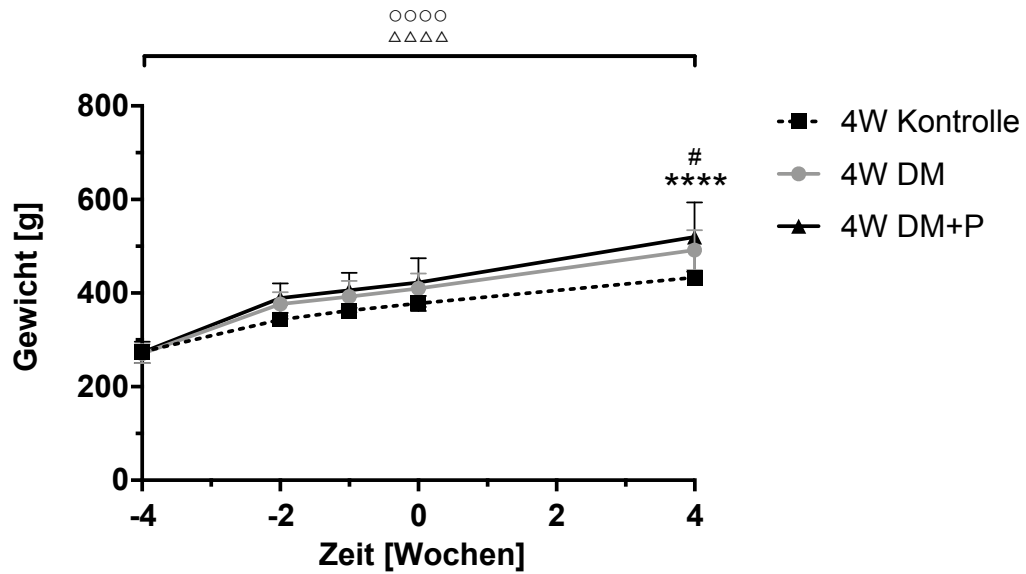


Abb. 8: Körpergewicht der 4W-Tiere im Zeitverlauf

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der gewogenen Körpergewichte der Ratten in den drei Gruppen: 4W Kontrolle (n = 10), 4W DM (n=10) und 4W DM+Pio (n=10) zu fünf Zeitpunkten im Versuchsverlauf: zum Start der high-fat diet (-4W), vor der Streptozotocin/Citrat-Applikation (-2W), vor der Operation zur Induktion einer Aorteninsuffizienz (-1W), vor der Konduit-Implantation (0W) und vor der Explantation (4W). Signifikanzen wurden berechnet mit two-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test: # $p \leq 0,05$ zwischen den Gruppen 4W Kontrolle und 4W DM; **** $p \leq 0,0001$ zwischen 4W Kontrolle und 4W DM+Pio; ■■■■ $p \leq 0,0001$ innerhalb der Kontrollgruppe; oooo $p \leq 0,0001$ innerhalb der 12W DM- Gruppe; ΔΔΔΔ $p \leq 0,0001$ innerhalb der 12W DM+Pio-Gruppe. DM = Diabetes mellitus; P/Pio = Pioglitazon; W = Wochen.

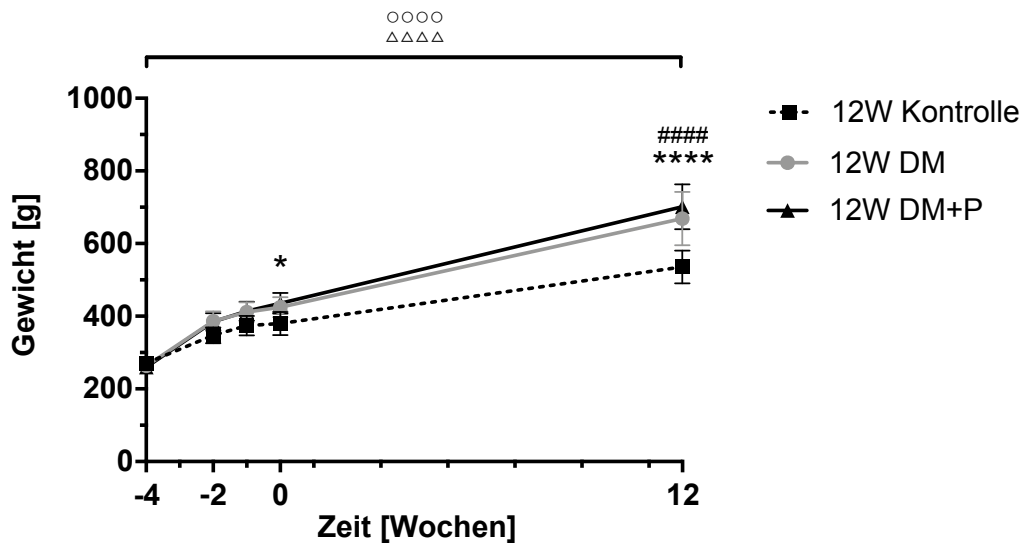


Abb. 9: Körpergewicht der 12W-Tiere im Zeitverlauf

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der gewogenen Körpergewichte der Ratten in den drei Gruppen: 12W Kontrolle (n = 10), 12W DM (n = 10) und 12W DM+Pio (n = 10) zu fünf Zeitpunkten im Versuchsverlauf: zum Start der high-fat diet (-4W), vor der Streptozotocin/Citrat-Applikation (-2W), vor der Aorteninsuffizienz-Operation (-1W), vor der Konduit-Implantation (0W) und vor der Explantation (12W). Signifikanzen wurden berechnet mit two-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test: ##### $p \leq 0,0001$ zwischen 12W Kontrolle und 12W DM; **** $p \leq 0,0001$ zwischen 12W Kontrolle und 12W DM+Pio; ■■■■ $p \leq 0,0001$ innerhalb der Kontrollgruppe; ○○○○ $p \leq 0,0001$ innerhalb der 12W DM- Gruppe; ▲▲▲▲ $p \leq 0,0001$ innerhalb der 12W DM+Pio-Gruppe. DM = Diabetes mellitus; P/Pio = Pioglitazon; W = Wochen.

4.1.2 Blutplasmaanalyse

Zum Zeitpunkt der Explantation wurde allen Ratten Blut entnommen, das laborchemisch auf die in Tabelle 15 aufgeführten Parameter untersucht wurde. Die klinischen Parameter Gesamtcholesterin, Triglyzeride und HDL waren in der DM-Gruppe der 4W-Tiere signifikant höher als die Werte der Kontrollgruppe. Im Vergleich zur diabetischen Gruppe ohne Pioglitazonbehandlung zeigten die mit Pioglitazon behandelten Tiere nach 4 Wochen nahezu signifikant niedrigere Gesamtcholesterinwerte ($p = 0,0503$). Zum Explantationszeitpunkt nach 12 Wochen zeigten die untersuchten Parameter eine ähnliche Konstellation wie nach 4 Wochen, wobei jedoch lediglich bei den Triglyzeridwerten (DM versus Kontrolle) ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte.

	4 Wochen			12 Wochen		
	Kontrolle	DM	DM+Pio	Kontrolle	DM	DM+Pio
K (mmol/l)	3.3 ± 0.3	3.9 ± 0.5#	3.51 ± 0.5	3.3 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.3
Ca (mmol/l)	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1
Ph (mmol/l)	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,9 ± 00,4	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,3
Krea (mg/dl)	0.28 ± 0.1	0.32 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.35 ± 0.1	0.38 ± 0.07	0.35 ± 0.1
Chol (mg/dl)	48.6 ± 7.3	67.1 ± 11.8#	53.7 ± 9.2	59.4 ± 9.9	71.1 ± 12.2	68.2 ± 13
TG (mg/dl)	46 ± 10.3	152.9 ± 65.3#	93.4 ± 29.9#	79.5 ± 32	132 ± 46#	101 ± 35
HDL (mg/dl)	29.5 ± 5.8	43.8 ± 10.7#	33.8 ± 8.5	38.8 ± 9.1	47.7 ± 10.3	46.2 ± 9.7
LDL (mg/dl)	10.5 ± 1.7	11.5 ± 3.2	13.2 ± 2.8	12.2 ± 2.8	12.9 ± 4	12.9 ± 4
AST (mg/dl)	95 ± 43.8	77.4 ± 22.4	69.6 ± 15.7	64.3 ± 11.9	87.9 ± 32.5	75.1 ± 13.5
ALT (mg/dl)	36 ± 7.6	53.5 ± 17.5#	63.8 ± 13.2#	48.3 ± 13.9	54.3 ± 15.7	67.9 ± 20.9

Tabelle 15: Blutplasmaergebnisse

Angegeben sind die Mittelwerte ± SD der Blutplasmawerte zum Zeitpunkt der Explantation nach vier oder zwölf Wochen. Die Statistische Auswertung erfolgte mit einem Kruskal–Wallis test und Dunn’s multiple comparisons test. # p < 0,05 (versus Kontrolle); * p < 0,05 (versus DM). DM= Diabetes mellitus; Pio = Pioglitazon; K = Kalium; Ca = Calcium; Ph = Phosphat; Krea = Kreatinin; Chol = Gesamtcholesterin; TG = Triglyzeride; HDL = high density lipoprotein; LDL = low density lipoprotein; AST = Aspartat-Aminotransferase; ALT = Alanin-Aminotransferase.

4.2 Quantitative Auswertung der Neointima-Hyperplasie und Mediaproliferation

Bei vier von zehn Tieren jeder Gruppe zu jedem Explantationszeitpunkt wurden die explantierten Konduits zur histologischen Analyse verwendet. Zur Quantifizierung der Neointima-Hyperplasie sowie Mediaproliferation als Schlüsselindikatoren der Degeneration von Bioprothesen wurden die Breite der Media und Intima an HE-gefärbten Präparaten gemessen. Die Messung erfolgte an den Gefäßpräparaten der Subregionen A2, B1 und B2.

Nach 4W zeigte die DM-Gruppe die ausgeprägteste Intimahyperplasie ($35,3 \pm 9,7 \mu\text{m}$), während die DM+Pio-Gruppe die geringsten Intimamesswerte aufwies ($12,1 \pm 1,6 \mu\text{m}$). Dennoch waren die Unterschiede der Intimabreiten zwischen den drei Gruppen zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

Die höchsten Werte der Mediabreite konnten zu den jeweiligen Zeitpunkten sowohl nach 4W als auch nach 12W in der DM-Gruppe beobachtet werden (4W: $141,9 \pm 7,3 \mu\text{m}$, 12W: $145,7 \pm 10,46 \mu\text{m}$). Nach 4W lag in der DM-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied vor (DM $141,9 \pm 7,3 \mu\text{m}$ versus Kontrolle $87,5 \pm 7,3 \mu\text{m}$). Die DM+Pio-Gruppe zeigte sowohl nach 4W als auch nach 12W eine signifikant geringere Mediaproliferation im Vergleich zur diabetischen Versuchsgruppe ohne medikamentöse Behandlung (4W: DM+Pio $100,3 \pm 8,3 \mu\text{m}$ versus DM $141,9 \pm 7,3 \mu\text{m}$, 12W: DM+Pio $99,1 \pm 8,5 \mu\text{m}$ versus DM $145,7 \pm 10,46 \mu\text{m}$).

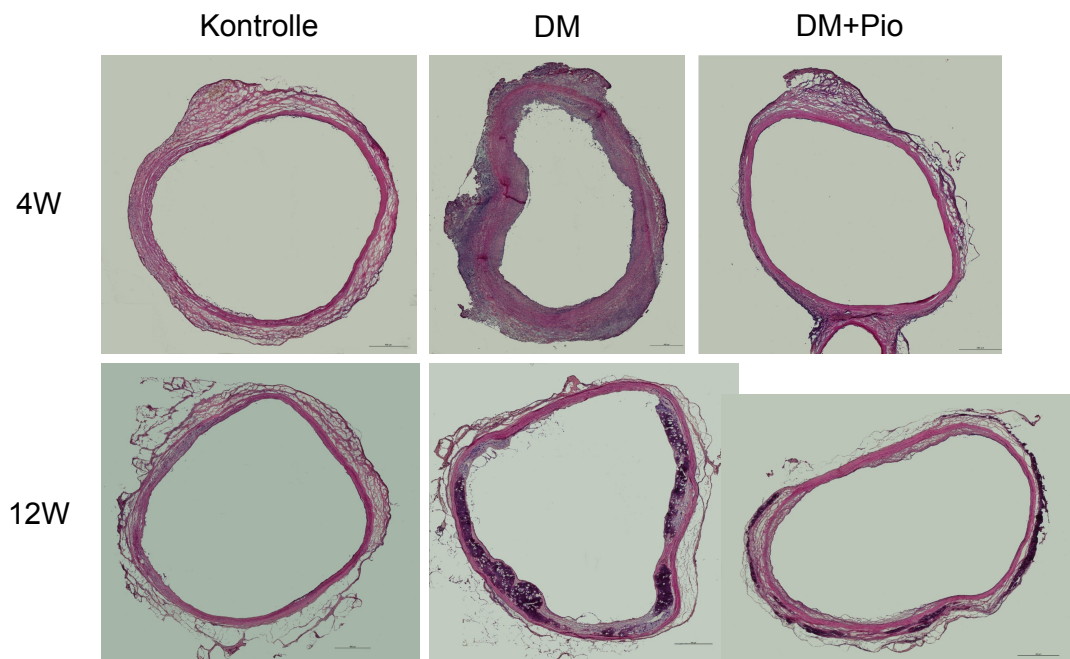


Abb. 10: Repräsentative HE-Präparate der Konduits auf Gefäßebene für jede Gruppe

Abgebildet sind mikroskopische Aufnahmen von HE-gefärbten Konduit-Präparaten auf Gefäßebene (A2-B2). Für jede Gruppe und zu beiden Zeitpunkten ist ein histologisches Präparat im Querschnitt repräsentativ dargestellt; Maßstab: 400 μm . DM = Diabetes mellitus; Pio = Pioglitazon; W = Wochen; HE = Hämatoxylin-Eosin.

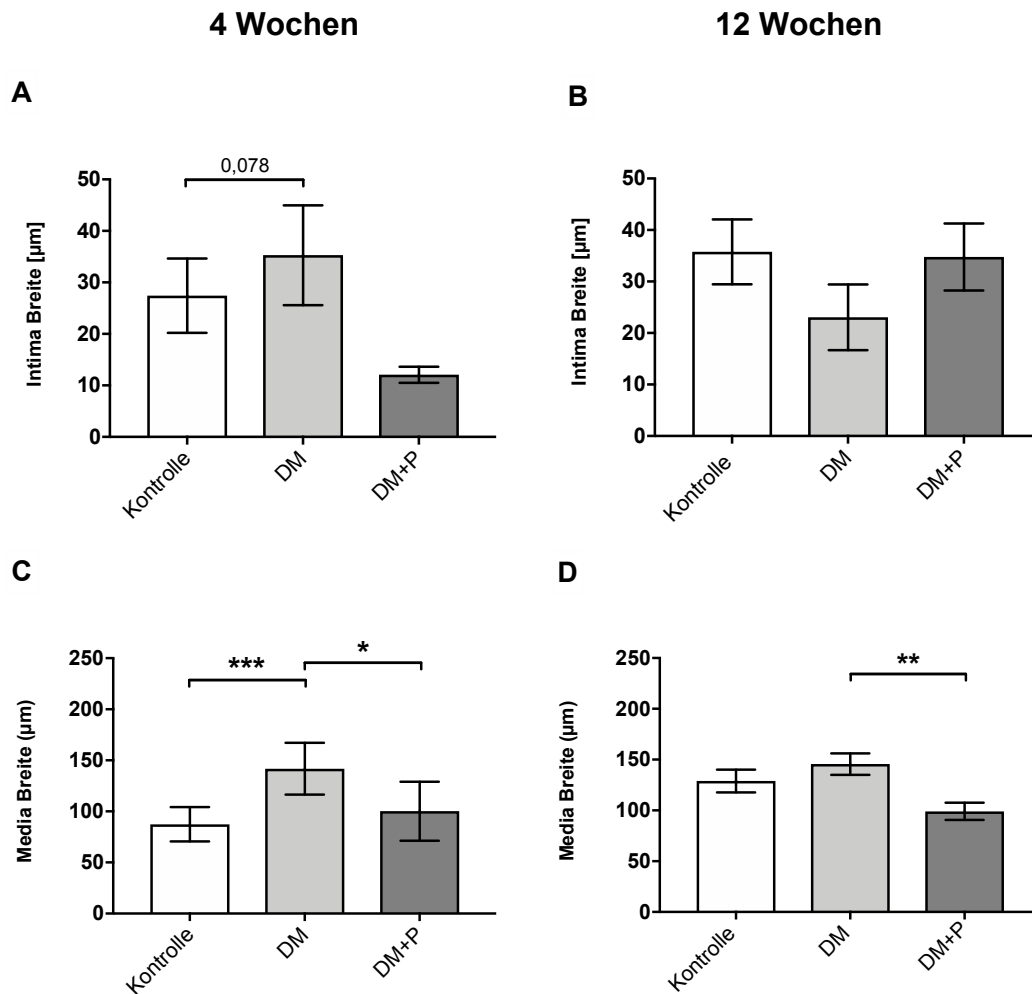


Abb. 11: Intima- und Mediabreite der Gefäßregionen A2, B1 und B2 der Konduitimplantate

Anhand von HE-gefärbten histologischen Querschnittspräparaten der Gefäßkonduits wurde die Intima- und Mediabreite der Subregionen A2-B2 gemessen. Für jede Subregion wurden drei Präparate zur Analyse herangezogen. Es sind die Mittelwerte $\pm$ SEM aller gemessenen Werte der Intima und der Media pro Versuchsgruppe (Kontrolle, DM und DM+Pio) zu beiden Explantationszeitpunkten (nach vier und zwölf Wochen) dargestellt. Signifikanzen wurden mit einem Kruskal-Wallis test und Dunn's multiple comparisons test berechnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. HE = Hämatoxylin-Eosin; DM = Diabetes mellitus; P/Pio = Pioglitazon.

4.3 Quantifizierung der kalzifizierenden Degeneration

Das Maß der Verkalkung der Aortenkonduits wurde histologisch mithilfe der Von Kossa-Färbung sowie der Färbung durch Alizarinrot-S sichtbar gemacht und analysiert. Von Kossa-versilberte Präparate wurden mithilfe eines Scoringsystems bewertet und Alizarinrot-S-gefärbte Präparate anhand einer prozentualen Flächenmessung der rot anreichernden verkalkten Areale analysiert (3.10.7).

4.3.1 Aortenwandverkalkung

Die Aortenwand der Konduitimplantate wurde mit je einem Präparat für jede Subregion A2-B2 untersucht. Dabei wurde die Intima getrennt von der Media betrachtet. Die Alizarinrot-S-Färbung wurde zur Überprüfung der Von Kossa-Ergebnisse an den 12W-Tieren durchgeführt. Zum Zeitpunkt nach 4W erreichte die DM-Gruppe sowohl in der Intima als auch in der Media die höchste Punktzahl. Allerdings lag zwischen den drei Gruppen kein signifikanter Unterschied der Verkalkungsgrade vor.

4 Wochen

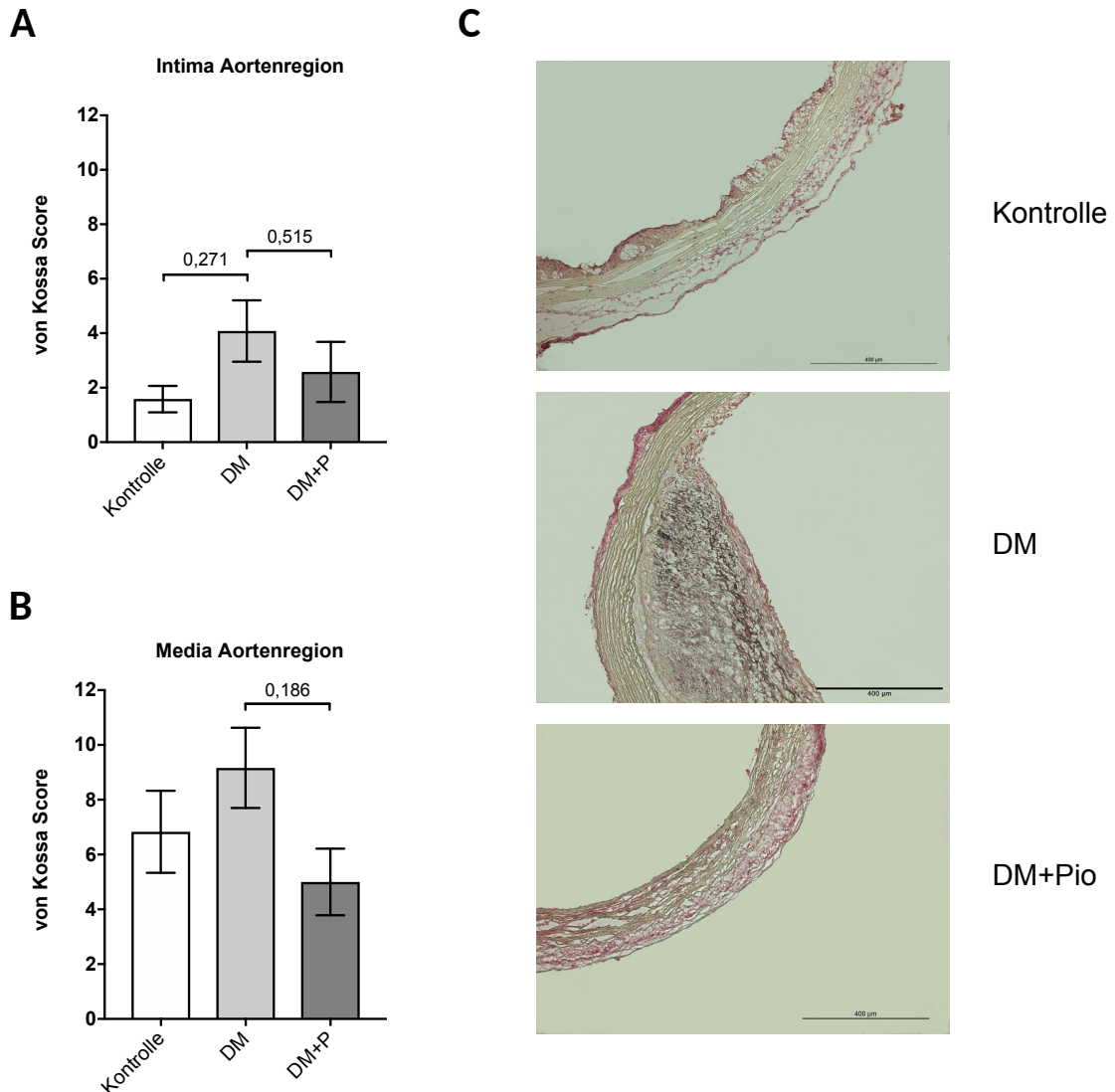


Abb. 12 Intima- und Mediaverkalkung auf Gefäßebene nach vier Wochen

Dargestellt sind die Ergebnisse der Von Kossa-gefärbten Präparate der Gefäßsubregionen A2-B2 der 4W- Tiere. **(A)** Kalzifikationsscore der Intima. Mittelwerte $\pm$ SEM der Intimawerte pro Versuchsgruppe (Kontrolle, DM und DM+Pio). **(B)** Kalzifikationsscore der Media. Mittelwerte $\pm$ SEM der Mediawerte pro Versuchsgruppe (Kontrolle, DM und DM+Pio) Signifikanzen wurden berechnet mit einem Kruskal–Wallis test und Dunn’s multiple comparisons test. **(C)** Repräsentative Mikroskopaufnahmen der drei Gruppen nach 4W; Maßstab 400 μ m. DM = Diabetes mellitus; P/Pio = Pioglitazon; W = Wochen.

Zwölf Wochen nach der Konduitimplantation lag in der DM-Gruppe ein deutlich ausgeprägter Grad der Gefäßwandverkalkung sowohl in der Intima als auch in der Media vor. Die DM+Pio-Gruppe zeigte trotz diabetischer Bedingungen eine signifikant geringere Konduitverkalkung in der Media im Vergleich zur DM-Gruppe ohne Pioglitazonbehandlung (DM+Pio $11,17 \pm 5,62$ versus DM $20,83 \pm 7,78$).

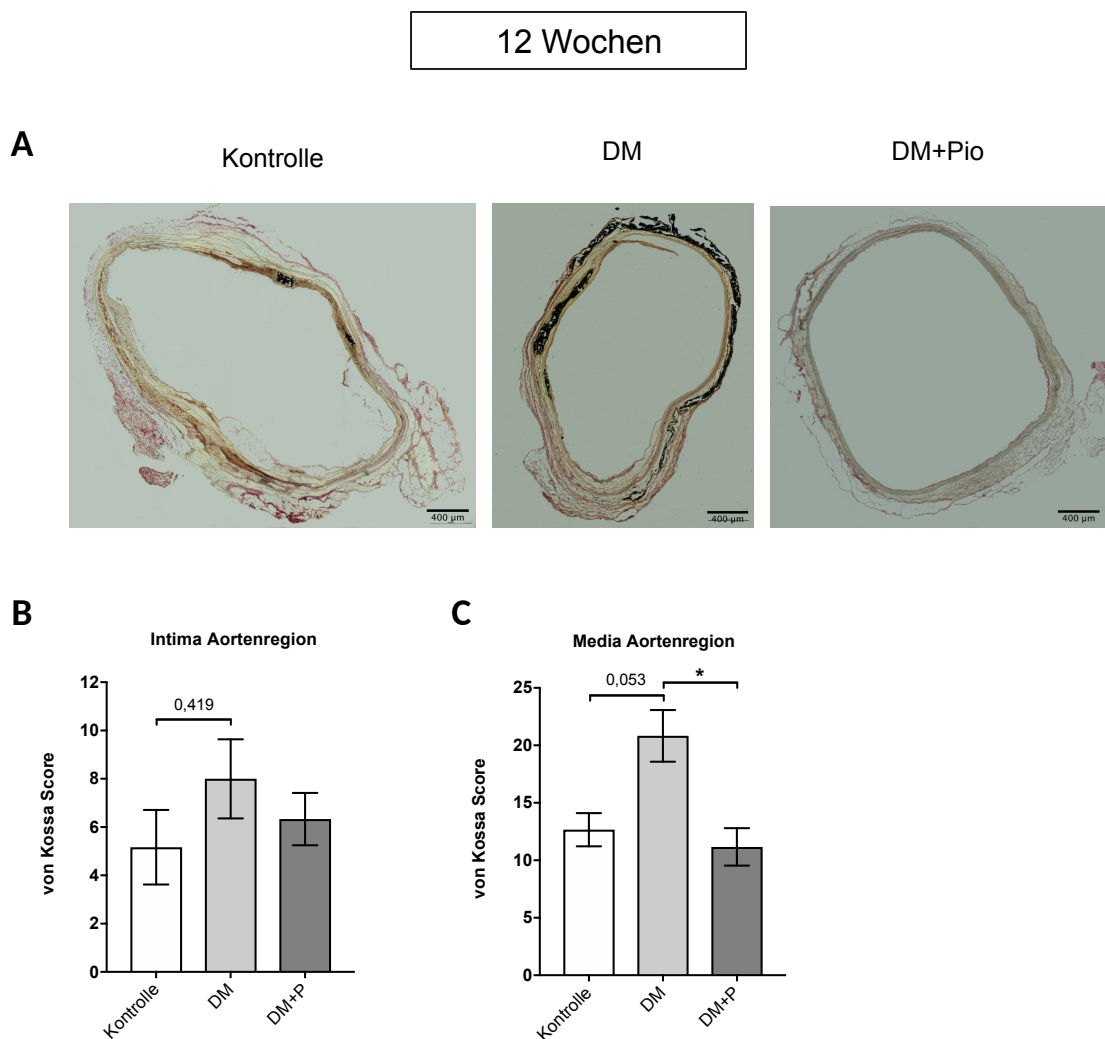


Abb. 13: Intima- und Mediaverkalkung auf Gefäßebene nach zwölf Wochen

Dargestellt sind die Ergebnisse der Von Kossa-gefärbten Präparate der Gefäßsubregionen A2-B2 der 12W-Tiere. (A) Repräsentative Mikroskopaufnahmen der drei Gruppen nach 12W; Maßstab: 400 µm. (B) Kalzifikationscore der Intima. Mittelwerte $\pm$ SEM der Intimawerte pro Versuchsgruppe (Kontrolle, DM und DM+Pio). (C) Kalzifikationscore der Media. Mittelwerte $\pm$ SEM der Mediawerte pro Versuchsgruppe. Signifikanzen wurden berechnet mit einem Kruskal-Wallis test und Dunn's multiple comparisons test. DM = Diabetes mellitus; P/Pio = Pioglitazon; W = Wochen.

Die Ergebnisse der Alizarinrot-S-Färbung der Gefäßpräparate A2-B2 bestätigten die Von Kossa-Ergebnisse der 12W-Tiere durch eine ähnliche Verteilung der Verkalkungsgrade in den Gruppen. Unter diabetischen Bedingungen lag eine deutliche Zunahme der verkalkten Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe (DM $12,05 \pm 12,51$ versus Kontrolle $4,14 \pm 5,31$) als auch im Vergleich mit der Pioglitazon behandelten Gruppe ($5,75 \pm 9,08$) vor.

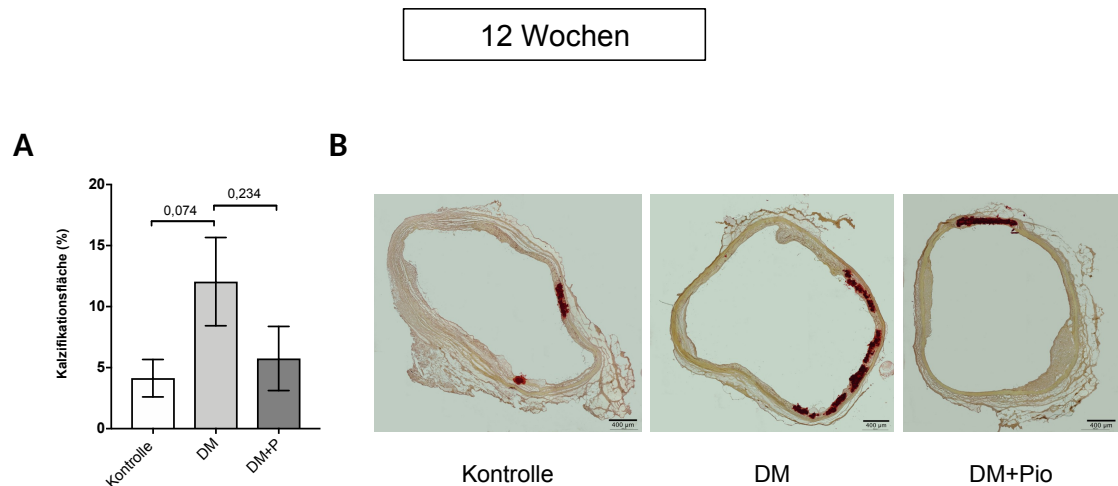


Abb. 14: Verkalkungsfläche der Gefäßsubregionen A2-B2 der 12W-Tiere

Dargestellt ist die prozentuale Kalzifikationsfläche (Intima + Media) der Alizarinrot-S-gefärbten Präparate der Subregionen A2-B2 der 12W-Tiere. **(A)** Mittelwerte $\pm$ SEM der drei Gruppen Kontrolle, DM und DM+Pio nach 12W. Signifikanzen wurden berechnet mit einem Kruskal–Wallis test und Dunn’s multiple comparisons test. **(B)** Repräsentative Mikroskopaufnahmen der Alizarinrot-S-gefärbten Präparate pro Gruppe; Maßstab: 400 μ m. DM = Diabetes mellitus; P/Pio = Pioglitazon.

4.3.2 Kalzifizierende Degeneration der Klappenregion

Die Verkalkung der Klappenebene A1 der Konduits wurde anhand von mit Alizarinrot-S (12 W) und Von Kossa (4 und 12W) histologischen Präparaten quantifiziert. Die Von Kossa-Präparate wurden mithilfe eines 5-Punkte-Scores bewertet, während die 12W-Alizarinot-S-Präparate mittels prozentualer Flächenmessung ausgewertet wurden.

Zum Zeitpunkt vier Wochen nach Implantation konnte anhand der Von Kossa-Präparate ein signifikanter Unterschied der Klappenverkalkung in Gesamtbetrachtung zwischen den diabetischen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (DM $4,42 \pm 1,56$ versus Kontrolle $0,58 \pm 1,00$) festgestellt werden. In den Gruppen DM und DM+Pio ($4,7 \pm 1,88$) lagen ähnliche Werte vor.

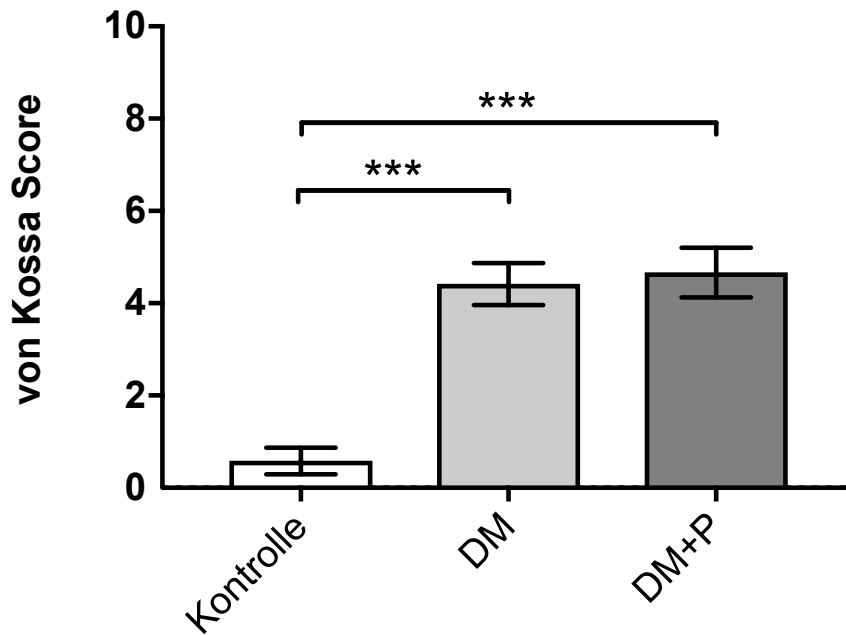


Abb. 15: Verkalkung auf Klappenebene nach vier Wochen

Die Verkalkung der Aortenklappen des Konduits (A1) wurde mithilfe der Von Kossa-Versilberung dargestellt und anhand eines Scores bewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der drei Gruppen Kontrolle, DM und DM+Pio nach 4W. Signifikanzen wurden mit einem Kruskal–Wallis test und Dunn’s multiple comparisons test berechnet. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. DM = Diabetes mellitus; P = Pioglitazon.

Nach zwölf Wochen lag sowohl bei der separaten Betrachtung der Von Kossa-gefärbten Klappentaschen als auch für die gesamte Klappen-Querschnittsfläche in den diabetischen Gruppen ein signifikant höherer Verkalkungsgrad vor im Vergleich zur Kontrollgruppe (Taschen: DM $5,0 \pm 1,4$ und DM+Pio $5,0 \pm 1,8$ versus Kontrolle $1,0 \pm 1,41$; Gesamt: DM $5,58 \pm 1,31$ und DM+Pio $4,83 \pm 1,70$ versus Kontrolle $2,10 \pm 1,88$). Allerdings konnte weder in den Unterregionen (Taschen, Anuli und Kommissuren) noch bei den Gesamtwerten eine statistische Signifikanz zwischen den diabetischen Gruppen (+/–Pio) nachgewiesen werden.

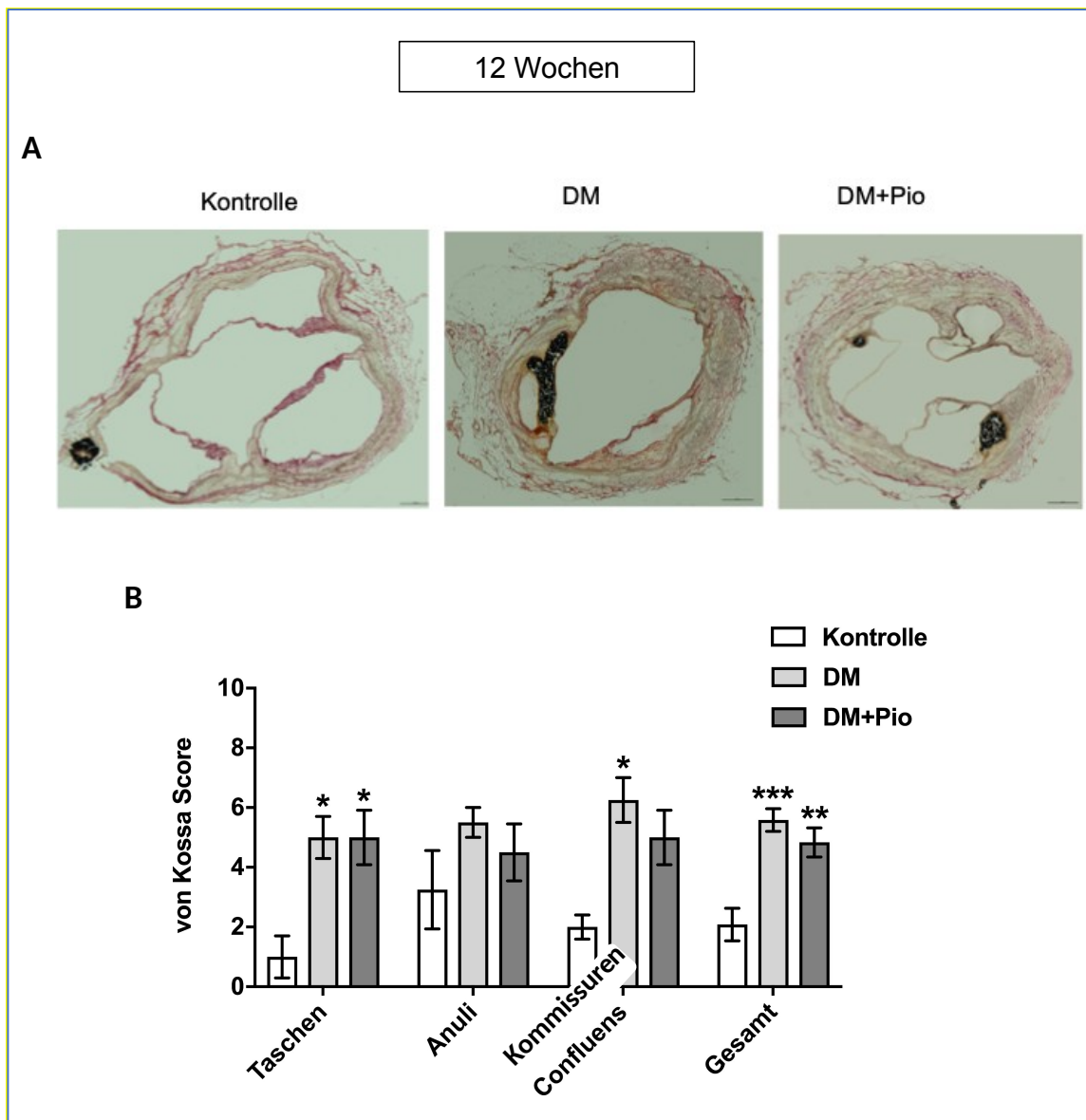
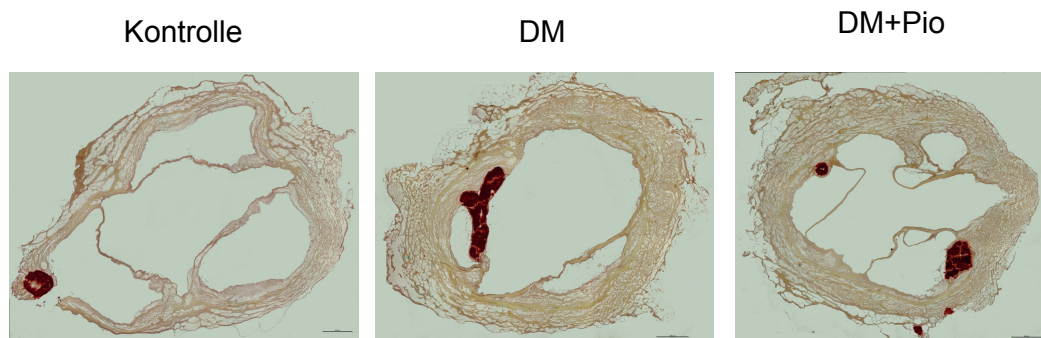


Abb. 16: Verkalkung der Aortenklappen nach zwölf Wochen

Abgebildet sind die Ergebnisse der semi-quantitativen Analyse der Aortenklappenverkalkung (A1) der 12W-Tiere. Von Kossa-gefärbte Präparate ($n = 4$) wurden anhand eines 5-Punkte-Scores ausgewertet. Dabei wurden die drei Regionen Klappentaschen, Anuli und Kommissuren getrennt voneinander bewertet. (A) Repräsentative Mikroskopaufnahmen der Von Kossa-gefärbten A1-Präparate für jede Gruppe. Maßstab: 400 μm . (B) Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der Klappenunterregionen (Taschen, Anuli und Kommissuren) sowie die Gesamtwerte der drei Gruppen Kontrolle, DM und DM+Pio nach 12W. Signifikanzen wurden berechnet mittels two-way ANOVA und anschließend Tukey's multiple comparisons test. Signifikanzen zur Kontrollgruppe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. DM = Diabetes mellitus; Pio = Pioglitazon; W = Wochen.

Die Analyse der mit Alizarinrot-S-gefärbten A1-Präparate der 12W-Tiere, anhand welcher die prozentuale Verkalkungsfläche der Aortenklappen im Querschnitt gemessen wurde, bestätigte die Gesamtergebnisse der Von Kossa-Färbung.

A



B

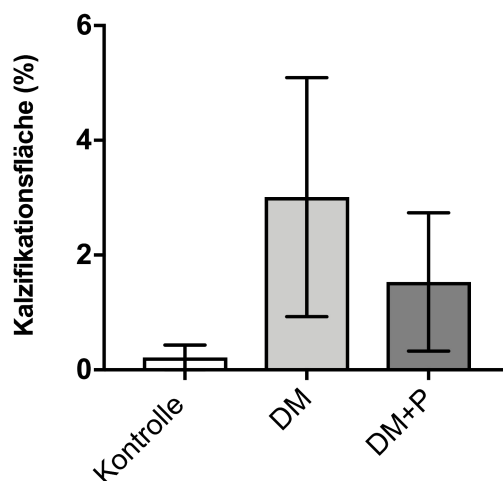


Abb. 17: Ergebnisse der Alizarinrot-S-gefärbten Aortenklappenpräparate

Anhand von Alizarinrot-S-gefärbten Präparaten der 12W-Tiere wurde die prozentuale Verkalkungsfläche der Aortenklappen im Querschnitt bestimmt. (A) Repräsentative Mikroskopaufnahmen für jede Gruppe. Maßstab: 400 μ m. (B) Mittelwerte $\pm$ SEM der drei Gruppen Kontrolle, DM und DM+Pio nach 12W. Signifikanzen wurden mit einem Kruskal-Wallis test und Dunn's multiple comparisons test berechnet. DM = Diabetes mellitus; P/Pio = Pioglitazon; W = Wochen.

4.4 Immunhistologie

In glatten Gefäßmuskelzellen kommt α -SMA als prädominante Isoform der Aktine vor, welche elementare Bestandteile des kontraktilen Apparates darstellen. Die Expression von α -SMA korreliert dabei mit der Aktivierung von Myofibroblasten im Rahmen der Fibrogenese [81]. Von-Willebrand-Faktor wird in Endothelzellen gebildet. Antikörper gegen diesen ermöglichen somit die Darstellung der Endothelschicht der Aortenwand.

α -SMA war in allen Versuchsgruppen der 12W-Tiere in der Media sowie der Intima stark positiv. Der quantitative Anteil von α -SMA fiel in der Kontrollgruppe jedoch deutlich niedriger aus als in den jeweiligen Diabetesgruppen. Der Anteil von α -SMA wurde in den Gruppen DM-Pio und DM+Pio als gleichwertig betrachtet.

Da das Endothel kryokonservierter Bioprothesen zum Zeitpunkt der Implantation meist vollständig degeneriert ist, basiert die in den folgenden Analysen bewertete vWF-Expression auf der Reendothelialisierung durch Endothelzellen aus dem Empfängergerewebe [88, 89].

Eine vWF-Färbung lag in der Kontrollgruppe in den zu den Lumina zugewandten einreihigen Endothelschichten nahezu ununterbrochen vor. Im Vergleich dazu konnte vWF nur vereinzelt in den beiden Diabetesgruppen detektiert werden.

4.5 Genexpressionsanalyse der explantierten Bioprothesen

Bei sechs von zehn Tieren pro Gruppe zu jedem Zeitpunkt (4W und 12W) wurden die explantierten Konduits mittels qPCR auf die Expression der in der Methodik aufgelisteten Gene untersucht.

Die Gene OPN, OCN, Bmp-2 und Runx2 werden mit einer chondro-osteogenen Transformation in Verbindung gebracht, im Rahmen welcher glatte Gefäßmuskelzellen zu osteoblastenähnlichen Zellen differenzieren [8, 90].

Vier Wochen nach der Konduitimplantation war die Expression von OPN und Bmp-2 in der mit Pioglitazon behandelten Diabetesgruppe signifikant geringer als die Expression in der Kontrollgruppe (OPN: DM+Pio $0,50 \pm 0,24$ versus Kontrolle $2,84 \pm 2,57$, BMP2: DM+Pio $0,68 \pm 0,36$ versus Kontrolle $1,36 \pm 0,62$). Zwölf Wochen nach

Implantation konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden.

Zwischen den drei Versuchsgruppen lag zu keinem Zeitpunkt eine signifikant unterschiedliche Expression der Gene Runx2 (4W: Kontrolle $1,58 \pm 0,82$; DM $1,56 \pm 0,76$; DM+Pio $1,80 \pm 1,01$, 12W: Kontrolle $0,49 \pm 0,26$; DM $0,56 \pm 0,49$; DM+Pio $0,57 \pm 0,46$) und OCN (4W: Kontrolle $1,72 \pm 1,18$; DM $1,06 \pm 0,61$; DM+Pio $0,60 \pm 0,27$, 12W: Kontrolle $0,05 \pm 0,02$; DM $0,19 \pm 0,40$; DM+Pio $0,44 \pm 0,60$) vor.

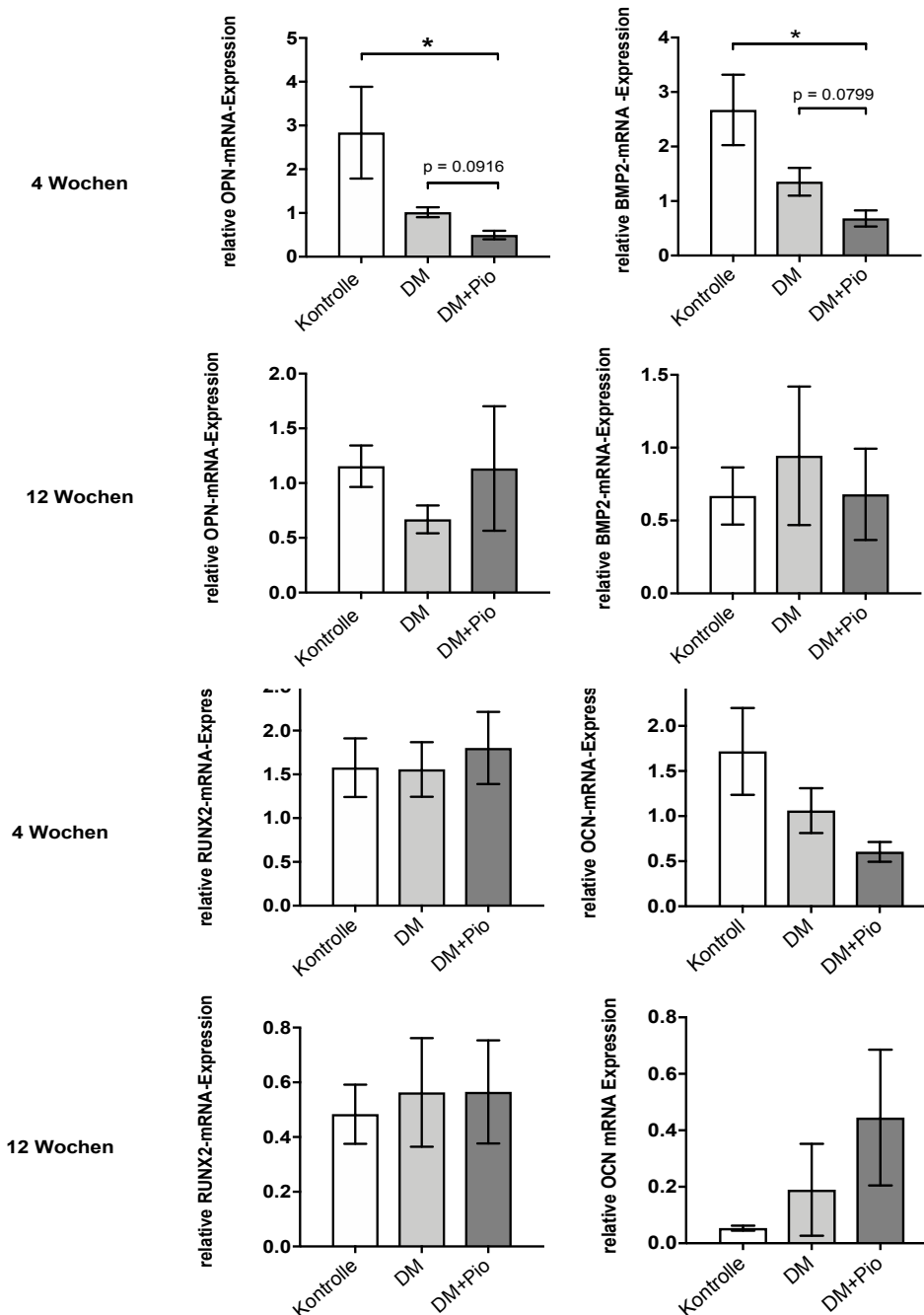


Abb. 18: mRNA-Expression von chondro-ostegenen Markern in den Aortenkonduits

Gezeigt ist die relative mRNA-Expression der Gene OPN, OCN, Bmp-2 und Runx2 in den Aortenkonduits für jede Gruppe zu beiden Explantationszeitpunkten (n=6). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikanzen wurden mit einem Kruskal-Wallis test und Dunn's multiple comparisons test berechnet.
 * $p < 0,05$; DM = Diabetes mellitus; Pio = Pioglitazon.

Die Analyse der inflammatorischen Marker ergab in den drei Gruppen zu beiden Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied. Dazu gehörten TNF- α , IL-6, Interleukin-1 β (IL-1 β), und der Rezeptor für fortgeschrittene Glykationsendprodukte (RAGE, receptor for advanced glycation endproducts).

4.5.1 Qualität der mRNA

Die durch die Integritätsmessung ermittelten RQN-Werte aller RNA-Proben lagen zwischen 6,0 und 10,0 und bestätigten damit eine ausreichend gute Qualität zur weiteren Analyse.

5 Diskussion

Ziel der Studie war es, den potenziellen pharmakologischen Einfluss des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon auf die Degeneration klappentragender Aortenbioprothesen in einem Rattenmodell unter diabetischen Bedingungen zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Degeneration unter diabetischen Bedingungen sowohl auf Klappenebene als auch entlang des Aortenbogens stärker ausgeprägt war als in der Kontrollgruppe.

Als wesentliches Ergebnis konnte eine signifikant hemmende Wirkung durch die tägliche orale Gabe von Pioglitazon auf die kalzifizierende Degeneration einer bioprothetischen Aorta und Aortenklappe bei diabetischen Ratten identifiziert werden. Die schützende Wirkung auf morphologischer Ebene ging mit einer signifikant reduzierten Genexpression von OPN und Bmp-2 einher.

5.1 Das Streptozotocin-induzierte Diabetesmodell und seine metabolischen Effekte in der Ratte

Zur Untersuchung der Effekte von Pioglitazon auf klappentragende Aortenbioprothesen in einem diabetischen Milieu war der Einsatz eines Tiermodells erforderlich, das die pathophysiologischen Bedingungen der Diabeteserkrankung möglichst realitätsnah abbildet. In der Literatur sind insbesondere die Tiermodelle mit Zucker-Ratten und Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)-Ratten bekannt, um einen Diabetes mellitus Typ 2 zu imitieren. Der Tierstamm der sogenannten Zucker-Ratten trägt eine Mutation im fa-Gen, das für den Leptinrezeptor kodiert und zur gestörten Sättigungsregulation führt. OLETF-Ratten hingegen weisen eine Deletion des Gens für den Cholecystokin-1-Rezeptor auf, was ebenfalls eine gestörte Sättigungsregulation zur Folge hat. Beide Modelle entwickeln in der Folge Hyperphagie, Adipositas, Insulinresistenz und einen metabolischen Phänotyp, der dem des humanen Typ-2-Diabetes stark ähnelt [91-94]. Neben diesen genetisch prädisponierten Modellen wurden in verschiedenen Studien auch rein diätinduzierte Modelle (z. B. HFD bei Wistar- oder Sprague-Dawley-Ratten) eingesetzt. Diese führen zwar zuverlässig zu Adipositas

und Insulinresistenz, die Manifestation einer stabilen Hyperglykämie bleibt jedoch variabel, setzt meist eine lange Versuchsdauer voraus und ist insgesamt weniger reproduzierbar als in genetischen oder kombinierten Modellen [95-97]. Zur Etablierung einer diabetischen Stoffwechsellage entschieden wir uns für ein Modell von Mansor et al., welches dem klinisch beobachteten Szenario bei der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes näherkommt [57]. Dieses beinhaltete zwei Komponenten: zum einen eine niedrigdosierte STZ-Injektion, die durch die toxische Wirkung auf die Betazellen der Bauchspeicheldrüse einen relativen Insulinmangel hervorruft, und zum anderen eine fettreiche Diät. Durch die folgenden Ergebnisse konnten wir annehmen, dass unser angewandtes Modell, welches eine diabetische Stoffwechsellage imitieren sollte, erfolgreich war. Das Modell führte in der DM-Gruppe und in der DM+Pio-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der BZ-Werte und zu einer signifikanten Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Adipositas gilt als Hauptursache des Typ-2-Diabetes [98] und geht mit erhöhten Triglyzeriden einher. Die Blutuntersuchungen der beiden Versuchsgruppen DM und DM+Pio wiesen einen signifikanten Anstieg der Triglyzeride im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, was auf einen erhöhten Anteil an viszeralem Fettgewebe hindeutet, welches eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von DM spielt [99-102]. Diese Befunde bestätigen die erfolgreiche Etablierung eines Typ-2-Diabetes-ähnlichen Stoffwechselmodells in der Ratte und bilden die Grundlage für die weitere Untersuchung der Wirkung von Pioglitazon auf Bioprothesen.

5.2 Lipidsenkende Effekte von Pioglitazon bei Typ-2-Diabetes

Pioglitazon ist vor allem für seine Wirkung zur Verbesserung der Insulinsensitivität und zur Regulierung des Blutzuckerspiegels bei Patienten mit Typ-2-Diabetes bekannt. In einer Vielzahl von Studien konnte in der klinischen Anwendung zudem ein protektiver Effekt auf das kardiovaskuläre System nachgewiesen werden, insbesondere bei Patienten mit Typ-2-Diabetes [69, 103, 104]. Die genauen ursächlichen Faktoren für die Reduktion des kardiovaskulären Risikos sind noch nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass positive Veränderungen in den Lipidparametern, dem Blutzuckerspiegel sowie dem Blutdruck hierzu maßgeblich beitragen könnten [103].

Die Blutanalysen dieser Arbeit zeigten in der mit Pioglitazon behandelten Gruppe niedrigere Triglyzerid- und Gesamtcholesterinspiegel im Vergleich zur unbehandelten DM-Gruppe, sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen. Nach 4 Wochen lagen unter Pioglitazon im Vergleich zur unbehandelten Diabetesgruppe nah-signifikant niedrigere Gesamtcholesterinwerte vor, darüber hinaus wurden jedoch keine Signifikanzen erreicht. Auch wenn die vorliegenden Daten somit keine eindeutigen Aussagen erlauben, deckt sich dieses Ergebnis mit zahlreichen Studien, die eine positive Wirkung von Pioglitazon auf das Lipidprofil belegen [105, 106]. Pioglitazon verbessert die Insulinsensitivität in Leber-, Muskel- und Fettgewebe, was zu einer erhöhten Aufnahme von Fettsäuren und Glukose führt, wodurch die Triglyzeridspiegel gesenkt werden [104, 107]. Darüber hinaus wird die Triglyzeridansammlung in der Leber reduziert [108]. Eine Senkung des Gesamtcholesterins wurde nicht in allen Studien beobachtet. Jedoch fördert Pioglitazon die Aktivität der Lipoproteinlipase, was den Abbau von very low-density lipoprotein (VLDL) und eine Verbesserung des HDL/LDL-Verhältnisses zur Folge hat [107, 109].

5.3 Einfluss von Pioglitazon auf klappentragende Aortenbioprothesen unter diabetischen Bedingungen

5.3.1 Neointimabildung und endotheliale-zu-mesenchymale Transition

Bei Menschen mit Diabetes mellitus schreiten Gefäßveränderungen wie die Atherosklerose unter hyperglykämischen Bedingungen beschleunigt voran [110]. Ein zentraler Prozess der Atherosklerose ist die Neointimabildung, die sowohl durch Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMC) als auch durch die endotheliale-zu-mesenchymale Transition (EndMT) vermittelt wird [111-113]. Bei der EndMT transdifferenzieren Endothelzellen in mesenchymale Zelltypen und wandern in das subendotheliale Gewebe ein – ein Mechanismus, der nicht nur in nativen Gefäßen, sondern auch in biologischen Gefäßprothesen beschrieben wurde [114]. Auch nach Implantation kryokonservierter Gefäßbioprothesen ist die Neointimabildung ein zentraler Bestandteil der Gefäßremodellierung [115]. In diesem Zusammenhang wird sie nicht nur durch die Proliferation und Migration von VSMCs, sondern auch durch die EndMT reendothelialisierender Empfängerzellen begünstigt und trägt maßgeblich zur Verdickung der Tunica Intima bei. Die EndMT ist gekennzeichnet durch den Verlust

endothelialer Marker wie vWF sowie die vermehrte Expression mesenchymaler Marker wie α -SMA [116-118]. Diese Mechanismen spielen eine bedeutende Rolle bei der Remodellierung und funktionellen Integration der Bioprothesen [114, 119].

Im Rahmen unseres Projekts ließ sich in den immunhistologischen Untersuchungen nach zwölf Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verstärkte α -SMA-Expression in den beiden Diabetesgruppen (mit und ohne Pioglitazonbehandlung) beobachten, was auf eine Aktivierung von Myofibroblasten und eine mögliche Zunahme der EndMT hinweist. Gleichzeitig war die Expression von vWF in den Diabetesgruppen deutlich reduziert, was auf eine gestörte Reendothelialisierung und auf eine endotheliale Dysfunktion hinweisen kann. Das Endothel kryokonservierter Bioprothesen ist zum Zeitpunkt der Implantation meist vollständig degeneriert [88]. Die Reendothelialisierung erfolgt postoperativ durch Einwanderung von Endothelzellen aus dem Empfängergerewebe, die das Lumen der Prothese neu auskleiden [89]. Die diabetischen Bedingungen könnten sowohl eine gestörte Reendothelialisierung als auch eine verstärkte EndMT begünstigen. In der Kontrollgruppe fielen diese Veränderungen deutlich schwächer aus, was die Auswirkungen des Diabetes auf die endothelialen Umbauprozesse unterstreicht. Frühere Arbeiten stützen diese Befunde: So konnten Tsai et al. in vitro zeigen, dass hyperglykämische Bedingungen in humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) eine verstärkte EndMT induzieren [120]. Auch Salzberg et al. beschrieben in einem murinen Modell mit Venenautografts eine zunehmende Neointimaentwicklung bei diabetischen Mäusen im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollen, was den Einfluss eines diabetischen Milieus auf vaskuläre Remodellierungsprozesse zusätzlich untermauert [121]. Ergänzend belegt die Studie von Ping et al., dass in einem STZ-induzierten diabetischen Mausmodell an autologen venösen Gefäßgrafts fortgeschrittene Glykationsendprodukte (AGEs) zusammen mit mechanischem Stress die Apoptose und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen modulieren und so zur Pathogenese der Neointimabildung beitragen [122].

In unseren morphometrischen Analysen zeigten sich nach 4 Wochen in der mit Pioglitazon behandelten Gruppe niedrigere Werte der Intimadicke im Vergleich zur unbehandelten DM-Gruppe ($p = 0,077$). Auch wenn dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war, könnte er auf einen frühen Einfluss von Pioglitazon auf EndMT und

vaskuläre Remodellierung hindeuten. Nach 12 Wochen war dieser Effekt jedoch nicht mehr erkennbar.

Zusammenfassend deuten die immunhistologischen und morphometrischen Befunde darauf hin, dass diabetische Bedingungen die endothelialen Umbauprozesse in Bioprothesen beeinträchtigen und eine verstärkte EndMT begünstigen. Pioglitazon könnte in der Frühphase protektiv auf diese Prozesse wirken, jedoch war der Effekt zeitlich begrenzt. Die Ergebnisse korrespondieren mit der aktuellen wissenschaftlichen Literatur und stützen die bestehende Evidenzlage zur protektiven Wirkung von Pioglitazon auf vaskuläre Umbauprozesse. In einem Rattenmodell mit kryokonservierten allogenen Aortenkonduits zeigte Assmann et al., dass eine Behandlung mit Pioglitazon sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen postoperativ zu einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung führte [76]. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen von Igarashi et al. überein, die in einem Modell mit balloninduzierter arterieller Gefäßverletzung bei Ratten eine Hemmung der Proliferation von VSMCs und der Neointimabildung durch Pioglitazon nachwies [72]. Auch in vitro wird dieser Zusammenhang gestützt, etwa durch die Arbeiten von Wan et al., die zeigten, dass Pioglitazon über die Aktivierung von PPAR γ die Proliferation von VSMCs hemmt und deren Apoptose fördert [123]. Einen möglichen Erklärungsansatz für die frühe Wirksamkeit liefert die Arbeit von Law et al., in der eine erhöhte PPAR γ -Proteinexpression in VSMCs an Tag 7 und 14 nach Gefäßverletzung beschrieben wurde [124].

Der in unserer Studie beobachtete anfängliche hemmende Effekt könnte im weiteren Verlauf durch Mechanismen wie eine Resistenzentwicklung oder kompensatorische, PPAR γ -unabhängige Prozesse der vaskulären Remodellierung aufgehoben werden. Ob Pioglitazon die Neointimabildung in kryokonservierten Bioprothesen auch über die Frühphase hinaus dauerhaft und unter diabetischen Bedingungen wirksam hemmen kann, ist damit nicht abschließend geklärt und sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

5.3.2 Kalzifikation und Mediaproliferation der Aortenbioprothesen

Zur Bewertung der Verkalkung der Aortenbioprothesen wurden die histologischen Färbungen Von Kossa und Alizarinrot-S eingesetzt. Die Von Kossa-Färbung zeigte im

Kurz- und Langzeitversuch in der Intima und der Media die ausgeprägteste Verkalkung bei der DM-Gruppe im Vergleich zur Kontroll- und DM+Pio-Gruppe. Die Alizarinrot-S-Färbung bestätigte diese vermehrte Kalzifikation unter diabetischen Bedingungen. Beide Methoden deuten somit auf eine verstärkte Verkalkung der bioprothetischen Gefäßwand bei Diabetes mellitus hin. Die fehlende statistische Signifikanz in unserer Studie könnte durch die geringe Stichprobengröße bedingt sein, weshalb längere Beobachtungszeiträume und größere Kohorten für zukünftige Untersuchungen sinnvoll erscheinen. Diabetes mellitus gilt in der Fachliteratur als ein bedeutender Risikofaktor für eine beschleunigte Gefäßverkalkung [125, 126]. Insbesondere die Mönckeberg-Sklerose, die zu erhöhter Gefäßsteifigkeit und Elastizitätsverlust führt [127], wird mit Diabetes assoziiert. Eine Querschnittsanalyse von Zwakenberg et al. zeigte, dass mediale Verkalkungen bei Diabetespatienten häufiger auftreten als intimale Verkalkungen [128]. Dieser Befund wird durch zahlreiche Studien gestützt, die eine starke Verbindung zwischen medialer Kalzifikation und Diabetes mellitus bestätigen [129, 130]. Auch wenn der Forschungsstand zur Verkalkung biologischer Gefäßprothesen unter diabetischen Bedingungen bislang weniger umfassend ist als für native Gefäße, legen unsere histologischen Befunde nahe, dass Diabetes mellitus die Kalzifikation von Gefäßbioprothesen beschleunigen könnte. In diese Richtung weist auch die Arbeit von Castagna et al., die bei Patienten mit Diabetes mellitus eine höhere Inzidenz und ein stärkeres Ausmaß der Verkalkung autologer Venenbypässe beschrieben [131]. Ergänzend zeigten Ping et al., dass in einem diabetischen Mausmodell transplantierte venöse Grafts eine verstärkte Atherosklerose aufwiesen [122]. Unsere Ergebnisse reihen sich damit in bestehende Befunde ein und liefern Hinweise auf eine vergleichbare Kalzifikationsproblematik auch in biologischen Gefäßprothesen.

Ein weiteres Ergebnis unserer Studie war die verstärkte Mediaproliferation der Aortenbioprothesen unter diabetischen Bedingungen. Bereits nach vier Wochen wies die DM-Gruppe eine signifikant verdickte Media im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten, dass in den Diabetesgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verstärkte Expression von α -SMA in der Media vorlag, was auf eine vermehrte Aktivierung von Myofibroblasten unter diabetischen Bedingungen schließen lässt. Nach zwölf Wochen war der Unterschied der Mediabreite nicht mehr signifikant, da auch in der Kontrollgruppe eine Zunahme der Media beobachtet wurde. Diese Daten deuten darauf hin, dass sich bereits in der Frühphase des

Typ-2-Diabetes strukturelle Veränderungen der Gefäßwand manifestieren, die möglicherweise mit einer Mediaproliferation einhergehen. Die Ergebnisse decken sich mit den Befunden von Ping et al., die in einem diabetischen Mausmodell mit autologen venösen Gefäßgrafts zeigten, dass erhöhte AGEs in Kombination mit mechanischem Stress die Proliferation von VSMCs steigern und somit zur Verdickung der Media beitragen [122]. Zahlreiche klinische Studien an Typ-2-Diabetikern zeigen eine erhöhte Intima-Media-Dicke in nativen Gefäßen, was zusammen mit unseren Studienergebnissen nahelegt, dass die durch Diabetes induzierte Gefäßwandverdickung auch in biologischen Gefäßprothesen eine vergleichbare pathophysiologische Relevanz besitzen könnte [132-134].

Die Behandlung mit Pioglitazon führte in unserem Versuchsmodell sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen zu einer signifikanten Reduktion der Mediabreite der Aortenbioprothese, trotz persistierender diabetischer Stoffwechsellage. Dies deutet auf eine potenziell schützende Wirkung von Pioglitazon hin, die es ermöglicht, die durch Diabetes induzierte Verdickung der Gefäßwand zu verlangsamen. Entsprechende Befunde zeigen Onursal et al. in humanen Saphenous-Venenbypassen, in denen Pioglitazon oxidative Stressreaktionen, MMP-vermittelte Entzündungen sowie die Proliferation von VSMCs unter hohen Glukosebedingungen reduzierte [135]. Ergänzend belegen Wang et al., dass PPAR- γ -Agonisten die Proliferation von VSMCs durch Herunterregulierung des RAGE-Rezeptors hemmen können [73]. Unterstützend hierzu zeigen klinische Studien an nativen Gefäßen, dass Pioglitazon die Intima-Media-Dicke bei Typ-2-Diabetikern signifikant reduzieren oder deren Zunahme verlangsamen kann [71, 136], was auf eine ähnliche hemmende Wirkung auf die Gefäßwandverdickung in vivo hinweist. Die Verabreichung von Pioglitazon führte in unserer Studie nicht nur zu einer Hemmung der Mediaproliferation, sondern auch zu einer signifikanten Reduktion des Kalzifizierungsgrads in der Media im Vergleich zur unbehandelten DM-Gruppe nach 12 Wochen. Diese Beobachtung legt eine potenziell schützende Wirkung von Pioglitazon gegen die Entwicklung einer Mönckeberg-Sklerose unter diabetischen Bedingungen nahe. Ein reduzierter Verkalkungsgrad der Media war bereits nach 4 Wochen erkennbar, erreichte jedoch erst zum späteren Analysezeitpunkt (12W) ein statistisches Signifikanzniveau. Unsere Befunde zur Hemmung der Mediaproliferation und Kalzifikation durch Pioglitazon fügen sich in die Ergebnisse von Assmann et al. ein, die in Aortenbioprothesen eine signifikante Reduktion der medialen Verkalkung

dokumentierten [44]. Diese Ergebnisse ergänzen die von Gaillard et al., die in einem Rattenmodell der elastokalzinotischen Arteriosklerose, einer Form medialer Gefäßverkalkung mit Schädigung des elastischen Fasergerüsts, eine signifikante Reduktion der medialen Kalzifikation und der Aortensteifigkeit beobachteten, was auf verbesserte Gefäßelastizität hinweist [137]. Die Verkalkung des elastischen Fasergerüsts spielt eine zentrale Rolle beim Elastizitätsverlust der Gefäße. Klinische Relevanz erhält dieser Zusammenhang durch Sugawara et al., die in einer randomisierten Studie mit 136 Typ-2-Diabetikern eine signifikante Reduktion der Pulswellengeschwindigkeit (PWV), eines indirekten Markers für arterielle Steifigkeit, zeigten. Dieser Effekt trat unabhängig von der glykämischen Kontrolle auf. Zudem wurde bei Pioglitazon-behandelten Patienten ein signifikanter Anstieg von Adiponektin beobachtet [74], ein möglicher unabhängiger Mechanismus, auf den später eingegangen wird.

5.3.3 Kalzifikation der Aortenklappenbioprothese

Die strukturelle Klappendegeneration (SVD) stellt die weitaus häufigste Ursache für das Versagen bioprothetischer Herzklappen dar. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Verkalkung der Klappensegel, die zu einer progredienten Stenose und infolge eines Klappensegeleinrisses zu einer akuten Insuffizienz führen kann [138].

Zur Analyse der bioprothetischen Aortenklappen auf Verkalkungen wurde die Klappenregion analog zu den Aortenabschnitten histologisch mittels der Von Kossa- sowie der Alizarinrot-S-Färbung untersucht. Die Auswertung der Von Kossa-gefärbten Präparate zeigte in der Diabetesgruppe ohne Pioglitazonbehandlung zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine signifikant stärkere Verkalkung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Analyse der mit Alizarinrot-S-gefärbten Aortenklappen bestätigte diese Ergebnisse. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass Diabetes mellitus die Kalzifikation der bioprothetischen Aortenklappen maßgeblich begünstigt und somit einen relevanten Risikofaktor für die frühzeitige Prothesendegeneration darstellt.

Dass Diabetes ein relevanter Risikofaktor für die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (CAVD) darstellt, wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben [139-141]. So zeigte ein Mausmodell mit kombinierter Dyslipidämie und Typ-2-Diabetes, dass die Verkalkung der nativen Aortenklappen im Vergleich zu Mäusen mit isolierter Dyslipidämie signifikant verstärkt war [140]. Diese experimentellen

Befunde werden durch klinische Daten gestützt: Mosch et al. konnten anhand histopathologischer Analysen explantierter Aortenklappen nachweisen, dass Patienten mit Typ-2-Diabetes eine deutlich ausgeprägtere valvuläre Verkalkung aufwiesen als nicht-diabetische Patienten [141]. Die Degeneration bioprothetischer Aortenklappen ähnelt in vielen Aspekten den degenerativen Prozessen der CAVD, wobei sich auch gemeinsame Risikofaktoren identifizieren lassen. In einer multizentrischen italienischen Studie von Lorusso et al. wurden die bioprothetischen Herzklappen von insgesamt 6.184 Patienten untersucht. In diesem multivariaten Modell stellte sich Diabetes als stärkster unabhängiger Risikofaktor für die strukturelle Klappendegeneration (SVD) heraus, wobei Typ-2-Diabetes mit einer signifikant schnelleren Progression der SVD verbunden war [50]. Auch in einer prospektiven Kohortenstudie von Briand et al., die 124 Patienten nach bioprothetischem Aortenklappenersatz mittels serieller Echokardiographien nachbeobachtete, wurde Diabetes als signifikanter Prädiktor für eine beschleunigte SVD identifiziert [142].

Mithilfe der Von Kossa- und Alizarinrot-S-Färbung untersuchten wir weiterhin die potenziell hemmende Wirkung von Pioglitazon auf die Kalzifizierung der bioprothetischen Aortenklappen. In der mit Pioglitazon behandelten Diabetes-Gruppe zeigte sich eine kleinere Verkalkungsfläche im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, wobei in keiner der beiden Analysen eine statistische Signifikanz erreicht wurde. Obwohl bislang keine weitere Studie bekannt ist, die explizit die hemmende Wirkung von Pioglitazon auf die Kalzifizierung bioprothetischer Aortenklappen unter diabetischen Bedingungen untersucht, existieren verwandte Arbeiten. So konnten Katahira et al. in einem Modell chronischer Niereninsuffizienz eine signifikante Reduktion der Verkalkung bioprothetischer Aortenklappen durch Pioglitazon nachweisen [70]. Darüber hinaus zeigen Studien an nativen Aortenklappen im Kleintiermodell eine hemmende Wirkung von Pioglitazon auf die Verkalkung. Li et al. demonstrierten diesen Effekt unter diabetischen Bedingungen, vermittelt durch eine Herunterregulation des RAGE-Rezeptors [47]. Chu et al. berichteten in einem hypercholesterinämieinduzierten Modell ebenfalls von einer verminderten Klappenverkalkung, die auf entzündungshemmende und lipidmodulierende Effekte zurückgeführt wurde [143]. Diese Befunde untermauern das therapeutische Potenzial von Pioglitazon, wobei die Übertragbarkeit auf bioprothetische Klappen unter diabetischen Bedingungen weiterhin eingehender untersucht werden muss. Für eine systematische Evaluierung dieses Potenzials

erscheinen größere Tierkohorten, längere Beobachtungszeiträume sowie ergänzende quantitative Analysen, beispielsweise chemische Kalziumassays oder fluoreszenzbasierte Verfahren, sinnvoll, um die Aussagekraft der Ergebnisse weiter zu erhöhen.

5.3.4 Chondro-osteogene Transdifferenzierung

Die Pathophysiologie der Arteriosklerose einerseits und der SVD andererseits ist komplex und bislang nicht vollständig verstanden. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass osteoblastenähnliche Zellen in beiden Prozessen eine zentrale Rolle einnehmen, wobei Parallelen zur Osteoblastogenese im Knochenstoffwechsel bestehen [90, 144-147]. Dabei bezeichnet man den Prozess, bei dem Zellen ihre ursprüngliche Identität verlieren und einen osteoblastenähnlichen Phänotyp annehmen, als osteogene Transdifferenzierung [148].

Bisherige Studien zeigen, dass kalzifizierte menschliche Aortenklappen eine vermehrte Expression ossärer Marker wie BMP-2, OPN und OCN aufweisen [149-152]. Osteopontin, ein phosphoryliertes Glykoprotein, das Calciumphosphat-Kristalle binden kann, spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der Biomineralisation [153]. Shen et al. fanden eine enge Korrelation zwischen der OPN-Expression und dem Ausmaß der Verkalkung bioprothetischer Herzklappen beim Menschen [154]. BMP-2 wiederum induziert die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen zu Osteoblasten und aktiviert den Transkriptionsfaktor RUNX2, welcher die Expression weiterer osteogener Gene wie OCN reguliert [155]. Gómez-Stallons et al. zeigten, dass in humanen verkalkten Aortenklappen eine verstärkte BMP-2-Expression mit einer Aktivierung des BMP-Signalwegs einhergeht und dass die Hemmung dieses Signalwegs in vitro sowie im Mausmodell die Klappenverkalkung reduziert [156]. Weiterhin wurde OPN in einem Rattenmodell während der Neointimabildung verstärkt exprimiert, und die nachgewiesene Präsenz in menschlichen atherosklerotischen Plaques deutet auf eine Beteiligung an der Pathogenese der Atherosklerose hin [157]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz der osteogenen Marker BMP-2, OPN, OCN und RUNX2 als Indikatoren ossärer Umbauprozesse sowohl im vaskulären als auch im valvulären Gewebe.

Hinweise auf eine pathophysiologisch relevante Rolle einzelner osteogener Marker bei Diabetes mellitus liefert die Arbeit von Chen et al., die in Gefäßproben diabetischer

Patienten eine verstärkte Kalzifikation sowie eine erhöhte Expression ossärer Marker wie OPN nachweisen konnten. Ergänzend dazu zeigten ihre in-vitro-Experimente, dass ein hyperglykämisches Milieu die BMP-2-Expression erhöht und die Kalzifikation von VSMCs fördert [125]. Diese Daten stützen die Annahme, dass ein hyperglykämisches Milieu die osteogene Differenzierung von VSMCs fördert und so zur verstärkten Gefäßverkalkung bei Diabetes beiträgt.

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse analysierten wir in unserer Studie die Expression osteogener Marker (BMP-2, OPN, RUNX2 und OCN) in klappentragenden Aortenbioprothesen unter diabetischen Bedingungen sowie den potenziellen modulierenden Einfluss von Pioglitazon. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pioglitazon in ossäre Differenzierungsprozesse eingreift und diese möglicherweise hemmt. In der DM+Pio-Gruppe waren die Expressionsniveaus von Bmp-2 und OPN nach vier Wochen signifikant niedriger gegenüber der Kontrollgruppe, gegenüber der unbehandelten DM-Gruppe jedoch nicht signifikant. Die erhöhte Expression in der unbehandelten DM-Gruppe zu diesem frühen Zeitpunkt weist auf eine rasche Aktivierung ossärer Umbauvorgänge unter diabetischen Bedingungen hin. Die beobachtete Hemmung der Mediaverkalkung in der DM+Pio-Gruppe, zusammen mit der reduzierten Expression osteogener Marker, unterstützt die Hypothese einer durch Pioglitazon vermittelten Hemmung der osteogenen Differenzierung von VSMCs unter diabetischen Bedingungen. Diese Hypothese wird durch Befunde von Zhou et al. gestützt, die in Ratten-VSMCs zeigten, dass Hyperglykämie die ossäre Differenzierung fördert, erkennbar an erhöhter Mineralisierung und der Hochregulation osteogener Marker, während PPAR γ -Agonisten diesen Prozess signifikant hemmen konnten [158]. Auch Assmann et al. konnten in ihrem Rattenmodell zeigen, dass Pioglitazon die Expression osteochondraler Marker wie OPN, OCN und Bmp-2 in klappentragenden Aortenbioprothesen reduzierte [44]. In unserem Modell waren diese Effekte jedoch zeitlich begrenzt: Nach zwölf Wochen zeigte sich kein signifikanter hemmender Effekt von Pioglitazon mehr. Möglicherweise war der pro-osteogene Zustand des Gewebes unter diabetischen Bedingungen nach 12 Wochen bereits so weit fortgeschritten, dass die protektiven Effekte von Pioglitazon nicht mehr ausreichten, um die weitere Gewebedegeneration effektiv zu verhindern. Dies könnte die im Vergleich zur frühen Phase abgeschwächten Effekte auf die Expression osteogener Marker erklären.

Zahlreiche Studien zeigen, dass Typ-2-Diabetes über eine gesteigerte AGE-Akkumulation und chronische Entzündungsprozesse zur beschleunigten Kalzifikation beiträgt – auch in bioprothetischen Herzklappen [48, 159, 160]. Unsere Ergebnisse der RT-PCR lieferten allerdings keine Hinweise für inflammatorische Prozesse, die zur Verkalkung beigetragen haben könnten. Dies legt nahe, dass neben den untersuchten inflammatorischen Markern weitere Mechanismen an der Klappenkalzifikation beteiligt sein könnten.

In einem nach Abschluss dieser Arbeit publizierten Datensatz konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Pioglitazon im Vergleich zur unbehandelten Diabetesgruppe sowie zur Kontrollgruppe zu signifikant erhöhten Adiponektinplasmaspiegeln führte [78]. Adiponektin gilt als gefäßprotektiv, da es die Insulinsensitivität verbessert und antiatherogene Effekte entfaltet [161]. In Tiermodellen zeigte sich bei Adiponektin-defizienten Mäusen eine verstärkte Neointimabildung nach Gefäßverletzung, während die Supplementierung mit Adiponektin diesen Effekt signifikant abschwächte. In-vitro-Analysen belegten zudem eine Hemmung der Proliferation und Migration von VSMC durch Adiponektin [162, 163]. In einer klinischen Studie mit Typ-2-Diabetikern führte die Behandlung mit Pioglitazon nicht nur zu einem Anstieg der Adiponektinspiegel, sondern auch zu einer signifikanten Reduktion der PWV, unabhängig von der Blutzuckerkontrolle. Dies weist darauf hin, dass Adiponektin einen relevanten Beitrag zu den gefäßprotektiven Effekten von Pioglitazon leisten könnte [74].

5.4 Limitationen

Die gewählte heterotope Implantation klappentragender Aortenbioprothesen in einem Rattenmodell bietet vielfältige Vorteile, ist jedoch auch mit Einschränkungen behaftet. Die Ratte stellt nach der Maus das kleinste geeignete Versuchstier dar, in dem eine mikrochirurgische Implantation von Herzklappen technisch möglich ist. Neben ethischen Gesichtspunkten sprechen auch Aspekte wie eine schnellere Reproduzierbarkeit und ein geringerer Ressourceneinsatz für den Einsatz von Kleintieren. Dennoch unterscheiden sich physiologische, immunologische und metabolische Prozesse zwischen Kleintieren und dem Menschen teils erheblich, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse einschränkt. Zudem weicht die biomechanische Belastung im heterotopen Implantationsmodell von den hämodynamischen Bedingungen im menschlichen Kreislaufsystem ab.

Trotz der experimentell erzeugten Aortenklappeninsuffizienz mit konsekutivem diastolischem Rückfluss über die abdominale Aorta können die Druck- und Flussverhältnisse einer orthotopen Klappenposition beim Menschen nicht vollständig abgebildet werden. Darüber hinaus mussten aufgrund der limitierten Gewebemenge die histologischen und molekularbiologischen Analysen an unterschiedlichen Tieren durchgeführt werden. Eine direkte Korrelation einzelner Befunde war daher nicht möglich. Interindividuelle Unterschiede im Ausmaß des chirurgischen Traumas und der postoperativen inflammatorischen Reaktion, insbesondere in den ersten zehn Tagen, könnten die Ergebnisse ebenfalls beeinflusst haben. Ein weiterer Aspekt betrifft die Verabreichung von Pioglitazon über eine definierte Diät. Obwohl die dokumentierte Futteraufnahme sowie die Gewichtsentwicklung auf eine weitgehend gleichmäßige Wirkstoffexposition hinweisen, kann eine individuelle Variation in der aufgenommenen Tagesdosis nicht vollständig ausgeschlossen werden. Darüber hinaus führt die durch niedrige STZ-Dosen induzierte Schädigung pankreatischer β -Zellen zu einer partiellen und graduellen Dysfunktion, die zwar der Progression im menschlichen Typ-2-Diabetes ähnelt, jedoch als toxisch induziertes Ereignis den multifaktoriellen, langsam verlaufenden β -Zellverlust beim Menschen nur eingeschränkt widerspiegelt. Diese Limitationen unterstreichen die Notwendigkeit ergänzender Untersuchungen, insbesondere in präklinischen Modellen mit größerer physiologischer Nähe zum Menschen, um die klinische Relevanz der hier beobachteten Effekte differenzierter bewerten und das therapeutische Potenzial von Pioglitazon im Kontext bioprothetischer Herzklappen fundiert einordnen zu können.

5.5 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit untersuchte in einem etablierten Rattenmodell die Effekte des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon auf strukturelle und molekulare Umbauprozesse klappentragender, kryokonservierter Aortenbioprothesen unter diabetischen Bedingungen in vivo. Dabei konnten sowohl histologische als auch genexpressionsbasierte Veränderungen nachgewiesen werden, die auf eine beschleunigte Degeneration bioprothetischer Gefäß- und Klappenstrukturen im Kontext eines Typ-2-Diabetes hinweisen. Die diabetischen Bedingungen führten zu einer signifikanten Mediaproliferation und Kalzifikation der

Klappen. Darüber hinaus fanden sich Hinweise auf eine verstärkte Myofibroblastenaktivierung sowie eine vermehrte Kalzifikation in Intima und Media.

Die systemische Behandlung mit Pioglitazon konnte die Degeneration der klappentragenden Aortenbioprothesen trotz persistierender diabetischer Stoffwechsellaage aufhalten – durch Inhibition der chondro-osteogenen Transdifferenzierung sowie durch antiproliferative und antikalzifizierende Effekte auf die Media. Hinweise auf proinflammatorische Genexpressionsmuster wurden in diesem Modell nicht gefunden. Zukünftige Studien sollten darauf abzielen, die zugrunde liegenden Signalwege der Bioprothesendegeneration unter diabetischen Bedingungen mechanistisch aufzuklären und zusätzliche Zielstrukturen für gezielte pharmakologische Interventionen zu identifizieren, insbesondere im Hinblick auf PPAR γ -vermittelte Regulationsmechanismen. Darüber hinaus erscheinen vertiefte funktionelle Analysen in Kleintiermodellen sinnvoll, um die molekularen Effekte weiter zu validieren. Von besonderem Interesse könnten künftig auch rein diätbasierte Modelle sein, da sie die langsame Progression des Typ-2-Diabetes besser nachzeichnen und so eine Ergänzung zu chemisch induzierten Modellen darstellen. Darauf aufbauend könnte die Translation in Tiermodelle mit höherer klinischer Relevanz erfolgen, um auch hämodynamische und mechanische Aspekte bioprothetischer Haltbarkeit im Kontext metabolischer Grunderkrankungen zu untersuchen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen zum besseren Verständnis diabetesspezifischer Degenerationsmechanismen in Bioprothesen bei und unterstreichen das therapeutische Potenzial von Pioglitazon zur Verbesserung ihrer Langzeitfunktion bei Patienten mit Diabetes mellitus.

6 Literatur-und Quellenverzeichnis

1. Rats, I.C.o.S.G.N.f.M.a. Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat. 2024. Verfügbar unter: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>. Zugriff am: 25. Juni 2025.
2. Dos Santos, V.P., et al., Arteriosclerosis, atherosclerosis, arteriolosclerosis, and Monckeberg medial calcific sclerosis: what is the difference? *J Vasc Bras*, 2021. 20: p. e20200211.
3. Evrard, S., et al., Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta*, 2015. 438: p. 401-14.
4. Speer, M.Y. and C.M. Giachelli, Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol*, 2004. 13(2): p. 63-70.
5. Shao, J.-S., J. Cai, and D.A. Towler, Molecular Mechanisms of Vascular Calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2006. 26(7): p. 1423-1430.
6. Yang, L., et al., Treatment of endothelial cell dysfunction in atherosclerosis: a new perspective integrating traditional and modern approaches. *Frontiers in Physiology*, 2025. Volume 16 - 2025.
7. Myszko, M., et al., The Dual Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis and Coronary Artery Disease: Pathological Mechanisms and Diagnostic Potential. *Antioxidants*, 2025. 14(3): p. 275.
8. Giachelli, C.M., Vascular Calcification Mechanisms. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004. 15(12): p. 2959-2964.
9. Yuan, C., et al., Vascular calcification: New insights into endothelial cells. *Microvasc Res*, 2021. 134: p. 104105.
10. Micheletti, R.G., et al., Mönckeberg Sclerosis Revisited: A Clarification of the Histologic Definition of Mönckeberg Sclerosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2008. 132(1): p. 43-47.
11. Coffey, S., B. Cox, and M.J.A. Williams, The Prevalence, Incidence, Progression, and Risks of Aortic Valve Sclerosis. *JACC*, 2014. 63(25_Part_A): p. 2852-2861.
12. Chen, Q.F., et al., Global, Regional, and National Burden of Valvular Heart Disease, 1990 to 2021. *J Am Heart Assoc*, 2024. 13(24): p. e037991.
13. Strom, J.B., et al., Increasing risk of mortality across the spectrum of aortic stenosis is independent of comorbidity & treatment: An international, parallel cohort study of 248,464 patients. *PLoS One*, 2022. 17(7): p. e0268580.
14. Kapadia, S.R., et al., 5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement compared with standard treatment for patients with inoperable aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial. *Lancet*, 2015. 385(9986): p. 2485-91.
15. 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.
16. Cannegieter, S.C., et al., Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med*, 1995. 333(1): p. 11-7.

17. Rodriguez-Gabella, T., et al., Aortic Bioprosthetic Valve Durability: Incidence, Mechanisms, Predictors, and Management of Surgical and Transcatheter Valve Degeneration. *J Am Coll Cardiol*, 2017. 70(8): p. 1013-1028.
18. Kostyunin, A.E., et al., Degeneration of Bioprosthetic Heart Valves: Update 2020. *J Am Heart Assoc*, 2020. 9(19): p. e018506.
19. Gao, G., et al., Durability of pericardial versus porcine aortic valves. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 44(2): p. 384-8.
20. Généreux, P., et al., Valve Academic Research Consortium 3: Updated Endpoint Definitions for Aortic Valve Clinical Research. *JACC*, 2021. 77(21): p. 2717-2746.
21. Akins, C.W., et al., Guidelines for Reporting Mortality and Morbidity After Cardiac Valve Interventions. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2008. 85(4): p. 1490-1495.
22. Bourguignon, T., et al., Very long-term outcomes of the Carpentier-Edwards Perimount valve in aortic position. *Ann Thorac Surg*, 2015. 99(3): p. 831-7.
23. Johnston, D.R., et al., Long-Term Durability of Bioprosthetic Aortic Valves: Implications From 12,569 Implants. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2015. 99(4): p. 1239-1247.
24. Shi, W.Y., et al., Impact of reintervention after index aortic valve replacement on the risk of subsequent mortality. *JTCVS Open*, 2023. 16: p. 93-102.
25. Maganti, M., et al., Redo valvular surgery in elderly patients. *Ann Thorac Surg*, 2009. 87(2): p. 521-5.
26. Federation, I.D. IDF Diabetes Atlas. 2025. Verfügbar unter: <https://diabetesatlas.org>. Zugriff am: 18. Juni 2025.
27. Committee, A.D.A.P.P., 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care*, 2023. 47(Supplement_1): p. S20-S42.
28. DiMeglio, L.A., C. Evans-Molina, and R.A. Oram, Type 1 diabetes. *The Lancet*, 2018. 391(10138): p. 2449-2462.
29. Zajec, A., et al., Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Established Facts and New Insights. *Genes (Basel)*, 2022. 13(4).
30. Quinn, L.M., F.S. Wong, and P. Narendran, Environmental Determinants of Type 1 Diabetes: From Association to Proving Causality. *Frontiers in Immunology*, 2021. Volume 12 - 2021.
31. Dlodla, P.V., et al., Pancreatic β -cell dysfunction in type 2 diabetes: Implications of inflammation and oxidative stress. *World J Diabetes*, 2023. 14(3): p. 130-146.
32. Wang, Y., et al., High-fat diet promotes type 2 diabetes mellitus by disrupting gut microbial rhythms and short-chain fatty acid synthesis. *Food & Function*, 2024. 15(21): p. 10838-10852.
33. Imamura, F., et al., Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *Bmj*, 2015. 351: p. h3576.
34. Chandrasekaran, P. and R. Weiskirchen, The Role of Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus—An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024. 25(3): p. 1882.
35. Katz, R., et al., Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation*, 2006. 113(17): p. 2113-9.

36. Lorusso, R., et al., Type 2 diabetes mellitus is associated with faster degeneration of bioprosthetic valve: results from a propensity score-matched Italian multicenter study. *Circulation*, 2012. 125(4): p. 604-14.
37. Thanassoulis, G. and H. Aziz. Atherosklerose. 2022. Verfügbar unter: <https://www.msmanuals.com/de/profi/herz-kreislauf-krankheiten/arteriosklerose/atherosklerose>. Zugriff am: 18. Juni 2025.
38. Katz, R., et al., Relationship of metabolic syndrome with incident aortic valve calcium and aortic valve calcium progression: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes*, 2009. 58(4): p. 813-9.
39. Otto, C.M., et al., Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*, 1994. 90(2): p. 844-853.
40. Broeders, W., et al., Innate immune cells in the pathophysiology of calcific aortic valve disease: lessons to be learned from atherosclerotic cardiovascular disease? *Basic Research in Cardiology*, 2022. 117(1): p. 28.
41. Shetty, R., et al., Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *European Journal of Clinical Investigation*, 2009. 39(6): p. 471-480.
42. Meng, Z., et al., Sevelamer Attenuates Bioprosthetic Heart Valve Calcification. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2021. Volume 8 - 2021.
43. Mohler, E.R., III, Mechanisms of aortic valve calcification. *American Journal of Cardiology*, 2004. 94(11): p. 1396-1402.
44. Assmann, A.K., et al., A Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists in Counteracting the Degeneration of Cardiovascular Grafts. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2022. 79(1): p. e103-e115.
45. Goldin, A., et al., Advanced Glycation End Products. *Circulation*, 2006. 114(6): p. 597-605.
46. Bierhaus, A., et al., Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*, 2005. 83(11): p. 876-886.
47. Li, F., et al., Pioglitazone attenuates progression of aortic valve calcification via down-regulating receptor for advanced glycation end products. *Basic Res Cardiol*, 2012. 107(6): p. 306.
48. Frasca, A., et al., Glycation and Serum Albumin Infiltration Contribute to the Structural Degeneration of Bioprosthetic Heart Valves. *JACC Basic Transl Sci*, 2020. 5(8): p. 755-766.
49. Bre, L.P., R. McCarthy, and W. Wang, Prevention of bioprosthetic heart valve calcification: strategies and outcomes. *Curr Med Chem*, 2014. 21(22): p. 2553-64.
50. Lorusso, R., et al., Type 2 diabetes mellitus is associated with faster degeneration of bioprosthetic valve: results from a propensity score-matched Italian multicenter study. *Circulation*, 2012. 125(4): p. 604-14.
51. Yeghiazaryan, K., et al., Prediction of degeneration of native and bioprosthetic aortic valves: issue-related particularities of diabetes mellitus. *Infect Disord Drug Targets*, 2008. 8(2): p. 88-99.
52. Larsson, S.C., et al., Type 1 and type 2 diabetes mellitus and incidence of seven cardiovascular diseases. *Int J Cardiol*, 2018. 262: p. 66-70.

53. Rawshani, A., et al., Left-Sided Degenerative Valvular Heart Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Circulation*, 2022. 146(5): p. 398-411.
54. Orchard, T.J., et al., Insulin Resistance–Related Factors, but not Glycemia, Predict Coronary Artery Disease in Type 1 Diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications study. *Diabetes Care*, 2003. 26(5): p. 1374-1379.
55. Snell-Bergeon, J.K., et al., Inflammatory Markers Are Increased in Youth with Type 1 Diabetes: The SEARCH Case-Control Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010. 95(6): p. 2868-2876.
56. Brunvand, L., et al., Advanced glycation end products in children with type 1 diabetes and early reduced diastolic heart function. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2017. 17(1): p. 133.
57. Mansor, L.S., et al., Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovascular Diabetology*, 2013. 12(1).
58. Fang, J.Y., et al., In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity. *Nutrients*, 2019. 11(3).
59. Lang, P., et al., Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, 2019. 9(1): p. 19556.
60. Lenzen, S., The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 2008. 51(2): p. 216-26.
61. Wu, J. and L.J. Yan, Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2015. 8: p. 181-8.
62. Srinivasan, K., et al., Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*, 2005. 52(4): p. 313-20.
63. Skovsø, S., Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig*, 2014. 5(4): p. 349-58.
64. Gesellschaft, D.D. Leitlinien für das Management von kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit Diabetes. 2023. Verfügbar unter: https://leitlinien.dgk.org/files/29_2023_pocket-leitlinien_diabetes.pdf. Zugriff am: 20. Juni 2025.
65. Lehrke, M. and M.A. Lazar, The many faces of PPARgamma. *Cell*, 2005. 123(6): p. 993-9.
66. Pfützner, A., S.C. A., and T. and Forst, Pioglitazone: an antidiabetic drug with cardiovascular therapeutic effects. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2006. 4(4): p. 445-459.
67. 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.
68. Ouchi, N. and K. Walsh, Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta*, 2007. 380(1-2): p. 24-30.

69. 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.
70. Katahira, S., et al., Pioglitazone treatment mitigates cardiovascular bioprosthetic degeneration in a chronic kidney disease model. *Frontiers in Pharmacology*, 2024. Volume 15 - 2024.
71. Mazzone, T., et al., Effect of Pioglitazone Compared With Glimepiride on Carotid Intima-Media Thickness in Type 2 DiabetesA Randomized Trial. *JAMA*, 2006. 296(21): p. 2572-2581.
72. Igarashi, M., et al., Characterization of an inhibitory effect of pioglitazone on balloon-injured vascular smooth muscle cell growth. *Metabolism*, 2001. 50(8): p. 955-962.
73. Wang, K., et al., Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Down-Regulates Receptor for Advanced Glycation End Products and Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation in a Diabetic and Nondiabetic Rat Carotid Artery Injury Model. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006. 317(1): p. 37-43.
74. Satoh, N., et al., Antiatherogenic Effect of Pioglitazone in Type 2 Diabetic Patients Irrespective of the Responsiveness to Its Antidiabetic Effect. *Diabetes Care*, 2003. 26(9): p. 2493-2499.
75. 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.
76. Assmann, A.K., et al., Impact of PPAR-gamma activation on the durability of biological heart valve prostheses in hypercholesterolaemic rats. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2023. 63(1).
77. 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.
78. Katahira, S., et al., PPAR-Gamma Activation May Inhibit the In Vivo Degeneration of Bioprosthetic Aortic and Aortic Valve Grafts under Diabetic Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. 22(20): p. 11081.
79. Assmann, A., et al., The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model. *Biomaterials*, 2014. 35(26): p. 7416-28.
80. 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.
81. Cherng, S., J. Young, and H. Ma, Alpha-smooth muscle actin (α -SMA). *J Am Sci*, 2008. 4.
82. Kubista, M., B. Akerman, and B. Nordén, Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*, 1987. 26(14): p. 4545-53.
83. Preibisch, S., S. Saalfeld, and P. Tomancak, Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*, 2009. 25(11): p. 1463-1465.
84. Assmann, A., et al., Simvastatin does not diminish the in vivo degeneration of decellularized aortic conduits. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014. 64(4): p. 332-42.
85. Bustin, S.A., et al., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 2009. 55(4): p. 611-22.

86. Schroeder, A., et al., The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 2006. 7(1): p. 3.
87. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
88. Lupinetti, F.M., et al., Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1993. 106(5): p. 912-7.
89. Wells, W., et al., Depopulated vena caval homograft: a new venous conduit. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2003. 126(2): p. 498-503.
90. Rajamannan, N.M., et al., Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*, 2003. 107(17): p. 2181-4.
91. Kawano, K., et al., Spontaneous Long-Term Hyperglycemic Rat With Diabetic Complications: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Strain. *Diabetes*, 1992. 41(11): p. 1422-1428.
92. Zucker, L.M. and H.N. Antoniades, Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology*, 1972. 90(5): p. 1320-30.
93. Phillips, M.S., et al., Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Genetics*, 1996. 13(1): p. 18-19.
94. Leonard, B.L., et al., Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol*, 2005. 42(4): p. 162-70.
95. Kleinert, M., et al., Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 2018. 14(3): p. 140-162.
96. Srinivasan, K. and P. Ramarao, Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res*, 2007. 125(3): p. 451-72.
97. Kuwabara, W.M.T., et al., Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus? *PLOS ONE*, 2017. 12(12): p. e0189622.
98. Astrup, A. and N. Finan, Redefining Type 2 diabetes: 'Diabesity' or 'Obesity Dependent Diabetes Mellitus'? *Obesity Reviews*, 2000. 1(2): p. 57-59.
99. Brunzell, J.D., Hypertriglyceridemia. *New England Journal of Medicine*, 2007. 357(10): p. 1009-1017.
100. Mittelman, S.D., et al., Extreme Insulin Resistance of the Central Adipose Depot In Vivo. *Diabetes*, 2002. 51(3): p. 755-761.
101. Radu, F., et al., The Link between NAFLD and Metabolic Syndrome. *Diagnostics (Basel)*, 2023. 13(4).
102. Barale, C. and I. Russo, Influence of Cardiometabolic Risk Factors on Platelet Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(2): p. 623.
103. Betteridge, D.J., R.A. DeFronzo, and R.J. Chilton, PROactive: time for a critical appraisal. *European Heart Journal*, 2008. 29(8): p. 969-983.
104. Nicholls, S.J., et al., Lowering the Triglyceride/High-Density Lipoprotein Cholesterol Ratio Is Associated With the Beneficial Impact of Pioglitazone on Progression of Coronary Atherosclerosis in Diabetic Patients: Insights From the PERISCOPE (Pioglitazone Effect on Regression of Intravascular Sonographic Coronary Obstruction Prospective Evaluation) Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011. 57(2): p. 153-159.

105. Ordu, S., The Impact of Pioglitazone Therapy on Glycemic control, Blood Pressure and Inflammatory markers in Patients With Diabetes Mellitus. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*, 2010. 6(1): p. 73-82.
106. Al Majali, K., et al., The effect of sensitisation to insulin with pioglitazone on fasting and postprandial lipid metabolism, lipoprotein modification by lipases, and lipid transfer activities in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 2006. 49(3): p. 527-37.
107. Nagashima, K., et al., Effects of the PPAR γ agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005. 115(5): p. 1323-1332.
108. Jonker, J.T., et al., Pioglitazone Decreases Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Mass, Associated With a Decrease in Hepatic Triglyceride Content, in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 2010. 33(7): p. 1625-1628.
109. Nagashima, K., et al., Effects of the PPAR γ agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 2005. 115(5): p. 1323-32.
110. Khan, A.W. and K.A.M. Jandeleit-Dahm, Atherosclerosis in diabetes mellitus: novel mechanisms and mechanism-based therapeutic approaches. *Nat Rev Cardiol*, 2025.
111. Evrard, S.M., et al., Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 11853.
112. Herring, B.P., et al., Previously differentiated medial vascular smooth muscle cells contribute to neointima formation following vascular injury. *Vasc Cell*, 2014. 6: p. 21.
113. Chen, P.Y., et al., Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J Clin Invest*, 2015. 125(12): p. 4514-28.
114. Muylaert, D.E.P., et al., Environmental Influences on Endothelial to Mesenchymal Transition in Developing Implanted Cardiovascular Tissue-Engineered Grafts. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2016. 22(1): p. 58-67.
115. Dowd, M.B., K. Hemmrich, and W.A. Morrison, L-arginine reduces neointimal hyperplasia in cold-stored arterial allografts in a rabbit low-flow-through model. *J Reconstr Microsurg*, 2007. 23(6): p. 301-9.
116. Xu, Y. and J.C. Kovacic, Endothelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. *Annu Rev Physiol*, 2023. 85: p. 245-267.
117. Krenning, G., et al., Vascular smooth muscle cells for use in vascular tissue engineering obtained by endothelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EnMT) on collagen matrices. *Biomaterials*, 2008. 29(27): p. 3703-3711.
118. Cooley, B.C., et al., TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci Transl Med*, 2014. 6(227): p. 227ra34.
119. Roh, J.D., et al., Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107(10): p. 4669-4674.
120. Tsai, T.H., et al., Liraglutide Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transition and Attenuates Neointima Formation after Endovascular Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Cells*, 2019. 8(6).
121. Salzberg, S.P., et al., Increased Neointimal Formation After Surgical Vein Grafting in a Murine Model of Type 2 Diabetes. *Circulation*, 2006. 114(1_supplement): p. I-302-I-307.

122. Ping, S., et al., Protein disulfide isomerase-mediated apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stress and advanced glycosylation end products result in diabetic mouse vein graft atherosclerosis. *Cell Death Dis*, 2017. 8(5): p. e2818.
123. Wan, J., et al., Pioglitazone modulates the proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells via peroxisome proliferators-activated receptor-gamma. *Diabetol Metab Syndr*, 2014. 6(1): p. 101.
124. Law, R.E., et al., Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 2000. 101(11): p. 1311-8.
125. Chen, N.X., et al., High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. 21(12): p. 3435-42.
126. Yahagi, K., et al., Pathology of Human Coronary and Carotid Artery Atherosclerosis and Vascular Calcification in Diabetes Mellitus. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2017. 37(2): p. 191-204.
127. London, G.M., et al., Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. 18(9): p. 1731-40.
128. Zwakenberg, S.R., et al., Intimal and medial calcification in relation to cardiovascular risk factors. *PLOS ONE*, 2020. 15(7): p. e0235228.
129. Sakata, N., et al., Calcification of the Medial Layer of the Internal Thoracic Artery in Diabetic Patients: Relevance of Glycooxidation. *Journal of Vascular Research*, 2004. 40(6): p. 567-574.
130. Lehto, S., et al., Medial Artery Calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1996. 16(8): p. 978-983.
131. Castagna, M.T., et al., Incidence, location, magnitude, and clinical correlates of saphenous vein graft calcification: an intravascular ultrasound and angiographic study. *Circulation*, 2005. 111(9): p. 1148-52.
132. Gómez-Marcos, M.A., et al., Grosor íntima-media carotídeo en diabéticos e hipertensos. *Revista Española de Cardiología*, 2011. 64(7): p. 622-625.
133. Temelkova-Kurktschiev, T.S., et al., Increased intimal-medial thickness in newly detected type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care*, 1999. 22(2): p. 333-8.
134. Wagenknecht, L.E., et al., Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and carotid wall thickness: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care*, 1998. 21(11): p. 1812-8.
135. Onursal, C., et al., Pioglitazone inhibits oxidative stress, MMP-mediated inflammation and vascular dysfunction in high glucose-induced human saphenous vein grafts. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2023. 37(4): p. 108421.
136. Koshiyama, H., et al., RAPID COMMUNICATION: Inhibitory Effect of Pioglitazone on Carotid Arterial Wall Thickness in Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001. 86(7): p. 3452-3452.
137. Gaillard, V., et al., Pioglitazone Improves Aortic Wall Elasticity in a Rat Model of Elastocalcinotic Arteriosclerosis. *Hypertension*, 2005. 46(2): p. 372-379.
138. 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.

139. Nollert, G., et al., Risk factors for atherosclerosis and the degeneration of pericardial valves after aortic valve replacement. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2003. 126(4): p. 965-968.
140. Le Quang, K., et al., Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. 34(10): p. 2283-91.
141. Mosch, J., et al., Histopathological assessment of calcification and inflammation of calcific aortic valves from patients with and without diabetes mellitus. *Histol Histopathol*, 2017. 32(3): p. 293-306.
142. Briand, M., et al., Metabolic Syndrome Is Associated With Faster Degeneration of Bioprosthetic Valves. *Circulation*, 2006. 114(1_supplement): p. I-512-I-517.
143. Chu, Y., et al., Pioglitazone attenuates valvular calcification induced by hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. 33(3): p. 523-32.
144. Towler, D.A., Molecular and Cellular Aspects of Calcific Aortic Valve Disease. *Circulation Research*, 2013. 113(2): p. 198-208.
145. Rajamannan, N.M., et al., Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*, 2011. 124(16): p. 1783-91.
146. Skowasch, D., et al., Is the degeneration of aortic valve bioprostheses similar to that of native aortic valves? Insights into valvular pathology. *Expert Rev Med Devices*, 2006. 3(4): p. 453-62.
147. Abedin, M., Y. Tintut, and L.L. Demer, Vascular Calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004. 24(7): p. 1161-1170.
148. Demer, L.L. and Y. Tintut, Vascular Calcification. *Circulation*, 2008. 117(22): p. 2938-2948.
149. Mohler, E.R., 3rd, et al., Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*, 2001. 103(11): p. 1522-8.
150. Mohler III, E.R., et al., Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1997. 17(3): p. 547-552.
151. O'Brien, K.D., et al., Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation*, 1995. 92(8): p. 2163-2168.
152. Srivatsa, S., et al., Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *The Journal of clinical investigation*, 1997. 99(5): p. 996-1009.
153. Gericke, A., et al., Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int*, 2005. 77(1): p. 45-54.
154. Shen, M., et al., Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans. *C R Acad Sci III*, 1997. 320(1): p. 49-57.
155. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 2004. 22(4): p. 233-41.
156. Gomez-Stallons, M.V., et al., Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Required for Aortic Valve Calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2016. 36(7): p. 1398-1405.

157. Giachelli, C.M., et al., Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1993. 92(4): p. 1686-96.
158. Zhou, Y.-B., et al., Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Ligands Retard Cultured Vascular Smooth Muscle Cells Calcification Induced by High Glucose. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2013. 66(3): p. 421-429.
159. Bessueille, L. and D. Magne, Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol Life Sci*, 2015. 72(13): p. 2475-89.
160. Kay, A.M., C.L. Simpson, and J.A. Stewart, Jr., The Role of AGE/RAGE Signaling in Diabetes-Mediated Vascular Calcification. *J Diabetes Res*, 2016. 2016: p. 6809703.
161. Yasunari, E., et al., Efficacy of pioglitazone on glycemic control and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes patients with inadequate insulin therapy. *J Diabetes Investig*, 2011. 2(1): p. 56-62.
162. Kubota, N., et al., Disruption of Adiponectin Causes Insulin Resistance and Neointimal Formation *. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(29): p. 25863-25866.
163. 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.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an all jene richten, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet und auf unterschiedliche Weise unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg für die Möglichkeit, meine Dissertation an seiner Klinik durchzuführen und die selbstständige wissenschaftliche Arbeit erlernen zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Payam Akhyari, meinem Doktorvater und damaligen Leiter der Experimentellen Chirurgie. Ich danke ihm nicht nur für die Bereitstellung des Promotionsprojekts, sondern auch für seine Supervision und Motivation während des gesamten Promotionsprozesses, die mir stets ein Vorbild bleiben werden.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Shintaro Katahira, danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz, ohne den dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Besonders danke ich ihm für die Durchführung der Operationen, die einen wesentlichen Bestandteil dieser Arbeit darstellten.

Ein Dank von Herzen geht an Dr. rer. nat. Mareike Barth, die mich nicht nur durch ihre herausragende wissenschaftliche Expertise beeindruckte, sondern auch menschlich ein großes Vorbild für mich darstellt. Vielen Dank für dein beständiges Engagement, deine außergewöhnliche Empathie und dafür, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest. Ich danke dem gesamten Team der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie für die lehrreiche und zugleich persönlich wertvolle Zeit im Labor. Ein besonderer Dank gilt allen, die durch ihre Unterstützung bei der Einarbeitung und mit ihren hilfreichen Händen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Namentlich möchte ich an dieser Stelle Dr. rer. nat. Jessica Selig, Dr. rer. nat. Vera Schmidt, Dr. med. Yuki Haru Sugimura und Gisela Müller für ihre wertvolle Unterstützung und Zusammenarbeit hervorheben.

Zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie, deren bedingungslose Unterstützung, Geduld und Ermutigung mich durch alle Phasen dieser Dissertation getragen haben. Ohne euren unerschütterlichen Zuspruch und euer Vertrauen wäre ich heute nicht an dem Punkt, an dem ich stehe. Die Unterstützung, die mir zuteilwurde, werde ich nie vergessen und als wertvolle Erinnerung auf meinem weiteren Weg mit mir tragen.