

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und  
der Klinik für Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

**Die isoliert perfundierte Rattenaorta:  
Etablierung eines *ex vivo*-Modells zur  
Untersuchung der medialen vaskulären  
Kalzifizierung**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Nathalie Siegel, geb. Hohl**  
Tierärztin  
aus Freiburg im Breisgau

**Berlin 2016**  
Journal-Nr.: 3842



Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

---

<b>Dekan</b>	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
<b>Erster Gutachter</b>	Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh
<b>Zweiter Gutachter</b>	Prof. Dr. Markus van der Giet
<b>Dritter Gutachter</b>	Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

---

**Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):**

rats, aorta, atherosclerosis, calcification, development studies, in vitro, perfusion

**Tag der Promotion:** 08.07.2016



*für Dominik*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die mediale vaskuläre Kalzifizierung . . . . .	4
1.1.1 Prävalenz und Relevanz . . . . .	4
1.1.2 Klinische Auswirkungen . . . . .	6
1.1.3 Pathogenese . . . . .	8
1.2 Modelle für mediale vaskuläre Kalzifizierung . . . . .	12
1.2.1 <i>In vitro</i> - und <i>ex vivo</i> -Modelle . . . . .	12
1.2.2 <i>In vivo</i> -Modelle . . . . .	12
<b>2 Zielstellung</b>	<b>15</b>
<b>3 Material</b>	<b>17</b>
3.1 Geräte . . . . .	17
3.2 Verbrauchsmaterialien . . . . .	18
3.3 Tierhaltung . . . . .	18
3.4 Chemikalien . . . . .	19
3.5 Software und Datenbanken . . . . .	20
<b>4 Methoden</b>	<b>21</b>
4.1 Tiere und Tierhaltung . . . . .	21
4.2 Rattenaorten . . . . .	21
4.3 Perfusionskammer . . . . .	22
4.4 Nährmedien . . . . .	22
4.4.1 Äußeres Nährmedium . . . . .	22
4.4.2 Perfusionsmedien . . . . .	23
4.5 Versuchsaufbau . . . . .	23
4.6 Versuchsablauf . . . . .	24
4.7 Versuchsende . . . . .	24

---

4.8	Analysemethoden . . . . .	25
4.8.1	Quantitative Kalzium-Bestimmung . . . . .	25
4.8.2	Histologie . . . . .	25
4.9	Statistik . . . . .	27
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
5.1	Methodenetablierung . . . . .	29
5.1.1	Verwendete Tiere . . . . .	29
5.1.2	Narkose . . . . .	29
5.1.3	Aortenentnahme . . . . .	30
5.1.4	Entfernung von anhaftendem Gewebe . . . . .	31
5.1.5	Erstellen einer Schemazeichnung . . . . .	33
5.1.6	Koagulation der Aortenabgänge . . . . .	34
5.1.7	Perfusionskammer . . . . .	34
5.1.8	Nährmedien . . . . .	36
5.1.9	Versuchsaufbau . . . . .	36
5.1.10	Versuchsablauf und Medienwechsel . . . . .	39
5.1.11	Versuchsende . . . . .	41
5.2	Durchgeführte Versuche . . . . .	43
5.2.1	Abgebrochene Versuche . . . . .	43
5.2.2	Beendete Kontrollkammern . . . . .	43
5.2.3	Beendete Kalzifizierungskammern . . . . .	45
5.2.4	Kontrollstücke . . . . .	45
5.3	Versuchsergebnisse . . . . .	46
5.3.1	Ergebnisse der Kontrollstücke . . . . .	46
5.3.2	Ergebnisse der fehlerhaften Kammern . . . . .	48
5.3.3	HE-Färbung der IPAs . . . . .	50
5.3.4	Ergebnisse der Kontrollkammern . . . . .	50
5.3.5	Ergebnisse der Kalzifizierungskammern . . . . .	54
5.3.6	Vergleich von Kontroll- und Kalzifizierungskammern . . . . .	57
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
6.1	Methodenetablierung . . . . .	63
6.2	Ergebnisse . . . . .	67
6.3	Limitierungen dieser Arbeit . . . . .	71
6.4	Ausblick . . . . .	72

---

<b>7 Schlussfolgerungen</b>	<b>75</b>
<b>8 Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>9 Summary</b>	<b>79</b>
<b>10 Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>Anhang</b>	<b>I</b>
<b>Publikationen</b>	<b>V</b>
<b>Danksagung</b>	<b>VII</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>IX</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau einer Gefäßwand (gesund und verändert) . . . . .	3
1.2	Pathogenese der medialen vaskulären Kalzifizierung . . . . .	9
5.1	Aorta <i>in situ</i> . . . . .	30
5.2	Gefäßpräparation . . . . .	32
5.3	Schemazeichnung der Aorta zum Einsetzen . . . . .	33
5.4	Schematische Abbildung der Perfusionskammer . . . . .	35
5.5	Versuchsaufbau . . . . .	38
5.6	Methoden zum Medienwechsel . . . . .	40
5.7	Versuchsende . . . . .	42
5.8	Schemazeichnung der Aorta zur Aufarbeitung . . . . .	42
5.9	Korrodierte Kammern . . . . .	44
5.10	Histologischer Kalziumnachweis in den Kontrollstücken . . . . .	47
5.11	Histologischer Kalziumnachweis in fehlerhaften Aorten . . . . .	49
5.12	HE-Färbung der IPAs . . . . .	50
5.13	Histologischer Kalziumnachweis in IPA <sub>Kont</sub> . . . . .	52
5.14	Histologischer Kalziumnachweis in IPA <sub>Kalz</sub> . . . . .	55
5.15	Vergleich des Kalziumgehaltes von IPA <sub>Kont</sub> und IPA <sub>Kalz</sub> . . . . .	58
5.16	Vergleich der Ergebnisse von IPA <sub>Kont</sub> und IPA <sub>Kalz</sub> . . . . .	58



# Tabellenverzeichnis

4.1	Zusammensetzung des äußeren Nährmediums (Tyrode) . . . . .	23
4.2	Zusammensetzung der Perfusionsmedien . . . . .	23
4.3	Entparaffinisierung von histologischen Schnitten . . . . .	26
4.4	HE-Färbung . . . . .	26
4.5	Alizarin-Rot-Färbung . . . . .	26
4.6	von Kossa-Färbung . . . . .	27
5.1	Kalziumgehalt der Kontrollstücke . . . . .	47
5.2	Kalziumgehalt der Aorten aus korrodierten Kammern . . . . .	48
5.3	Kalziumgehalt der nicht perfundierten Aorten . . . . .	49
5.4	Kalziumgehalt der IPA <sub>Kont</sub> . . . . .	53
5.5	Kalziumgehalt der IPA <sub>Kalz</sub> . . . . .	56
5.6	Vergleich der histologischen Ergebnisse von IPA <sub>Kont</sub> und IPA <sub>Kalz</sub> .	57
10.1	Gestartete Perfusionskammern . . . . .	I
10.2	Abgebrochene Perfusionskammern . . . . .	I
10.3	Kontrollstücke . . . . .	II
10.4	Beendete Kontrollkammern . . . . .	II
10.5	Beendete Kalzifizierungskammern . . . . .	III



# Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arteria
<b>Aa.</b>	Arteriae
<b>ALP</b>	alkalische Phosphatase
<b>BMP-2</b>	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
<b>BMPs</b>	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
<b>Cbfa1</b>	<i>Core-binding factor 1</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<b>FCS</b>	<i>Fetal calf serum</i>
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>IPA</b>	Isoliert perfundierte Aorta
<b>K</b>	Kontrollstücke
<b>MGP</b>	Matrix Gla Protein
<b>MLM</b>	<i>Magnetic levitation method</i>
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PPi</b>	Pyrophosphat
<b>RANK</b>	<i>Receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
<b>RANKL</b>	<i>Receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B ligand</i>
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies, engl. <i>Reactive oxygen species</i>
<b>Runx2</b>	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwertes, engl. <i>Standard error of mean</i>
<b>SM</b>	<i>Smooth muscle</i>
<b>SVM</b>	Kleingefäßmyograph, engl. <i>Small vessel myograph</i>
<b>Up<sub>4</sub>A</b>	Uridin-Adenosin-Tetraphosphat
<b>V.</b>	Vena
<b>VSMCs</b>	glatte Gefäßmuskelzellen, engl. <i>Vascular smooth muscle cells</i>



# 1 Einleitung

Strukturelle Gefäßveränderungen sind ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation stellen diese die weltweit häufigste Todesursache dar: 2008 starben geschätzt etwa 17,3 Millionen Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, was circa 30 % aller Todesfälle ausmachte.<sup>[1]</sup> Betrachtet man die Situation in Deutschland, ergibt sich ein ähnliches Bild: Laut statistischem Bundesamt waren 2011 über 40 % aller Todesfälle in Deutschland auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen, womit diese auch hierzulande die häufigste Todesursache darstellen.<sup>[2]</sup>

Vaskuläre Kalzifizierung trägt immens zur Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei.<sup>[3]</sup> Auch wenn diese Problematik in den letzten Jahrzehnten deutlich an Bedeutung gewonnen hat, liegen die ersten dokumentierten Fälle von Gefäßverkalkung weit zurück. So beschrieb beispielsweise bereits 1852 Czermak in einem Autopsie-Bericht einer ägyptischen Mumie „mehrere nicht unbeträchtliche, kalkige Ablagerungen“<sup>[4]</sup> im Aortenbogen. Gefäßverkalkung ist also nicht ausschließlich ein Problem unserer modernen Gesellschaft, auch wenn aktuelle Problematiken wie ungesunde, fettreiche Ernährung, Rauchen, Alkoholkonsum und daraus resultierende Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder arterielle Hypertonie maßgeblich zum vermehrten Auftreten von Gefäßerkrankungen beitragen.

Arterielle Verkalkung wird heute anhand der Lokalisation der Kalkablagerungen in Arteriosklerose (Tunica media) und Atherosklerose (Tunica intima) unterteilt. Eine erstmalige Erwähnung fand diese Unterteilung bereits 1903 in einem Artikel von Mönckeberg. Er beschrieb ausführlich die Ablagerung von Kalk in der Media peripherer Gefäße als eigenständigen, von anderen Arten der Gefäßverkalkung unabhängigen Prozess.<sup>[5]</sup> In Anlehnung an diesen Artikel wird die Media-Verkalkung bis heute auch Mönckeberg-Sklerose genannt. Der Begriff *Arteriosklerose* wurde erstmals 1829 von Lobstein<sup>[6]</sup> verwendet, *Atherosklerose* wurde 1904 von Marchand<sup>[7]</sup> eingeführt. Allerdings entspricht die damalige Verwendung der Begriffe nicht den heute gängigen Definitionen. Diese und weitere mit strukturellen Gefäßveränderungen assoziierte Begriffe wie *Atherom* oder *noduläre Arteriosklerose* wurden die folgenden Jahrzehnte sehr unspezifisch und teilweise widersprüchlich verwendet. Einen guten Überblick gibt ein Review aus dem Jahre 1963, in dem Pickering die zu diesem Zeitpunkt gängigen Definitionen und Verwendungen der Begriffe zusammenfasst.<sup>[8]</sup> Darüber hinaus betont er, wie wichtig die Differen-

zierung der unterschiedlichen Erkrankungs-Komplexe und ihre exakte Beschreibung und Benennung sind. Er schlägt eine Unterteilung der nicht-entzündlichen Gefäßerkrankungen in primär die Media betreffende und primär die Intima betreffende Veränderungen vor. Diese Einteilung entspricht dem heutigen Verständnis für strukturelle Gefäßveränderungen, weisen Arteriosklerose und Atherosklerose bezüglich ihrer Pathogenese doch relevante Unterschiede auf. Leider hat sich diese klare Trennung immernoch nicht überall durchgesetzt, wie aus der teilweise unpräzisen Verwendung der Begriffe *Arteriosklerose* und *Atherosklerose* in der Literatur deutlich wird.

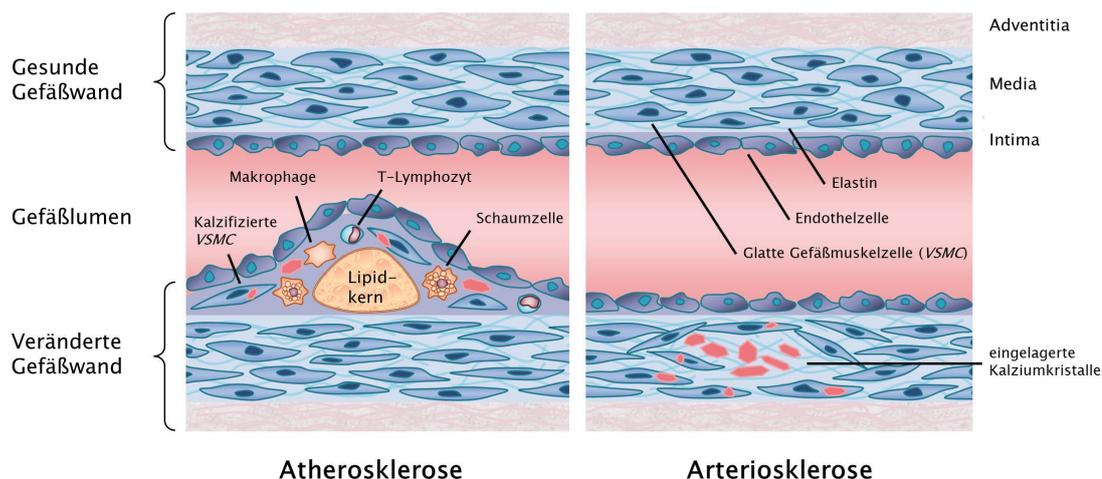
Wer sich mit strukturellen Gefäßveränderungen beschäftigt, sollte jedoch klar zwischen Arteriosklerose und Atherosklerose unterscheiden. Neben Differenzen unter anderem hinsichtlich Ursachen und Pathogenese unterscheiden sich die beiden Erkrankungen auch bezüglich der Lokalisation der Kalkablagerungen in der Gefäßwand. Um die Unterschiede zu verstehen, sind Kenntnisse des physiologischen Gefäßaufbaus Voraussetzung:

Die exakte Zusammensetzung der einzelnen Wandschichten unterscheidet sich je nach Gefäßart, die Grundstruktur ist aber bei allen Gefäßen dieselbe. Von Innen nach Außen setzt sich ein Gefäß aus folgenden Schichten zusammen (siehe Abbildung 1.1):

1. *Tunica intima* (Intima)
2. *Tunica media* (Media)
3. *Tunica adventitia* (Adventitia)

Die Intima bildet die Grenze zum Gefäßlumen. Sie besteht aus dem Endothel, bei welchem es sich um ein einschichtiges Plattenepithel handelt, und der *Lamina propria intima*, einer feinen Bindegewebsschicht.<sup>[9]</sup>

Die darauf folgende Media setzt sich aus glatten Gefäßmuskelzellen, engl. *Vascular smooth muscle cells* (VSMCs) und Bindegewebe zusammen. Ihre genaue Zusammensetzung hängt von der Gefäßart ab. Bei Arterien vom elastischen Typ (Aorta, abzweigende große Arterien, Lungenarterien) besteht die Media zu großen Teilen aus elastischen Fasern, welche in fenestrierten, lamellären Membranen angeordnet sind. Darin eingebettet liegen VSMCs, welche die Spannung des Gefäßes regulieren. Die Abgrenzung gegenüber den umgebenden Schichten ist nur undeutlich. Die Media von Arterien vom muskulären Typ (mittlere und kleinere Arterien) besteht hauptsächlich aus VSMCs, welche nur von wenig Bindegewebe umgeben



**Abbildung 1.1: Aufbau einer Gefäßwand (gesund und verändert).**

*Oben:* gesunde Gefäßwand mit Intima, Media und Adventitia. *Unten links:* atherosklerotisch veränderte Gefäßwand mit Lipidkern und Entzündungszellinfiltraten in der Intima (Atherom). *Unten rechts:* arteriosklerotisch veränderte Gefäßwand mit Kalziumeinlagerungen in der Media, sowohl extra- als auch intrazellulär.

sind. Zur Intima hin ist die Media durch die *Membrana elastica interna* abgegrenzt, zur Adventitia hin durch die *Membrana elastica externa*.<sup>[9]</sup>

Die außen gelegene Adventitia besteht aus Kollagenfasern und elastischen Fasern. Sie stellt die Verbindung zum umgebenden Bindegewebe her. Bei größeren Gefäßen befinden sich in ihr vegetative Nervenfasern und *Vasa vasorum* zur Versorgung der Gefäßwand.<sup>[9]</sup>

Bei der Atherosklerose sind die pathologischen Prozesse in der Intima lokalisiert (siehe Abbildung 1.1, links). Es handelt sich um einen chronisch inflammatorischen Prozess, bei dem es zur progressiven Einlagerung von Lipiden, Entzündungszellen und VSMCs in die innerste Schicht der Gefäßwand kommt. Diese Atherome können, müssen aber nicht kalzifizieren. Bei der Arteriosklerose dagegen steht der Kalzifizierungsprozess im Vordergrund. Dabei kommt es zur Ablagerung von Kalziumkristallen in der Media von Arterien (siehe Abbildung 1.1, rechts).

## 1.1 Die mediale vaskuläre Kalzifizierung

Bei der medialen vaskulären Kalzifizierung kommt es zur sowohl extra- als auch intrazellulären Ablagerung von Kalziumkristallen.<sup>[3]</sup> Extrazelluläre Ablagerungen sind in der extrazellulären Matrix lokalisiert, häufig assoziiert mit fragmentierten elastischen Fasern.<sup>[3]</sup> Intrazelluläre Ablagerungen befinden sich in den VSMCs der *Tunica media*. Bei den Ablagerungen handelt es sich um ein variables Gemisch unterschiedlicher Kristalle. Den Hauptbestandteil bilden Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ) und das Magnesium-haltige Whitlockit ( $(\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ ).<sup>[3,10,11]</sup>

Von Arteriosklerose betroffen sind Arterien unterschiedlicher Größe und Lokalisation.<sup>[12]</sup> Die Verkalkungen treten sowohl in großen Arterien vom elastischen Typ (insbesondere der *Aorta descendens*) auf,<sup>[3]</sup> als auch in mittelgroßen und kleinen muskulären Arterien. Hierzu zählen unter anderem die mittelgroßen viszerale Arterien und die Nierenarterien,<sup>[3,13]</sup> kleinere Arterien wie beispielsweise Koronar-, Temporal-, Uterin-, Ovariar-, und Parathyreoidalarterien mit einem Durchmesser von mindestens 0.5 mm<sup>[14–16]</sup> und die Arterien der Extremitäten.<sup>[13]</sup>

Dass die Media bei Arteriosklerose betroffen ist, steht außer Frage. Allerdings gibt es widersprüchliche Ansichten bezüglich einer möglichen Beteiligung der *Tunica elastica interna*. Micheletti et al. untersuchten humane, als arteriosklerotisch diagnostizierte Gefäßproben hinsichtlich einer Kalzifizierung dieser Schicht. Es zeigte sich, dass bei allen untersuchten Proben auch die *Tunica elastica interna* von der Kalzifizierung betroffen war.<sup>[13]</sup>

### 1.1.1 Prävalenz und Relevanz

Vaskuläre Kalzifizierung ist ein unabhängiger Marker für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko,<sup>[17–19]</sup> sowohl in Bezug auf die Morbidität als auch auf die Mortalität.<sup>[19,20]</sup> Ursächlich hierfür ist die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen als Folgeerkrankung der Gefäßverkalkung, unabhängig von der zu Grunde liegenden Diagnose. Die mediale Kalzifizierung ist ein Krankheitsbild ohne einheitliche Ätiologie. Verschiedene pathologische Ursachen führen über verschiedene Wege letztendlich zu denselben Veränderungen. Die Kalzifizierung kann sich zwar im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses entwickeln, ist innerhalb einer gesunden Population aber eher selten zu finden.<sup>[21]</sup> Dagegen tritt sie gehäuft in Assoziation mit verschiedenen Erkrankungen auf. Von besonderer Relevanz ist sie bei chronischen Nierenerkrankungen<sup>[19,22]</sup> und bei Typ-2-Diabetes.<sup>[17,18]</sup> So lag in einer

Untersuchung von Niksanen *et al.* die Prävalenz für Arteriosklerose bei neu diagnostizierten Diabetikern bei 17 %.<sup>[17]</sup> Im Krankheitsverlauf steigt die Prävalenz weiter an, wie eine Studie von Lehto *et al.* mit bereits in Therapie befindlichen Diabetikern zeigte. Hier wurde bei 41,5 % aller Patienten eine mediale Verkalkung nachgewiesen.<sup>[18]</sup> Weitere, jedoch seltener mit medialer Kalzifizierung assoziierte Erkrankungen sind unter anderem Hyperparathyreoidismus, Störungen des Vitamin D-Haushaltes, Vitamin K-Insuffizienz und Osteoporose.<sup>[3]</sup> Außerdem treten Arteriosklerose und Atherosklerose häufig parallel auf.<sup>[3]</sup>

Eine besondere Rolle wird der Arteriosklerose bei chronischen Nierenerkrankungen zuteil, da sie hier mit deutlich erhöhter Prävalenz auftritt<sup>[21]</sup> und mit einer hohen Mortalität assoziiert ist.<sup>[20,23,24]</sup> Schon in frühen Stadien chronischer Nierenerkrankungen ist die Prävalenz für vaskuläre Kalzifizierung deutlich erhöht.<sup>[25,26]</sup> Sigrist *et al.* konnten zeigen, dass bei 50 % der Patienten die mediale Kalzifizierung bereits einsetzt, bevor der Patient dialysepflichtig wird. Schon eine nur geringfügig verminderte Nierenfunktion führt zu einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität.<sup>[14,27,28]</sup> Im weiteren Krankheitsverlauf gewinnt diese Problematik zunehmend an Bedeutung. Eine Schlüsselposition als statistischer Marker nimmt dabei der Eintritt in die Dialyse ein. Die Prävalenz für vaskuläre Kalzifizierung steigt bei dialysepflichtigen Patienten drastisch an, ebenso die Progression bereits bestehender vaskulärer Veränderungen.<sup>[14,29,30]</sup> Dabei ist ein Fortschreiten der Kalzifizierung ein unabhängiger Marker für eine erhöhte Mortalität, unabhängig vom Ausgangsstadium.<sup>[31]</sup> Bei Dialysepatienten ist das statistische Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen deutlich erhöht, sodass ihre kardiovaskuläre Mortalität vergleichbar ist mit der einer deutlich älteren gesunden Population.<sup>[32-34]</sup>

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die hauptsächliche Todesursache bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen.<sup>[35,36]</sup> Sie sind verantwortlich für circa 50 % aller Todesfälle bei Dialysepatienten und Empfängern von Nierentransplantaten.<sup>[35,36]</sup> Die kardiovaskuläre Mortalität ist bei Patienten mit Nierenerkrankungen im Endstadium um das 15- bis 30-Fache erhöht im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung gleichen Alters.<sup>[35]</sup> Dies gilt für alle Altersgruppen, besonders prägnant ist der Unterschied jedoch bei jungen Patienten. In der Gruppe der 25- bis 34-Jährigen ist die kardiovaskuläre Mortalität gegenüber der gesunden Population gleichen Alters 500-fach erhöht.<sup>[34,37]</sup> Unter diesen Umständen ist es nicht verwunderlich, dass es für Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen wahrscheinlicher ist, infolge einer kardiovaskulären Erkrankung zu sterben, als ein Nierenversagen zu entwickeln.<sup>[36,37]</sup>

### 1.1.2 Klinische Auswirkungen

Ursache für das gehäufte Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit medialer Kalzifizierung ist die zunehmende Versteifung der Gefäße.<sup>[32,38]</sup> Diese wird durch die Verkalkung der Gefäßwände verursacht. Durch den Verlust der Elastizität kommt es zur Beeinträchtigung der arteriellen Hämodynamik. Die Folgen sind davon abhängig, welche Gefäße betroffen sind.<sup>[3]</sup> Die Effekte einer gestörten Mikrozirkulation sind bisher nur unvollständig verstanden. Es ist bekannt, dass es in fortgeschrittenen Stadien peripherer Verkalkung zu verminderter Perfusion des Gewebes kommen kann. Dies kann zu einer Stase des arteriellen Blutflusses und in dessen Folge zu diffuser Thrombenbildung führen.<sup>[3]</sup>

Die Auswirkungen von Kalziumeinlagerungen in der Makrozirkulation sind dagegen ausreichend bekannt. Eine Versteifung der großen, herznahen Gefäße führt zu erhöhter Pulswellengeschwindigkeit, erhöhtem systolischem Blutdruck, erhöhtem Pulsdruck, linksventrikulärer Hypertrophie, myokardialer Ischämie und in letzter Konsequenz zu kongestiver Herzinsuffizienz bis hin zu Herzversagen.<sup>[19,32,39–41]</sup> Eine wichtige Rolle spielt hierbei der progressive Verlust der Windkesselfunktion. Physiologischerweise speichert die elastische Aorta die während der Systole frei werdende, überschüssige Energie und setzt sie in der Diastole wieder frei, was zu einer effizienteren Nutzung der kardialen Arbeit führt. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt im Aortenbogen, wo die mechanische Belastung am höchsten ist, was sich histologisch in einem besonders hohen Elastin-Gehalt widerspiegelt.<sup>[41]</sup> Eine durch Kalzifizierung eingeschränkte Windkesselfunktion führt zu einem Anstieg des Pulsdrucks (Differenz zwischen systolischem und diastolischem Blutdruck), insbesondere durch eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks,<sup>[42]</sup> und zu einer messbaren Erhöhung der arteriellen Pulswellengeschwindigkeit.<sup>[41]</sup> Diese hat eine zusätzliche Steigerung des systolischen Blutdrucks zur Folge: Der zentrale arterielle Druck setzt sich aus einer orthograden (mit dem Blutfluss fließenden) Welle und einer retrograden (gegen den Blutfluss fließenden) Welle zusammen.<sup>[43]</sup> Letztere entsteht durch die Reflektion der orthograden Welle in der Peripherie.<sup>[43]</sup> Im gesunden Gefäß erreicht die retrograde Welle die herznahen Bereiche während der Diastole und trägt zum diastolischen Blutdruck bei. Wenn es jedoch aufgrund versteifter Gefäße zu einer erhöhten Pulswellengeschwindigkeit kommt, trifft die retrograde Pulswelle vorzeitig, bereits während der späten Systole wieder in der Aorta ein.<sup>[43]</sup> Dadurch treffen orthograde und retrograde Pulswelle aufeinander. Die beiden Wellen addieren sich und führen so zu einer weiteren Steigerung des

systolischen Blutdrucks.<sup>[40,41,44,45]</sup> Zugleich fehlt die retrograde Welle beim diastolischen Blutdruck, sodass dieser absinkt.

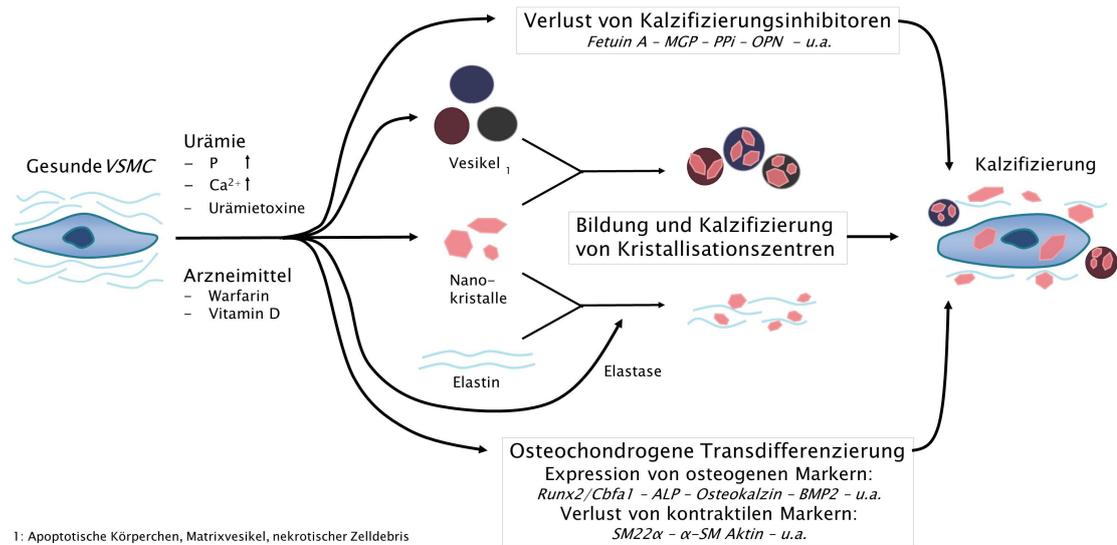
Der verminderte diastolische Blutdruck schränkt die Durchblutung der Koronargefäße ein, was zu einer myokardialen Ischämie führen kann.<sup>[40,41]</sup> Durch die verringerte Pulsatilität kann die Organperfusion beeinträchtigt werden.<sup>[3]</sup> Des Weiteren kommt es zu einer Erhöhung der Nachlast, wodurch die vom Herzmuskel zu erbringende Leistung erhöht wird.<sup>[41]</sup> Dies kann zu linksventrikulärer Hypertrophie,<sup>[19,41]</sup> diastolischer Dysfunktion<sup>[41,46]</sup> und letztendlich zu Herzversagen<sup>[41,47]</sup> führen.

Die Kombination aus erhöhtem systolischen Blutdruck und vermindertem diastolischen Blutdruck führt zu einem erhöhten Pulsdruck.<sup>[48]</sup> Dieser kann als Indikator für die Versteifung und damit für die Kalzifizierung der großen arteriellen Gefäße herangezogen werden.<sup>[40]</sup> Einen deutlich besseren prognostischen Wert hat allerdings die Pulswellengeschwindigkeit der Aorta, mit der man einen aussagekräftigen Marker für eine zukünftige kardiovaskuläre Problematik und für die allgemeine Sterblichkeit hat.<sup>[49]</sup> Die Pulswellengeschwindigkeit beschreibt die Geschwindigkeit, mit der sich eine Pulswelle im Gefäß fortbewegt. Sie beträgt bei einem gesunden Zwanzigjährigen in der Aorta circa 4,5 m/s und steigt bei einem gesunden Siebzigjährigen um das 2,5-Fache auf 10 – 11 m/s.<sup>[50]</sup> Prinzipiell lässt sich die Pulswellengeschwindigkeit zwischen zwei beliebigen Stellen des vaskulären Systems bestimmen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Pulswellengeschwindigkeit der Aorta eine deutlich höhere Aussagekraft in Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen und die allgemeine Sterblichkeit hat, als Messungen, welche die Gefäße der distalen Gliedmaßen miteinbeziehen.<sup>[50]</sup> Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Pulswellengeschwindigkeit der Aorta die beste nicht-invasive Methode zur Untersuchung der Gefäßversteifung ist. Sie zeigt eine hohe Korrelation mit dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und hat eine deutlich bessere prognostische Aussagekraft als der Blutdruck.<sup>[50]</sup>

### 1.1.3 Pathogenese

Lange Zeit wurde die mediale vaskuläre Kalzifizierung als ein rein passiver Prozess interpretiert, bei dem es zur Ablagerung von Kalziumphosphaten in der Gefäßwand kommt, sobald die Löslichkeit im Blut überschritten ist. Diese Theorie konnte in den letzten Jahren widerlegt werden und gilt heute als obsolet. Bei der medialen vaskulären Verkalkung handelt es sich um einen aktiv regulierten Prozess, welcher der Osteogenese ähnelt und bei dem eine große Anzahl an unterschiedlichen Faktoren und Mechanismen eine Rolle spielen. Einen Überblick hierüber gibt Abbildung 1.2. Die genaue Pathogenese der Arteriosklerose ist in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung gewesen. Obwohl zahlreiche Signalwege identifiziert wurden, ist ihr exakter Zusammenhang nach wie vor nicht vollständig geklärt. Dies mag auch damit zusammenhängen, dass die vaskuläre Kalzifizierung keine eigenständige Krankheit mit einheitlicher Ätiologie ist, sondern eine Folgeerscheinung verschiedener Erkrankungen darstellt, sodass dem Verkalkungsprozess möglicherweise unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde liegen.<sup>[3]</sup> Die ablaufenden Prozesse ähneln stark der Knochenbildung. Inzwischen haben sich mindestens drei Schlüsselereignisse herauskristallisiert, welche den pathologischen Mineralisierungsprozess im Gefäß fördern und die mit hoher Wahrscheinlichkeit parallel ablaufen: (1) *Bildung von Kristallisationszentren*, (2) *Verlust von Kalzifizierungsinhibitoren*, (3) *osteochondrogene Transdifferenzierung vaskulärer Zellen*.<sup>[32]</sup> Diese Schlüsselereignisse werden durch urämische Bedingungen herbeigeführt.<sup>[32]</sup> Dazu gehören Hyperphosphatämie und Hyperkalzämie<sup>[24]</sup> und Urämietoxine, welche zu oxidativem Stress führen.<sup>[51–53]</sup> Außerdem kann unter anderem der therapeutische Einsatz von Warfarin und hoch dosiertem Vitamin D die Kalzifizierung begünstigen.<sup>[54]</sup>

Auch wenn eine gestörte Kalzium-Phosphat-Homöostase nicht alleiniger Verursacher der Gefäßverkalkung ist, so spielt sie doch eine wichtige Rolle. Insbesondere die Hyperphosphatämie korreliert beim Menschen mit der Ausbildung einer vaskulären Kalzifizierung und mit der Mortalitätsrate.<sup>[55]</sup> Diese Zusammenhänge sind im Tiermodell reproduzierbar, außerdem kann hier durch eine verminderte Phosphatzufuhr die Kalzifizierung deutlich verringert werden.<sup>[56,57]</sup> Unter urämischen Bedingungen kommt es zur Bildung von Kalziumphosphat-Nanokristallen,<sup>[58]</sup> welche in VSMCs akkumulieren und so zur Verkalkung beitragen. Zusätzlich wird dadurch der intrazelluläre Kalziumspiegel erhöht,<sup>[3]</sup> was einen zytotoxischen Effekt hat.<sup>[59,60]</sup> Die Zellen sterben ab und hinterlassen nekrotischen Zelldebris, wel-



### Abbildung 1.2: Pathogenese der vaskulären Kalzifizierung.

Unter urämischen Bedingungen kommt es zur Kalzifizierung von Gefäßwänden. Eine wichtige Rolle spielen dabei der Verlust von Kalzifizierungsinhibitoren, die Bildung von Kalzifikationszentren (Vesikel und fragmentiertes Elastin) und die osteochondrogene Transdifferenzierung vaskulärer Zellen.

VSMC=vascular smooth muscle cell (glatte Gefäßmuskelzelle), MGP=Matrix gla protein, PPI=Pyrophosphat, OPN=Osteopontin, Runx2=Runx-related transcription factor 2, Cbfa1=Core-binding factor 1, ALP=Alkalische Phosphatase, BMP2=Bone morphogenetic protein 2, SM=Smooth muscle.

cher als Kristallisationszentrum für die Ablagerung von Kalziumphosphatkristallen dient.<sup>[3]</sup> Ebenfalls eine Rolle als Kristallisationszentren spielen Matrixvesikel und apoptotische Körperchen. Matrixvesikel werden von den Plasmamembranen lebender Zellen abgespalten, während apoptotische Körperchen bei der Apoptose von VSMCs entstehen.<sup>[61]</sup> Dabei handelt es sich um physiologische Prozesse, welche im gesunden Organismus ohne Folgen bleiben, da die Vesikel mit Kalzifizierungsinhibitoren gefüllt sind, welche eine Einlagerung von Hydroxylapatit verhindern.<sup>[61,62]</sup> Unter urämischen Bedingungen kommt es zum einen zur vermehrten Sekretion dieser Vesikel,<sup>[63]</sup> zum anderen zu einem Inhibitoren-Mangel, wodurch die Vesikel kalzifizieren. In der extrazellulären Matrix konzentrieren sich die Kristallablagerungen auf das Elastin (im Gegensatz zum Knochen, wo sich die Kristalle bevorzugt an Kollagen I ablageren). Bei Urämie kommt es durch Elastase und andere Proteasen zu einer Fragmentierung des Elastins, wodurch seine Wirkung als Kristallisationszentrum gefördert wird.<sup>[64,65]</sup>

Der Einfluss der Kalzifizierungsinhibitoren ist nicht auf die Kristallisationszentren beschränkt. Sie kommen sowohl intra- als auch extrazellulär vor und beeinflussen die Kalzifizierung an unterschiedlichen Punkten. Eine kalzifizierungs-

inhibierende Wirkung haben unter anderem Fetuin A, Matrix Gla Protein (MGP), Pyrophosphat (PPi) und Osteopontin (OPN).<sup>[66-68]</sup> Fetuin A ist ein potenter Inhibitor, dessen Relevanz im Fetuin A-defizienten Mausmodell deutlich wird, in welchem die Tiere eine massive Weichteilkalzifizierung entwickeln.<sup>[69]</sup> Ein Zusammenhang zwischen niedrigem Fetuin A-Level und der Kalzifizierung der abdominalen Aorta, unabhängig von der Nierenfunktion, konnte auch in klinischen Studien nachgewiesen werden.<sup>[70]</sup> Fetuin A zirkuliert im Organismus, hat aber ebenso eine lokale, intrazelluläre Wirkung. Es verhindert die Kristallablagerung um Kollagenfasern<sup>[71]</sup> und akkumuliert in Matrixvesikeln und apoptotischen Körperchen, wodurch deren Wirkung als Kristallisationszentren eingeschränkt wird.<sup>[62]</sup> MGP-defiziente Mäuse entwickeln innerhalb von 2 Monaten eine derart massive arterielle Kalzifizierung, dass es zu einer Aortenruptur kommt.<sup>[72]</sup> MGP inhibiert in seiner  $\beta$ -carboxylierten Form den potenten osteogenen Faktor *Bone morphogenetic protein 2* (BMP-2), welcher zur Transdifferenzierung vaskulärer Zellen beiträgt.<sup>[73]</sup> Die  $\beta$ -Carboxylierung ist Vitamin K-abhängig, weshalb Warfarin zur vaskulären Kalzifizierung beiträgt.<sup>[74]</sup> Des Weiteren bindet MGP Kalziumionen und mindert dadurch das Kristallwachstum.<sup>[75]</sup> PPi ist ebenfalls ein wichtiger Faktor,<sup>[76]</sup> welcher sowohl die Bildung von Hydroxylapatitkristallen<sup>[77]</sup> als auch die osteochondrogene Transdifferenzierung von VSMCs inhibiert.<sup>[78,79]</sup> OPN hemmt die Kalzifizierung durch Bindung an Hydroxylapatitkristalle<sup>[80]</sup> und indem es zur Aktivierung von Osteoklasten beiträgt.<sup>[81]</sup>

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Kalzifizierung ist die unter urämischen Bedingungen stattfindende Transdifferenzierung vaskulärer Zellen. VSMCs sind größtenteils mesenchymalen Ursprungs und weisen eine phänotypische Plastizität auf, welche an Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen erinnert.<sup>[82]</sup> Diese Plastizität fördert die Transdifferenzierung kontraktiler VSMCs über einen synthetisierenden/proliferativen Phänotyp bis hin zu einem osteochondrogenen Phänotyp, welcher die Kalzifizierung vorantreibt.<sup>[83]</sup> Neben den VSMCs können auch vaskuläre Perizyten und mesenchymale Stammzellen transdifferenzieren.<sup>[21]</sup> Betroffene Zellen exprimieren Marker, welche normalerweise auf Knochen- und Knorpelzellen beschränkt sind, unter anderem die Transkriptionsfaktoren *Runt-related transcription factor 2* (Runx2)/*Core-binding factor 1* (Cbfa1) und Sox9, sowie die Mineralisierung regulierende Proteine wie beispielsweise alkalische Phosphatase (ALP), Osteokalzin, OPN und Sialoprotein.<sup>[32,84]</sup> Zugleich gehen Marker wie wie *Smooth muscle* (SM) 22 $\alpha$  und  $\alpha$ -SM Aktin, welche charakteristisch für kon-

traktile Zellen sind, verloren.<sup>[85]</sup> Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor Runx2/Cbfa1 eine Schlüsselrolle bei der Transdifferenzierung spielt.<sup>[32,86]</sup> Er ist bereits in frühen Stadien der Transdifferenzierung hochreguliert, wobei seine Expressierung unter anderem durch Faktoren wie erhöhtes Phosphat, welches über die Phosphat-Transporter Pit1 und Pit2 von den VSMCs aufgenommen wird,<sup>[87]</sup> und oxidativen Stress<sup>[88]</sup> gefördert wird. Weitere Transkriptionsfaktoren, welche die osteochondrogene Transdifferenzierung fördern, sind Osterix, Msx2 und DDX5.<sup>[32,85]</sup> Das in osteochondrogenen vaskulären Zellen verstärkt synthetisierte Enzym ALP, welches physiologischerweise eine zentrale Rolle bei der Ossifikation von Knochen spielt, ist auch bei der vaskulären Kalzifizierung von Bedeutung. Es hydrolysiert und inaktiviert damit den Kalzifizierungs-Inhibitor PPi und setzt zugleich Phosphationen frei, welche die Bildung von Hydroxylapatitkristallen fördern.<sup>[89,90]</sup>

Weitere regulierende Faktoren im komplexen Kalzifizierungsprozess sind unter anderem die zelluläre Seneszenz,<sup>[32]</sup> die Triade aus RANK/RANKL/OPG (*Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (ligand)/Osteoprotegerin*), welche die Osteoklastenaktivierung reguliert,<sup>[91,92]</sup> *Bone morphogenetic proteins* (BMPs) (Wachstumsfaktoren, die die Osteogenese regulieren),<sup>[73]</sup> und microRNAs, die die translationale Regulierung beeinflussen.<sup>[91]</sup>

Ein Faktor, dessen Einfluss auf die vaskuläre Kalzifizierung bisher nur wenig untersucht ist, ist die Rolle des Endothels. Es gibt jedoch einige Erkenntnisse, die darauf hinweisen, dass ein defektes Endothel zur vaskulären Kalzifizierung beiträgt. Endotheliale Dysfunktion geht mit einer verminderten Sekretion des potenten Vasodilatators Stickstoffmonoxid einher. Sowohl im Tiermodell<sup>[93]</sup> als auch im Menschen<sup>[94]</sup> konnte nachgewiesen werden, dass Stickstoffmonoxid einen positiven Effekt auf die Gefäßelastizität hat. McEniery *et al.* konnten in gesunden Probanden eine negative Korrelation zwischen endothelialer Funktion und Gefäßsteifigkeit aufzeigen.<sup>[95]</sup> Außerdem belegen *in vitro*-Ergebnisse, dass Stickstoffmonoxid die osteogene Transdifferenzierung von VSMCs hemmt.<sup>[96]</sup> Ein weiterer mit dem Endothel verknüpfter Faktor, welcher ebenfalls eine Rolle bei vaskulären Erkrankungen spielt, sind reaktive Sauerstoffspezies, engl. *Reactive oxygen species* (ROS). Oxidativer Stress führt *in vitro* zu osteogener Transdifferenzierung und folglich zu Kalzifizierung.<sup>[88,97]</sup> Außerdem üben einige die Kalzifizierung fördernde Substanzen ihren Einfluss über gesteigerte ROS Produktion aus.<sup>[98,99]</sup> Mit Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (Up<sub>4</sub>A) ist zudem ein kalzifizierungsfördernder Faktor bekannt, welcher aus dem Endothel sezerniert wird.<sup>[98]</sup>

## 1.2 Modelle für mediale vaskuläre Kalzifizierung

Um die der medialen vaskulären Verkalkung zugrunde liegenden Vorgänge zu untersuchen, wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Modelle entwickelt, welche inzwischen fest etabliert sind und im Forschungsalltag routinemäßig eingesetzt werden.

### 1.2.1 *In vitro*- und *ex vivo*-Modelle

Die Zellkultur ist ein häufig angewandtes Modell, um den Einfluss verschiedener Substanzen auf den Kalzifizierungsprozess vaskulärer Zellen zu untersuchen. Neben diversen anderen Zelltypen werden in erster Linie VSMCs eingesetzt. Durch Verwendung eines speziellen Kalzifizierungsmediums wird die Kalzifizierung der Zellen induziert. Die in der Literatur beschriebenen Medien ähneln einander, variieren aber in ihrer exakten Zusammensetzung. Als Grundlage dient dabei *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) mit niedrigem (1,0 g/l) oder hohem (4,5 g/l) Glucose-Gehalt, welchem *Fetal calf serum* (FCS) (10 – 20 %) zugesetzt wird. Um die Kalzifizierung zu induzieren wird eine Phosphatquelle hinzugegeben, meistens in Form von  $\beta$ -Glycerophosphat,<sup>[100–102]</sup> außerdem diverse weitere Substanzen, die die Kalzifizierung unterstützen, unter anderem Ascorbinsäure<sup>[98,99]</sup> und Natriumpyruvat.<sup>[103,104]</sup> Eine Ergänzung zu diesen *in vitro*-Modellen stellen *ex vivo*-Modelle dar. Hierbei werden anstelle isolierter Zellen ganze Gefäßbringe, beispielsweise aus der Aorta oder der Arteria (A.) carotis communis in den gleichen Medien inkubiert.<sup>[76,98,99,105]</sup>

### 1.2.2 *In vivo*-Modelle

Es gibt verschiedene *in vivo*-Modelle zur Untersuchung der medialen vaskulären Kalzifizierung. Eine gewisse Herausforderung stellt dabei die relativ hohe natürliche Resistenz von Kleinnagern gegen vaskuläre Kalzifizierung dar. Um in den Modellen zuverlässig eine Kalzifizierung zu induzieren, müssen daher mehrere kalzifizierungsfördernde Aspekte zusammenkommen. Die meisten Modelle ahmen die pathologischen Zustände bei Urämie nach, indem sie eine Niereninsuffizienz induzieren. Die Gefäßverkalkung wird zusätzlich durch die Hinzugabe kalzifizierungsfördernder Substanzen unterstützt.<sup>[106,107]</sup> Außerdem gibt es diverse transgene und Knockoutmodelle, mit welchen sich der Einfluss einzelner Faktoren beob-

achten lässt.<sup>[106]</sup> Die beiden gängigsten Urämie induzierenden Modelle sind das  $5/6$  Nephrektomie-Modell und das Adenin-Modell.

### **$5/6$ Nephrektomie-Modell**

Das  $5/6$  Nephrektomie-Modell ahmt den bei chronischer Niereninsuffizienz auftretenden progressiven Verlust der Nephrone nach. Die Methode wurde erstmals 1923 von Chanutin und Ferris beschrieben<sup>[108]</sup> und wird in modifizierten Varianten nach wie vor angewandt. Im Rahmen zweier chirurgischer Eingriffe werden eine partielle und eine totale Nephrektomie vorgenommen. Bei der partiellen Nephrektomie wird mit unterschiedlichen Techniken (Resektion oder Ligatur beider Nierenpole, Elektrokoagulation der Nierenrinde, partielle Ligatur der Nierenarterien)  $2/3$  des Nierengewebes einer Niere zerstört. Nach einer adäquaten Erholungspause (in der Regel eine Woche) wird in einer zweiten Operation die kontralaterale Niere vollständig entfernt.<sup>[109,110]</sup>

Durch die Reduzierung des Nierengewebes wird eine gering- bis mittelgradige Niereninsuffizienz verursacht. Um eine vaskuläre Kalzifizierung zu induzieren, ist eine  $5/6$  Nephrektomie alleine jedoch nicht ausreichend. Um eine zuverlässige Mineralisierung herbeizuführen muss zusätzlich  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  oral, subkutan oder intraperitoneal appliziert werden.<sup>[111–115]</sup> Mit dieser Methode lässt sich eine diffuse, hochgradige Kalzifizierung der gesamten Aortenwand, sowohl in der thorakalen als auch in der abdominalen Aorta induzieren.<sup>[113]</sup> Dieses Modell für Urämie-assoziierte arterielle Kalzifizierung zeigt eine reproduzierbare und vergleichbar stark ausgeprägte Kalzifizierung bei allen Tieren.<sup>[106]</sup>

### **Adenin-Modell**

Beim Adenin-Modell wird die Niereninsuffizienz und damit die daraus folgende vaskuläre Kalzifizierung nicht-invasiv durch die orale Verabreichung von Adenin mit dem Futter induziert. Adenin ist eine physiologisch im Körper vorkommende Purin-Base. Bei der Verstoffwechslung stellt das Enzym Adenin-Phosphoribosyltransferase den limitierenden Faktor dar. Wenn durch übermäßige Verabreichung von Adenin die Kapazität des Enzyms überschritten wird, wird das überschüssige Adenin zu 2,8-Dihydroxyadenin oxidiert.<sup>[116]</sup> Dieses wird mit dem Urin über die Nieren ausgeschieden. Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit kommt es zur Präzipitation in der Niere, wo die Kristalle zu einer Beschädigung der Nierentubuli

führen. Folge sind Entzündung, Obstruktion und eine ausgeprägte Fibrose der Tubuli.<sup>[117]</sup> Diese Schädigung der Niere führt zu einer chronischen Niereninsuffizienz und infolge zu einer medialen vaskulären Kalzifizierung.

Das Adenin wird mit einer speziellen Diät verabreicht. Die ehemals übliche Verabreichung von 0,75 % Adenin über 4 Wochen führt zu einer mittel- bis hochgradigen medialen Kalzifizierung der Aorta,<sup>[118]</sup> allerdings nur bei circa 50 % der Tiere. Eine Verringerung des Proteingehalts auf 2,5 % führt zwar zu einer zuverlässigen Kalzifizierung, hat aber auch einen massiven, tierschutzrelevanten Gewichtsverlust zur Folge.<sup>[119]</sup> Eine Diät, welche beide Probleme merklich reduziert, beinhaltet einen verringerten Adeningehalt von 0,25 % und einen Proteingehalt von 6 %. Sie führt zu einer zuverlässigen Kalzifizierung bei nur geringem Gewichtsverlust.<sup>[120]</sup>

Ein Vorteil der Adenin-Diät gegenüber der  $\frac{5}{6}$  Nephrektomie ist, dass weder ein chirurgischer Eingriff, noch eine Vitamin D-Gabe vonnöten ist. Somit ist die Methode mit einem geringen Arbeitsaufwand verbunden und geht für die Versuchstiere mit einer im Vergleich niedrigeren Belastung einher. Jedoch ist die Methode bislang, im Gegensatz zur  $\frac{5}{6}$  Nephrektomie nur bei Ratten, jedoch nicht bei Mäusen beschrieben.

## 2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines neuen physiologischen *ex vivo*-Modells zur Erforschung der vaskulären Kalzifizierung: Die Isoliert perfundierte Aorta (IPA). Das neue Modell soll zur Klärung der Frage beitragen, welche Rolle das Endothel bei der Gefäßverkalkung spielt, weshalb es eine gezielte Beeinflussung des Endothels ermöglichen muss. Außerdem soll es die physiologischen Vorgänge im Körper besser nachahmen als bestehende *in vitro*- und *ex vivo*-Modelle und mit weniger Belastung für die Versuchstiere verbunden sein als *in vivo*-Modelle.

Diese Anforderungen führten zu der Idee eines Modells, in welchem ganze isolierte Aorten mit Zellkulturmedien perfundiert werden. Folgende Vorgehensweise war geplant: Es wird eine Kammer entwickelt, in welche die präparierten Aorten eingespannt werden. Eingebunden in ein Schlauchsystem werden sie Teil eines geschlossenen Kreislaufs, durch den ein Perfusionsmedium, entsprechend den etablierten Medien aus Zellkultur-Modellen, gepumpt wird. Durch Hinzufügen einer Phosphatquelle soll die Kalzifizierung der Gefäßwandwand induziert werden. Die Aorten werden für 14 Tage im Brutschrank perfundiert und im Anschluss hinsichtlich ihres Kalziumgehaltes untersucht. Nach seiner Etablierung soll das Modell genutzt werden, um den Einfluss des Endothels und verschiedener Substanzen auf den Kalzifizierungsprozess zu untersuchen.

Bei der Entwicklung und Etablierung der IPA galt es folgende Punkte zu klären:

### **Methodenetablierung**

- Entwicklung und Optimierung der Techniken zur Aortenpräparation (Entnahme, Vorbereitung)
- Optimierung der Zusammensetzung der verwendeten Medien
- Zusammenbau, Handhabung und Pflege der Perfusionskammer
- Versuchsablauf, Entwicklung einer Technik zum Medienwechsel
- Erkennen und Beheben von Fehlerquellen

### ***Proof of Concept***

- Kann mittels Kalzifizierungsmedien eine mediale Kalzifizierung induziert werden?
- Erhebung von Vergleichsdaten für spätere Versuche



# 3 Material

## 3.1 Geräte

Analysewaage	Sartorius (Göttingen, D)
Autoklav (Systec VX-150)	Systec GmbH (Wettenberg, D)
Binokular	Helmut Hund (Wetzlar, D)
Bipolare Pinzette non-stick red	KLS Martin (Tuttlingen, D)
Brutschrank (MCO-19AIC)	Panasonic (Kadoma, JPN)
Geldokumentationsanlage	Vilber Lourmat (Eberhardzell, D)
Gewebeeinbettautomat	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Hochfrequenz-Chirurgiegerät ME 102	KLS Martin (Tuttlingen, D)
Kühlplatte MPS/C	Slee (Mainz, D)
Mikrochirurgisches Besteck	Fine Science Tools (Heidelberg, D)
Mikroskop Olympus CK 40	Olympus (Hamburg, D)
Mikrotom (Microm HM340E)	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Multiskan Spektrum	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Paraffinausgießstation	Leica Mikrosysteme (Wetzlar, D)
pH-Meter (Calimatic 761)	Knick (Berlin, D)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Plattenschüttler (MTS 2/4 digital)	IKA <sup>®</sup> -Werke (Staufen, D)
Präzisionswaage	Sartorius (Göttingen, D)
Pumpe (Ecoline VC-MS/CA 8-6)	Ismatec/IDEX (Wertheim, D)
Rotations-Vakuum-Konzentrator (SpeedDry 2-33 IR)	Martin Christ (Osterode am Harz, D)
Section Transfer System	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Stereomikroskop (2000-C)	Carl Zeiss (Oberkochen, D)
Streckbad	Boekel Scientific (Feasterville, USA)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg, D)
Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Wasseraufbereitungssystem	Elga (Celle, D)
Wasserbad	Julabo (Seelbach, D)

## 3.2 Verbrauchsmaterialien

3-Wege-Hahn Discofix®	B. Braun (Melsungen, D)
Biopsiekassetten M507 Micromesh™	Simport (Beloeil, CAN)
Falcon® Centrifuge Tubes	VWR (Darmstadt, D)
Kombi-Stopfen	Fresenius Kabi (Bad-Homburg, D)
Mikrotomklingen N35/S35	pfm Medical AG (Köln, D)
Nunc™ 96-Loch-Platte	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Objektträger SuperFrost® plus	R. Langenbrinck (Emmendingen, D)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, D)
Pumpenschlauch Tygon®	Ismatec/IDEX (Wertheim, D)
R3607, violett-violett	
Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel	Sorenson (Salt Lake City, USA)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, D)
Schlauch Tygon® 3350 Platin	Ismatec/IDEX (Wertheim, D)
Schlauchklemmen	Bel-Art Products (Wayne, USA)
Silikon-Pumpenschlauch CH28.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Skalpell No. 15/20	pfm medical AG (Köln, D)
Spitzenfilter 0,22 µm	TPP (Trasadingen, CH)
Sterilfilter 0,22 µm (Steritop)	Merck Millipore (Darmstadt, D)
Venenverweilkatheter (Vasofix Safety)	B. Braun (Melsungen, D)
Zellkulturschalen (Ø22 cm <sup>2</sup> )	TPP (Trasadingen, CH)

## 3.3 Tierhaltung

Alleinfuttermittel für	Ssniff (Soest, D)
Ratten & Mäuse-Haltung (V1535-000)	
Wistar-Ratten RjHan:WI	Janvier (Le Genest-Saint-Isle, F)

### 3.4 Chemikalien

Aceton	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Alizarin-Rot	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Biozidal ZF	WAK-Chemie (Steinbach, D)
Colorimetric Kalzium Assay Kit	ScienCell (Carlsbad, USA)
DMEM (4, 5 g/l Glc, mit Phenolrot)	Biochrom (Berlin, D)
Eindeckmedium Cytoseal™	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Eosin Y-Lösung	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethanol (96 %, 99 %)	Herbeta Arzneimittel (Berlin, D)
FCS	Biochrom (Berlin, D)
Formaldehyd-Lsg. (4 %, gepuffert)	Herbeta Arzneimittel (Berlin, D)
$\alpha$ -D-Glucose	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96 %)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
HCl (1 M)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Isofluran Forene®	AbbVie (Ludwigshafen am Rhein, D)
KCl	Merck (Darmstadt, D)
Meyer's Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
NaCl	Carl Roth (Karlsruhe, D)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck (Darmstadt, D)
NaOH	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumthiosulfat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
NH <sub>4</sub> OH	Merck (Darmstadt, D)
Paraffin	Merck Millipore (Darmstadt, D)
PBS	Biochrom (Berlin, D)
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml	Biochrom (Berlin, D)
Pentobarbital-Natrium: Narcoren®	Merial (Hallbergmoos, D)
Pyrogallol	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Roti®-Histol	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Silbernitratlösung (5 %)	Carl Roth (Karlsruhe, D)

### 3.5 Software und Datenbanken

GIMP 2.8	Open Source
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software (Philadelphia, USA)
JabRef	Open Source
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond, USA)
MikTeX 2.9	Open Source
SkaniIt™ Software 2.4.2	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Texmaker	Open Source
US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
Zeiss ZEN 2012 lite	Carl Zeiss (Oberkochen, D)

# 4 Methoden

Die Entwicklung und Etablierung der Methoden stellen einen großen Teil der Arbeit dar, daher werden die Methoden in diesem Kapitel zusammenfassend beschrieben und im Ergebnisteil ausführlicher erläutert.

## 4.1 Tiere und Tierhaltung

Die Aorten stammten von männlichen Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Alter von  $70 \pm 9$  Tagen und einem durchschnittlichen Gewicht von  $400 \pm 37$  g. Die Ratten wurden je nach Alter in Gruppen von 2 – 6 Tieren in Typ 4-Käfigen gehalten. Leitungswasser und Standard-Futter standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Raumtemperatur betrug  $23 \pm 1$  °C bei einer Luftfeuchtigkeit von  $45 \pm 10$  %. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h vorgegeben.

Für die Organentnahme lag eine Erlaubnis zur Durchführung von Tierexperimenten des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) vor (Aktenzeichen O 0212/02).

## 4.2 Rattenaorten

Die Tiere wurden mit 200 mg/kg Pentobarbital-Natrium (Narcoren® 16 g/100 ml) intraperitoneal narkotisiert. Sehr nervöse Tiere wurden zuvor inhalativ mit Isofluran (Forene®) betäubt. Die Narkosetiefe wurde mittels Reflexprüfung kontrolliert. Das Abdomen wurde in der Medianen eröffnet. Die linke Niere wurde zur Seite geklappt, wodurch die Aorta freigelegt wurde. Der Thorax wurde beidseitig geöffnet und abgetrennt. Lungen und Thymus wurden entnommen, der Aortenbogen möglichst herznah abgetrennt und das Herz entnommen, wodurch der Tod des Tieres herbeigeführt wurde.

Die Aorta wurde vom Aortenbogen bis etwa zu den Nierenabgängen entnommen und in eine Zellkulturschale mit *Phosphate buffered saline* (PBS) überführt. Das Bindegewebe wurde vorsichtig entfernt, wobei die Gefäßabgänge nicht abgetrennt werden durften. Es wurde eine Schemazeichnung der Aorta angefertigt, auf welcher die Positionen der Gefäßabgänge markiert wurden. Mit Hilfe eines Hochfrequenz-Kauters (Einstellung: Stufe 2 von 10. Stufe 10 entspricht 80 W an 100  $\Omega$ ) und einer

bipolaren Pinzette wurden alle abgehenden Gefäße durch Koagulation verschlossen und die Aorta auf die gewünschte Länge gekürzt. Die Endstücke wurden als Kontrollstücke (K) genutzt, wobei ein Stück direkt zur Dekalzifizierung in 0,6 M HCl gegeben wurde (K<sub>0</sub>), während der Rest für 14 Tage in Medium inkubiert wurde.

Die präparierten Aorten und die Kontrollstücke wurden bis zum Zusammenbau der Kammer in sterilem Medium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zwischengelagert.

## 4.3 Perfusionskammer

Die Perfusionskammer wurde in Kooperation mit der hauseigenen Werkstatt geplant und gebaut. Sie ermöglichte das Einspannen von bis zu 6 Aorten, die über ein Schlauchsystem in einen geschlossenen Kreislauf eingebunden waren. Durch diesen Kreislauf wurde mittels einer peristaltischen Pumpe das Perfusionsmedium gepumpt. Eine detaillierte Beschreibung der Kammer findet sich in Kapitel 5.1.7.

## 4.4 Nährmedien

Für den Versuch wurden zwei verschiedene Arten von Medien benötigt: Ein äußeres Nährmedium, das in die Kammer gefüllt wurde und die Aorten von außen umgab und ein Perfusionsmedium, mit welchem die Aorten perfundiert wurden.

### 4.4.1 Äußeres Nährmedium

Als äußeres Nährmedium wurde eine selbst hergestellte modifizierte Tyrodelösung (im Folgenden *Tyrode* genannt) verwendet. Ihre genaue Zusammensetzung ist Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Es wurde eine zehnfach konzentrierte Stammlösung angesetzt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Bei Bedarf wurden aus 200 ml Stammlösung und 1800 ml *Aqua bidest* 2 l der einfach konzentrierten Lösung hergestellt, welche durch Sterilfiltration in autoklavierte Flaschen sterilisiert wurde.

**Tabelle 4.1:** Zusammensetzung des äußeren Nährmediums (Tyrode).

	Substanz	Konzentration (mM)
in <i>Aqua bidest</i> :	NaCl	100
	KCl	5
	MgCl <sub>2</sub>	0,5
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
	α-D-Glucose	10

#### 4.4.2 Perfusionsmedien

Es wurden zwei Perfusionsmedien verwendet, ein Kalzifizierungsmedium und ein Kontrollmedium. Als Grundlage diente DMEM mit erhöhtem Glucosegehalt (4,5 g/l), welchem verschiedene Zusätze steril (sterilfiltriert durch Spritzenfilter, Porengröße 0,22 µm) hinzugefügt wurden (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2:** Zusammensetzung der Perfusionsmedien.

DMEM, 4,5 g/l Glucose plus Zusätze:	Kontrollmedium	Kalzifizierungsmedium
FCS	15 %	15 %
Pen/Strep	1 %	1 %
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	5 mM
Ascorbinsäure	–	284 µM

## 4.5 Versuchsaufbau

Der Zusammenbau des Systems erfolgte unter annähernd sterilen Bedingungen unter der Sterilbank. Das Zubehör wurde durch Autoklavieren (121 °C, 210 kPa, 20 min) oder durch Desinfektion mit 70 %igem Ethanol sterilisiert. Soweit möglich wurden sterile Einwegmaterialien verwendet. Die Person, die die Kammer zusammenbaute, trug sterile OP-Bekleidung. Die benötigten Medien wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Die Einzelteile der Kammer wurden zusammengebaut und das Schlauchsystem zusammengesteckt. Zum Einspannen der Aorten wurden pro Aorta zwei Venenkatheter (je nach Größe der Aorten 14 G oder 16 G) benötigt. Das Stilet wurde entfernt, der Kunststoffschlauch auf etwa 15 mm gekürzt und die Katheter auf

zwei einander gegenüberliegende Anschlüsse geschraubt. Das Medium-Gefäß wurde mit circa 75 ml Perfusionsmedium befüllt. Die Perfusionskammer wurde mit ca. 1800 ml Tyrode und 20 ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) befüllt. Die Aorten wurden eingespannt, indem ihre Enden mit Hilfe von zwei Pinzetten auf die gekürzten Venenkatheterschläuche gezogen wurden.

Vor dem Verschließen der Kammer wurde die Perfusion der Aorten und die Dichtheit des Kreislaufs überprüft und gegebenenfalls Mängel behoben. Danach wurde die Kammer geschlossen, die Ventilationsöffnungen des Deckels mit Sterilfiltern abgedeckt und der Versuch im Brutschrank gestartet. Die Kontrollstücke wurden in Zellkulturflaschen oder -schalen mit Kontrollmedium, Kalzifizierungsmedium oder Tyrode gegeben und ebenfalls inkubiert.

## 4.6 Versuchsablauf

Die Aorten wurden für 14 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> perfundiert. Die peristaltische Pumpe lief auf Stufe 10 von 99 (Flussrate: Stufe 1  $\cong$  0,87 ml/min, Stufe 99  $\cong$  87 ml/min). Alle 4 – 5 Tage wurde das Perfusionsmedium gewechselt, sowohl bei der IPA als auch bei den Kontrollstücken. Für diesen Zweck waren im Schlauchsystem zwei 3-Wege-Hähne eingebaut, durch welche altes Medium abgelassen und frisches eingespritzt werden konnte.

## 4.7 Versuchsende

Nach 14 Tagen wurde der Versuch beendet. Die Aorten wurden aus der Kammer entnommen und für die unterschiedlichen Analysen in Ringe geschnitten. Jede Aorta wurde in fünf Abschnitte geteilt, welche wiederum in drei Unterabschnitte geteilt wurden. In Unterabschnitt 1 wurde quantitativ der Kalziumgehalt bestimmt, Unterabschnitt 2 wurde zum histologischen Kalziumnachweis verwendet und Unterabschnitt 3 wurde kryokonserviert, bei –80 °C gelagert und für spätere Analysen aufbewahrt.

## 4.8 Analysemethoden

### 4.8.1 Quantitative Kalzium-Bestimmung

Der Kalziumgehalt der Aorten wurde quantitativ bestimmt. Hierfür wurden die Aortenringe für 48 Stunden in HCl (1 ml, 0,6 M) auf dem Thermomixer dekalzifiziert. Danach wurden die Ringe in ausgewogene Reaktionsgefäße überführt und nach Trocknung im Wärmeschrank (mind. 24 Stunden bei 37 °C) abgewogen. Der Überstand wurde im Rotations-Vakuum-Konzentrator (1750 min<sup>-1</sup>, 0,20 mbar, -80 °C) eingengt und der Rückstand, welcher auch das aus den Aorten gelöste Kalzium enthielt, in HCl (50 µl, 0,6 M) resuspendiert. Zur Messung des Kalziumgehaltes wurde ein Test-Kit mit o-Kresolphthalein verwendet. Dieses bildet mit Kalzium einen violetten Komplex, welcher nach 15 min Inkubation photometrisch bei 570 nm gemessen wurde. Der ermittelte absolute Kalziumgehalt wurde auf das Trockengewicht des jeweiligen Aortenrings bezogen, wodurch der relative Kalziumgehalt der Aortenringe in µg/mg Trockengewicht bestimmt wurde.

### 4.8.2 Histologie

Die Aortenringe zur histologischen Untersuchung wurden für 24 Stunden in Formaldehyd (4 %, gepuffert) fixiert, anschließend entwässert und in Paraffinblöcke eingebettet. Die Blöcke wurden am Mikrotom in 4 µm feine Scheiben geschnitten, welche über ein Schnitttransfersystem ins 20 °C warmen Auffangbecken überführt, kurz im Wasserbad bei etwa 52 °C gestreckt und auf Objektträger aufgezogen wurden. Im Anschluss wurden die Objektträger bei 37 °C über Nacht getrocknet. Die Objektträger wurden entparaffinisiert (Protokoll siehe Tabelle 4.3) und am selben Tag gefärbt. Zur allgemeinen Übersicht wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung angefertigt (Tabelle 4.4). Zum Kalziumnachweis wurde sowohl eine Alizarin-Rot-Färbung (Tabelle 4.5) als auch eine von Kossa-Färbung (Tabelle 4.6) angefertigt.

**Tabelle 4.3:** Entparaffinisierung von histologischen Schnitten

Schritt	Substanz	Dauer
1	Entparaffinisieren in Roti <sup>®</sup> -Histol	10 min
2	Entparaffinisieren in Roti <sup>®</sup> -Histol	10 min
	absteigende Alkoholreihe:	
3	95 % Ethanol	5 min
4	80 % Ethanol	5 min
5	70 % Ethanol	5 min
6	Hydratisieren in <i>Aqua dest</i>	3 min

**Tabelle 4.4:** HE-Färbung

Schritt	Substanz	Dauer
1	Färben mit Hämatoxylin (filtriert)	5 min
2	kurz waschen in <i>Aqua dest</i>	
3	Bläuen in fließendem Leitungswasser	15 min
4	Dehydrieren in 80 % Ethanol	5 min
5	Gegenfärben mit alkoholischer Eosin Y-Lösung	3 min
6	kurz waschen in <i>Aqua dest</i>	
	Dehydratisieren in aufsteigender Alkoholreihe:	
7	70 % Ethanol	3 min
8	80 % Ethanol	3 min
9	95 % Ethanol	3 min
10	99 % Ethanol	5 min
11	99 % Ethanol	5 min
12	Roti <sup>®</sup> -Histol	3 min

**Tabelle 4.5:** Alizarin-Rot-Färbung

Schritt	Substanz	Dauer
1	Färben mit Alizarin 0,5 % <sup>1</sup>	5 min
2	Auswaschen mit Aceton	mehrmals eintauchen
3	Aceton/Roti <sup>®</sup> -Histol (1:1)	mehrmals eintauchen
4	Roti <sup>®</sup> -Histol	mehrmals eintauchen

<sup>1</sup> mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bzw. NH<sub>4</sub>OH auf pH=4,0 eingestellt, filtriert.

**Tabelle 4.6:** von Kossa-Färbung

Schritt	Substanz	Dauer
1	Silbernitratlösung 5 %	30 min unter UV-Licht
2	kurz waschen in Aqua dest	
3	Pyrogallollösung 1 %	2:30 min
4	kurz waschen in Aqua dest	
5	Natriumthiosulfatlösung 5 %	2:30 min
6	kurz waschen in Aqua dest Dehydratisieren in aufsteigender Alkohol- reihe:	
7	70 % Ethanol	3 min
8	80 % Ethanol	3 min
9	95 % Ethanol	3 min
10	99 % Ethanol	5 min
11	99 % Ethanol	5 min
12	Roti <sup>®</sup> -Histol	3 min

## 4.9 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mittels Microsoft Excel sowie GraphPad Prism (Version 5). Die Ergebnisse sind, wenn nicht anders angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes, engl. *Standard error of mean*) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test in GraphPad Prism. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.



# 5 Ergebnisse

Der Ergebnisteil setzt sich aus drei Abschnitten zusammen. Der erste Abschnitt erläutert die Entwicklung und Etablierung der Methoden, die letztendlich zur Etablierung des neuen Modells geführt haben. Im zweiten Abschnitt werden die durchgeführten Versuche vorgestellt, deren Ergebnisse im dritten Abschnitt präsentiert werden.

## 5.1 Methodenetablierung

### 5.1.1 Verwendete Tiere

Als Spendertiere für die entnommenen Aorten dienten männliche Wistar-Ratten, ein gängiger Auszucht-Stamm ohne spezifische Eigenschaften. Das Gewicht der verwendeten Tiere und damit auch ihr Alter richtete sich nach der Größe der verwendeten Venenkatheter, auf welche die Aorten in der Kammer aufgezogen wurden. Zu Beginn des Projekts wurde mit G16-Kanülen ( $\text{\O}1,7$  mm) und Ratten mit etwa 300 g Körpergewicht gearbeitet. Um die Handhabung zu vereinfachen und um mehr Material zur Auswertung zur Verfügung zu haben, wurde im weiteren Verlauf auf größere Tiere und größere Venenkatheter (G14,  $\text{\O}2,2$  mm) umgestellt. Es zeigte sich, dass Aorten von Ratten mit etwa 400 g Körpergewicht am besten zu den G14-Kathetern passten. Aorten von größeren Ratten hatten einen zu großen Durchmesser, sodass sie nicht fest genug auf den Schläuchen saßen und abzurutschen drohten. Das gewünschte Gewicht hatten die verwendeten männlichen Ratten mit circa 70 Tagen erreicht.

### 5.1.2 Narkose

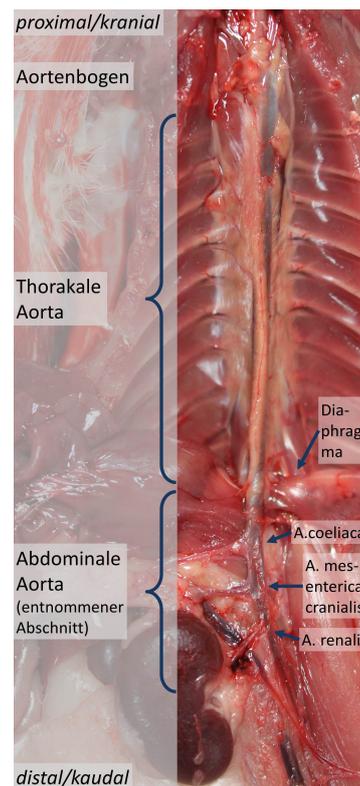
Die Tiere wurden mit 200 mg/kg Pentobarbital-Natrium (Narcoren<sup>®</sup> 16 g/100 ml) intraperitoneal narkotisiert. Besonders unruhige Tiere wurden vorab mit Isofluran (Forene<sup>®</sup>) stressarm betäubt. Die verwendete Pentobarbital-Dosis betrug die Hälfte der üblicherweise zur Organentnahme verwendeten Narkosedosis (400 mg/kg Pentobarbital-Natrium). Ziel war eine tiefe Narkose bei Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen, sodass der Tod des Spendertieres erst durch die Entnahme des Herzens zustande kam. Ein frühzeitiger Kreislaufstillstand hätte mög-

licherweise eine unerwünschte Schädigung des Endothels durch bei der Hämostase entstandene endotheltoxische Substanzen zur Folge gehabt. Mit der verwendeten Dosierung wurde in der Regel eine ausreichend tiefe Narkose bewirkt, wobei das Erreichen des Toleranzstadiums durch Überprüfung der Reflexe (Lid- und Zwischenzehenreflex) überprüft wurde. Bei nicht ausreichender Narkosetiefe wurde nach Bedarf nachdosiert.

### 5.1.3 Aortenentnahme

Es musste eine geeignete Operationsmethode zur Entnahme der Aorten entwickelt werden. Die Aorten durften keine Löcher aufweisen, damit in der Kammer ein geschlossener Kreislauf hergestellt werden konnte. Außerdem musste eine Schädigung des Endothels vermieden werden, weshalb kein Zug auf die Aortenwand ausgeübt werden durfte. Des Weiteren sollten zwischen dem Tod des Tieres und der Überführung der Aorta in ein Nährmedium nicht mehr als 5 Minuten vergehen, um eine Schädigung des Endothels durch Hämostase zu vermeiden.

Die narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage positioniert. Nach großflächigem Abpräparieren der Haut wurde das Abdomen in der Medianen auf ganzer Länge eröffnet und der Schnitt am kranialen und kaudalen Ende beidseitig nach lateral verlängert. Die Bauchorgane wurden nach rechts aus dem Abdomen verlagert, sodass man freie Sicht auf die linke Niere hatte. Diese wurde aus dem umgebenden Fett- und Bindegewebe gelöst, sodass sie ebenfalls nach rechts geklappt werden konnte. Dadurch wurde die abdominale Aorta zugänglich. Diese wurde möglichst stumpf unter Schonung der Vena (V.) cava caudalis aus dem umgebenden Binde- und Fettgewebe freipräpariert. Dies gelang am besten mit Hilfe von feinen Pinzetten oder durch vorsichtiges Abreiben mit einem Gazetupfer. Die größeren Gefäßabgänge wurden vom Diaphragma bis zu den Arteriae (Aa.) renales der Übersicht wegen dargestellt (siehe Abbildung 5.1). Zu Beginn des Projektes war geplant, die größeren abdominalen Gefäßabgänge bereits *in situ* zu koagulier-



**Abbildung 5.1:** Aorta *in situ*

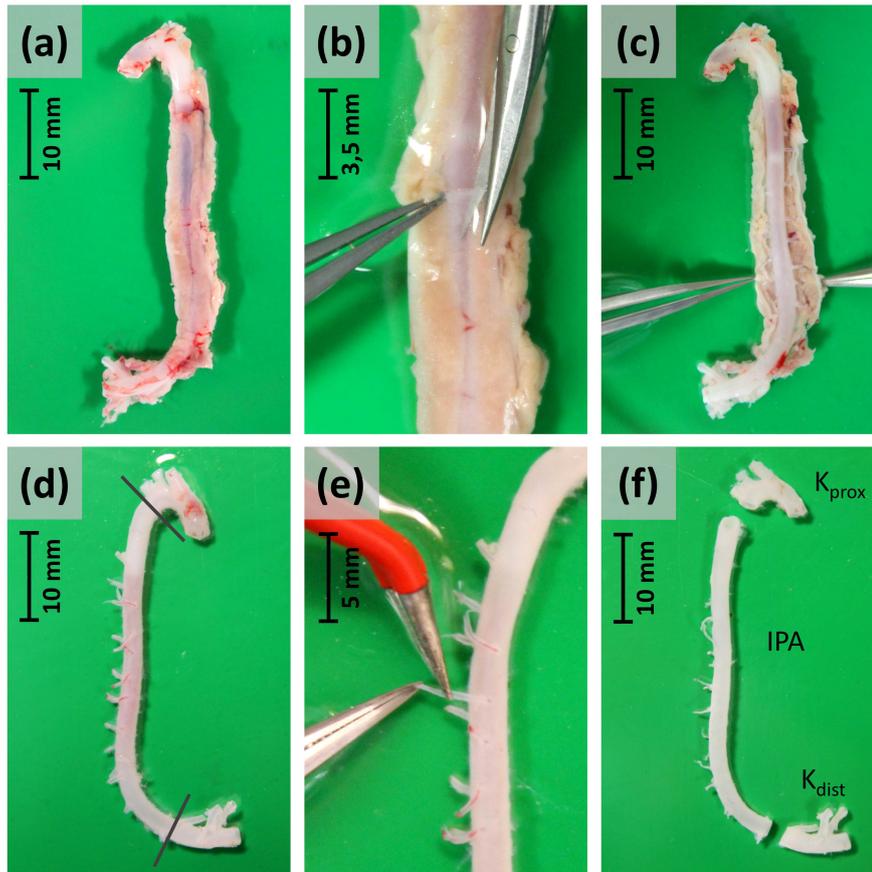
ren. Dies stellte sich im weiteren Verlauf jedoch als nicht praktikabel und zudem als nicht notwendig heraus.

Im nächsten Schritt wurde der Thorax lateral beidseitig eröffnet und entfernt. Lunge und Thymus wurden zur besseren Übersicht ebenfalls entfernt. Der Aortenbogen wurde möglichst herznah abgetrennt und das Herz entnommen. Das Zwerchfell wurde zur Aorta hin durchtrennt, sodass die Aorta vollständig freilag. Die Aorta wurde von kaudal des Abgangs der Aa. renales bis hin zum Aortenbogen mit Hilfe einer kleinen Schere entnommen. Für die weitere Verwendung war es wichtig, dass von den abgehenden Gefäßen ein möglichst langer Stumpf an der Aorta verblieb. Im abdominalen Bereich wurde die Aorta deswegen mit einigen Millimetern Abstand umschnitten. Im thorakalen Bereich wurden die Gefäße möglichst nahe der Wirbelsäule durchtrennt. Die so entnommene Aorta wurde in eine Zellkulturschale mit PBS überführt.

#### 5.1.4 Entfernung von anhaftendem Gewebe

Die entnommene Aorta musste von anhaftendem Gewebe (Bindegewebe, Nerven, Fettgewebe) befreit werden. Dies geschah unter einem Stereomikroskop mit Hilfe von mikrochirurgischem Besteck. Damit eine Aorta in die Perfusionskammer eingesetzt werden konnte, musste sie absolut dicht sein. Daher war es wichtig, dass bei der Präparation keine Löcher in der Aortenwand entstanden und dass alle Gefäßstümpfe an der Aorta verblieben, um später per Koagulation verschlossen werden zu können. Deshalb wurde das Gewebe anstatt mit einer Schere größtenteils mit Hilfe von Pinzetten entfernt, was das Risiko, versehentlich Löcher in die Aortenwand zu schneiden oder Gefäßstümpfe abzutrennen, deutlich verringerte. Jedoch musste die Präparation sehr vorsichtig erfolgen, um das empfindliche Endothel nicht durch Zug an der Aortenwand zu beschädigen und es damit in seiner Funktionalität zu beeinträchtigen.

Zunächst wurden große Gewebestücke (z.B. Zwerchfellreste, Bauchfett) vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Dann wurde die Aorta wie auf Abbildung 5.2 (a) gezeigt positioniert (oben im Bild: Aortenbogen, unten im Bild: abdominale Aorta). An beiden Seiten haftete in größerer Menge Fett- und Bindegewebe. In diesem Gewebe war dorsal an der Aorta (auf der Abbildung: rechts) der Großteil der Aortenabgänge eingebettet. Zentral auf der Aorta befand sich lediglich eine dünne, durchsichtige Schicht Bindegewebe und keine Gefäßabgänge.



### Abbildung 5.2: Gefäßpräparation.

(a) Aorta unmittelbar nach Entnahme. Seitlich haftet in größerer Menge Fettgewebe, zentral befindet sich ein schmaler Streifen mit dünnem, durchsichtigem Bindegewebe. (b) Aufschneiden der Bindegewebshülle entlang des fettfreien Streifens. (c) Die Hülle ist komplett aufgeschnitten, die Abgänge (an der rechten Seite) teilweise freigelegt. (d) Die Aorta ist vollständig von Gewebe befreit. Die Striche markieren die späteren Schnittstellen zum Abtrennen der Kontrollstücke kaudal der *A. subclavia sinistra* und kranial der *A. coeliaca*. (e) Verschluss der Abgänge durch Elektrokoagulation. (f) Vollständig präparierte Aorta. Alle Abgänge sind koaguliert und die Kontrollstücke abgetrennt.

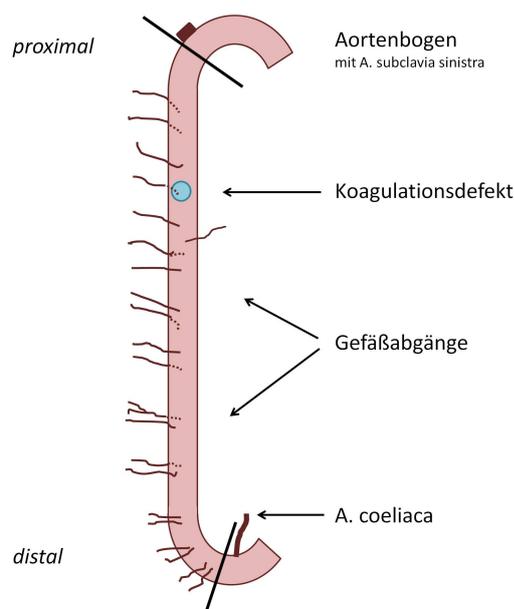
Maßbalken: Größenangabe geschätzt.

In diesem streifenförmigen Bereich wurde das Bindegewebe, welches die Aorta wie eine Hülle umgab, der gesamten Länge nach mit einer Mikroschere aufgeschnitten (Abbildung 5.2 (b)). Dann wurden die Aorta und die Abgänge mit Hilfe von zwei Mikropinzetten aus dem Gewebe befreit, indem die Aorta durch Greifen der Adventitia oder der Gefäßabgänge mit einer Pinzette fixiert wurde, während mit der anderen Pinzette vorsichtig das anhaftenden Gewebe abgezogen wurde (Abbildung 5.2 (c)). Mit dieser Technik wurde die Aorta vom mittleren Bereich ausgehend von Gewebe befreit, bis proximal der erste Gefäßabgang des Aortenbogens (*A. subclavia sinistra*) und distal der erste deutlich größere Gefäßabgang (*A.*

*coeliaca*) freigelegt waren. Ab hier wurde das Gewebe mit der mikrochirurgischen Schere abgeschnitten, da diese Bereiche nicht in die Kammer eingespannt wurden, weshalb die Gefäßabgänge abgetrennt werden konnten. Auf diese Weise wurde die Aorta weitestgehend von Gewebe befreit, sodass alle Abgänge freigelegt und deutlich sichtbar waren (Abbildung 5.2 (d)). Zuletzt wurden verbleibende feine Bindegewebsreste unter dem Binokular mit der Schere entfernt.

### 5.1.5 Erstellen einer Schemazeichnung

Da die Gefäßabgänge eine nicht unerhebliche individuelle Variabilität aufwiesen, wurde für jede entnommene Aorta eine Schemazeichnung angefertigt. Auf dieser wurden alle Gefäßabgänge (unter anderem Aa. intercostales, Aa. lumbales, A. coeliaca) und eventuelle Besonderheiten vermerkt. Ein Beispiel für solch eine Schemazeichnung zeigt Abbildung 5.3.



#### Abbildung 5.3: Schemazeichnung der Aorta zum Einsetzen.

In der Abbildung wird die Position der einzelnen Gefäßabgänge und eventuelle Beschädigungen der Aortenwand markiert. Der Bereich zwischen *A. subclavia sinistra* und *A. coeliaca* wird in die Kammer eingesetzt. Die proximalen und distalen Stücke dienen als Kontrollstücke.

### 5.1.6 Koagulation der Aortenabgänge

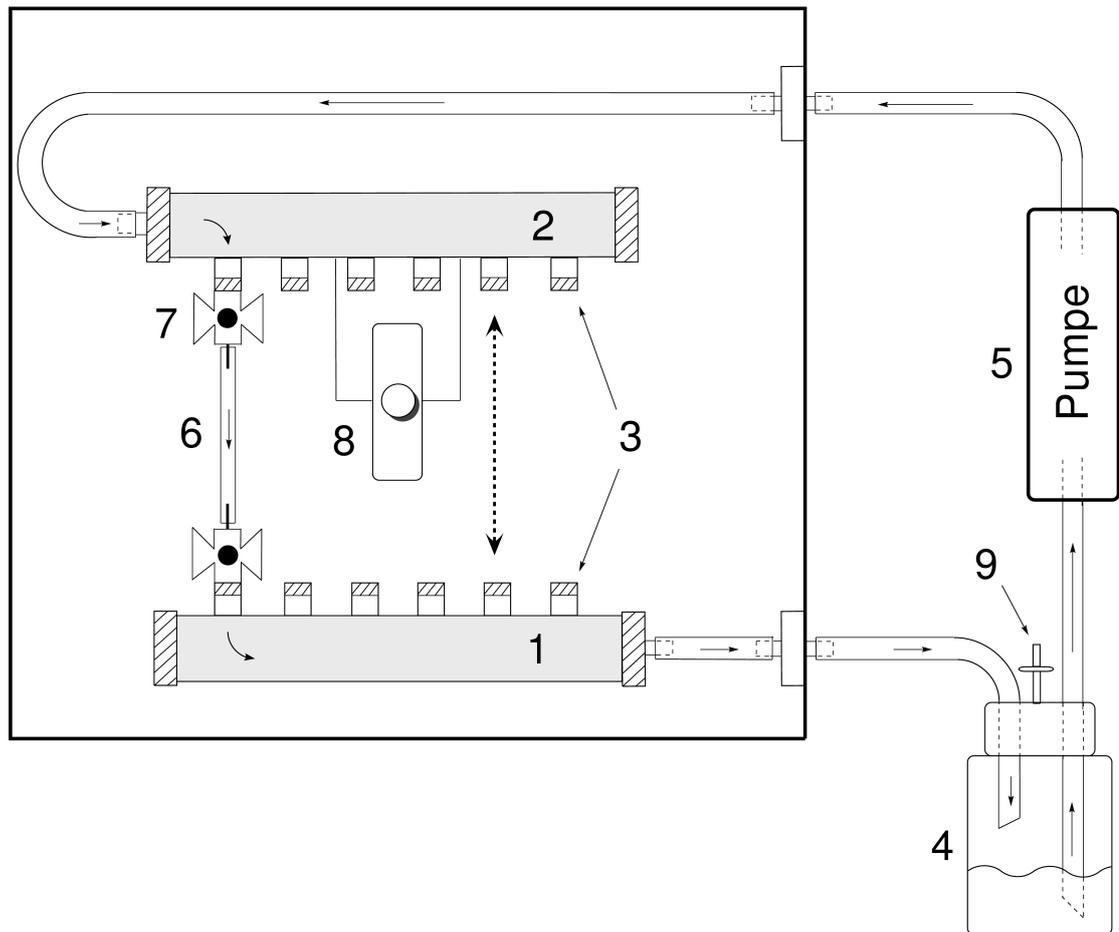
Um in der Perfusionskammer einen geschlossenen Kreislauf herzustellen, mussten sämtliche Gefäßabgänge der Aorten dicht verschlossen werden. Dies geschah unter dem Binokular mit Hilfe eines Hochfrequenz-Kauters und einer bipolaren Pinzette. Die Gefäßstümpfe wurden einzeln mit einer Mikropinzette gegriffen und mit der bipolaren Pinzette durch Koagulation des distalen Endes verschlossen (Abbildung 5.2 (e)). Kam es beim Koagulieren zu einer Beschädigung der Aortenwand, wurde dieser Koagulationsdefekt in der Schemazeichnung markiert, sodass betroffene Bereiche von der Analyse ausgeschlossen werden konnten.

Zuletzt wurde die Aorta auf die gewünschte Länge gekürzt (Abbildung 5.2 (f)). Proximal wurde der Aortenbogen unmittelbar hinter dem letzten großen Abgang (*A. subclavia sinistra*) abgetrennt. Vom ursprünglich Plan, auch einen Großteil der abdominalen Aorta in die Kammer einzuspannen, wurde abgesehen, da sich herausstellte, dass die Aorta nach Entnahme im abdominalen Bereich eine natürliche Krümmung von teilweise über 90 ° aufwies. Daher wurde der abdominale Teil der Aorta unmittelbar kranial der *A. coeliaca* abgetrennt. Die Aorten hatten danach eine Länge von durchschnittlich 3,8 cm. Die abgetrennten proximalen und distalen Stücke fanden als Kontrollstücke Verwendung. Ein Stück der proximalen Kontrollstücke wurde unmittelbar nach Entnahme zur Dekalzifizierung und anschließenden Kalziumbestimmung in HCl gegeben ( $K_0$ ), der Rest wurde bis zur weiteren Verwendung in eine Zellkulturschale mit sterilem Kontrollmedium überführt und in den Brutschrank (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) gestellt, ebenso die präparierten Aorten.

### 5.1.7 Perfusionskammer

Die Perfusionskammer wurde in Zusammenarbeit mit der hauseigenen Werkstatt entwickelt. Sie maß 26 × 26 cm bei einer Höhe von 5 cm. Sie bestand vollständig aus rostfreiem, autoklavierbarem V2A-Edelstahl, lediglich eine Schraube war nur mit Edelstahl beschichtet. Zur Reinigung ließ sich die Kammer größtenteils in ihre Einzelteile zerlegen. Der detaillierte Aufbau ist in Abbildung 5.4 dargestellt. In der Kammer befanden sich zwei Module (1, 2), zwischen welche bis zu sechs Aorten gespannt werden konnten. Mit Hilfe des beweglichen Moduls (2) konnte der Abstand der Module an die Länge der Aorten angepasst werden. Ungenutzte Zugänge wurden mit Schrauben verschlossen. Das Perfusionsmedium befand sich in einem externen Medium-Gefäß (4), welches über Schläuche mit der Kammer

verbunden war, sodass mit Einspannen der Aorten ein geschlossener Kreislauf entstand. Im Schlauchsystem befand sich ein Pumpenschlauch, welcher in eine peristaltische Pumpe (5) eingelegt wurde, die das Perfusionsmedium durch das Schlauchsystem pumpte. Durch pulsatilen Fluss wurden physiologische Umstände nachgeahmt. Im Deckel des Medium-Gefäßes befand sich eine mit einem Sterilfilter abgedeckte Öffnung zum Gasaustausch. Die Kammer wurde mit einem Deckel verschlossen (nicht auf der Abbildung). In diesem Deckel befanden sich ebenfalls vier Öffnungen zum Gasaustausch, welche mit Sterilfiltern abgedeckt wurden.



**Abbildung 5.4: Schematische Abbildung der Perfusionskammer.**

1: festes Modul. 2: bewegliches Modul. 3: Zugänge zum Einspannen der Aorten. 4: Medium-Gefäß mit Perfusionsmedium. 5: Pumpe. 6: eingespannte Aorta. 7: Venenkatheter. 8: bewegliche Plattform zur Anpassung des Abstands zwischen den beiden Modulen. 9: Öffnung mit Sterilfilter zum Gasaustausch. Die Kammer und das Medium-Gefäß sind über Schläuche miteinander verbunden.

### 5.1.8 Nährmedien

Es wurden ein Perfusionsmedium und ein äußeres Nährmedium benötigt. Die Auswahl der verwendeten Medien orientierte sich an Erfahrungen aus Zellkultur- und physiologischen Versuchen. Die Tyrode, welche als äußeres Nährmedium diente, führte in ihrer üblichen Zusammensetzung (wie beispielsweise im Modell der isoliert perfundierten Niere eingesetzt) nach einigen Tagen Inkubation zur Ausfällung von Salzen in der Kammer. Daher wurde ihre Zusammensetzung derart modifiziert, dass die Ablagerung von Kristallen zumindest deutlich verringert werden konnte. Die ausreichende Versorgung der isolierten Aorten mit Nährstoffen war durch die Perfusionsmedien dennoch sichergestellt.

Die beiden verwendeten Perfusionsmedien (Kontroll- und Kalzifizierungsmedium) entsprachen in ihrer Zusammensetzung den Medien, welche im Arbeitskreis routinemäßig in *in vitro*- und *ex vivo*-Kalzifizierungsversuchen eingesetzt wurden. Somit war gesichert, dass die verwendeten Medien prinzipiell den gewünschten Effekt auf die Aorten ausübten. Als Grundlage diente DMEM mit erhöhtem Glucosegehalt, dem Kalzifizierungsmedium wurde zur Induktion der Kalzifizierung eine Phosphatquelle und Ascorbinsäure hinzugefügt.

### 5.1.9 Versuchsaufbau

Obwohl in die Perfusionskammer bis zu sechs Aorten eingespannt werden konnten, zeigte sich in der Praxis, dass das Einsetzen von mehr als vier Aorten nicht praktikabel ist. In den ersten Versuchsdurchläufen wurde nur eine Aorta in die Kammer eingesetzt, mit steigender Zuverlässigkeit des Systems und zunehmender Präparationserfahrung wurde die Anzahl an eingesetzten Aorten auf vier Stück pro Versuch erhöht. Eine höhere Anzahl war aufgrund des zeitlichen Aufwands der Aortenpräparation und der Aufarbeitung nicht praktikabel.

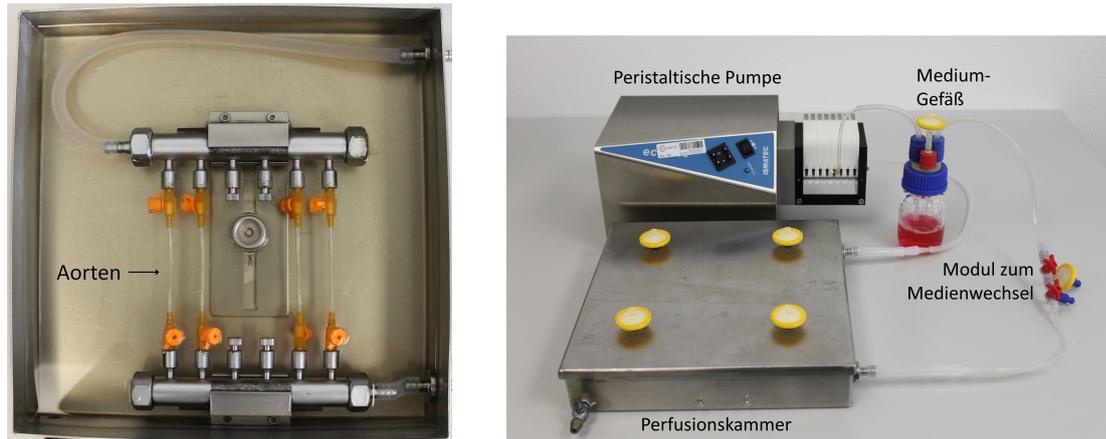
Der Aufbau des Systems erfolgte unter annähernd sterilen Bedingungen. Die Kammer und das benötigte Zubehör wurden vorab autoklaviert, die Tyrodelösung in eine autoklavierte Flasche steril filtriert und das Perfusionsmedium steril hergestellt. Die beiden Medien wurden im Wasserbad auf circa 37 °C erwärmt. Der Zusammenbau der Kammer und das Einsetzen der Aorten erfolgte in der Sterilbank. Diese wurde vorab gründlich mit Ethanol und Biozidal gereinigt und desinfiziert. Sämtliches benötigtes Zubehör wurde mit Ethanol desinfiziert bevor es in die Bank gelegt wurde. Steril verpackte Einwegmaterialien wurden steril in

der Bank ausgepackt. Die Person, die die Kammer zusammenbaute, trug einen sterilen OP-Kittel, OP-Haube, Mundschutz und sterile Handschuhe.

Der Zusammenbau erfolgte folgendermaßen: Alle (zum Säubern und Autoklavieren geöffneten) Schraubverschlüsse wurden geschlossen, nicht genutzte Aortenanschlüsse wurden ebenfalls verschlossen. Das Schlauchsystem inklusive der Einheit zum Medienwechsel (siehe Abschnitt 5.1.10) wurde zusammengesteckt, das Medium-Gefäß mit circa 75 ml Perfusionsmedium befüllt. Zum Einspannen der Aorten wurden pro Aorta zwei Venenkatheter (je nach Größe der Aorta 14 G oder 16 G) benötigt. Nach Entfernen des Stiletts wurden der Plastikschlauch auf circa 15 mm Länge gekürzt und die Venenkatheter auf zwei einander gegenüberliegende Anschlüsse geschraubt. Falls sich die Aorten deutlich in ihrer Länge unterscheiden, konnte dies über die Länge der Venenkatheter-Schläuche ausgeglichen werden, indem die Schläuche für kurze Aorten etwas länger gelassen, beziehungsweise Schläuche für längere Aorten stärker gekürzt wurden.

Die von der Kammer abgehenden Schläuche wurden mit Schlauchklemmen abgeklemmt um ein Eintreten von Tyrode in das Schlauchsystem durch die offenen Aortenanschlüsse zu verhindern. Danach wurde die Kammer mit knapp 2 l Tyrode befüllt. Um einem Verkeimen der Kammer entgegenzuwirken wurden 20 ml Pen/Strep (circa 1 %) hinzugefügt. Die Aorten wurden in die Kammer gegeben und mit zwei feinen Pinzetten circa 8 mm weit auf die Venenkatheterschläuche gezogen, sodass ein Teil des Schlauches frei blieb. Das proximale Ende der Aorten wurde am beweglichen Modul angeschlossen und die Pumpe so eingestellt, dass das Perfusionsmedium von proximal nach distal durch die Aorten floss, entsprechend den Fließverhältnissen im Körper. Abbildung 5.5 zeigt links die in die Kammer eingespannten Aorten.

Bei den ersten Versuchsdurchgängen mit mehreren Aorten pro Kammer zeigte sich beim Beenden des Versuches, dass immer nur eine der eingespannten Aorten perfundiert war. Ursache waren Luftblasen, die sich in den Aorten festsetzen und die Perfusion somit blockierten. Deshalb war es nötig, die Perfusion vor Beginn des Versuches zu überprüfen. Da das Öffnen der Kammer im Brutschrank zu einer bakteriellen Kontamination geführt hätte, musste die Überprüfung der Perfusion bereits unter der Sterilbank erfolgen. Zu diesem Zweck wurde die peristaltische Pumpe nach Zusammenbau der Kammer unter die Sterilbank geholt und angeschlossen. Da das Perfusionsmedium Phenolrot als pH-Indikator enthielt, war gut erkennbar welche der Aorten bereits perfundiert waren. Die Perfusion noch nicht



**Abbildung 5.5: Versuchsaufbau.**

*Links:* 4 Aorten sind über Venenkatheter in die Perfusionskammer eingespannt, 2 ungenutzte Zugänge sind mit Schrauben verschlossen. *Rechts:* Die Kammer ist über das Schlauchsystem mit dem Medium-Gefäß und der peristaltischen Pumpe verbunden. Im Schlauchsystem befindet sich das Modul zum Medienwechsel.

perfundierter Aorten wurde erzwungen, indem der Fluss durch die bereits perfundierten Aorten durch Abklemmen der jeweiligen Schlauchstücke mit einer Pinzette unterbrochen wurden, sodass das Perfusionsmedium stattdessen durch die noch nicht perfundierten Aorten floss.

Außerdem ließ sich zu diesem Zeitpunkt gut kontrollieren, ob die Aorten undichte Stellen aufwiesen. War dies der Fall, konnte man bei genauer Betrachtung sehen, wie das rötliche Perfusionsmedium in die farblose Tyrode austrat. Defekte Aorten mussten aus der Kammer genommen werden, um einen permanenten Verlust von Perfusionsmedium in die Tyrode zu verhindern. Wenn die betroffenen Stellen durch Koagulation verschlossen werden konnten, wurden die Aorten wieder in die Kammer eingesetzt. War dies nicht möglich, musste die Aorta aus dem Versuch genommen werden.

Wie sich nach einigen Versuchen zeigte, hatte die Kammer einen materiellen Schwachpunkt. Sie bestand fast vollständig aus rostfreien V2A-Edelstahl. Lediglich eine einzige Schraube (die Stellschraube, die benötigt wurde um den Abstand der beiden Module zu regulieren) war nur mit Edelstahl ummantelt. Es stellte sich heraus, dass Flüssigkeit im Kopf dieser Schraube zu Rostbildung führte. Bereits geringe Mengen an Rost in der Kammer verfälschten die Ergebnisse derart, dass schon ein kleiner Tropfen Tyrode im Kopf der Schraube dazu führte, dass die Aorten nicht mehr auswertbar waren. Daher war es sehr wichtig, Flüssigkeit,

die beim Zusammenbau in den Schraubenkopf gelangt war, wieder zu entfernen (beispielsweise durch Abpipettieren).

Nach Kontrolle der potentiellen Fehlerquellen wurde die Kammer verschlossen und die Öffnungen im Deckel mit Sterilfiltern (Porengröße 0,22  $\mu\text{m}$ ) abgedeckt. Die Kammer wurde in den Brutschrank gestellt und die Pumpe angeschlossen. Die gewählte Flussrate (Stufe 10 von 99) wurde zu Beginn der Versuchsreihe willkürlich gewählt. Abbildung 5.5 zeigt rechts den vollständig aufgebauten Versuch (zur Übersicht außerhalb des Brutschrankes gezeigt). Die Kontrollstücke wurden in Zellkulturflaschen oder -schalen mit Medium gegeben und ebenfalls in den Brutschrank gestellt. In Kontroll- bzw. Kalzifizierungsmedium inkubierten Kontrollstücke dienten als Negativ- bzw. Positivkontrollen. Die Inkubation in Tyrode sollte zeigen, ob die Tyrode einen Einfluss auf die Kalzifizierung hatte.

### 5.1.10 Versuchsablauf und Medienwechsel

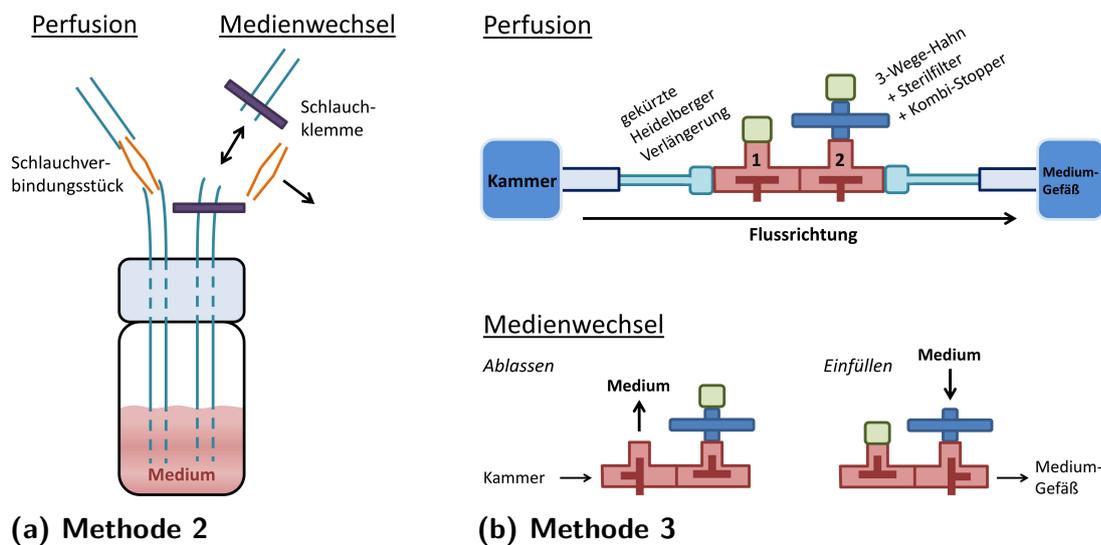
Die Perfusionsdauer im Brutschrank betrug 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. In regelmäßigen Abständen wurde das Perfusionsmedium gewechselt. Die Häufigkeit orientierte sich an Erfahrungen aus *in vitro*- und *ex vivo*-Versuchen. Zunächst wurde ein Abstand von 2 – 3 Tagen gewählt. Die regelmäßige Kontrolle des pH-Wertes zeigte jedoch, dass sich dieser kaum veränderte. Daher wurde der Abstand verlängert und lag beim Großteil der Versuche bei 4 – 5 Tagen.

Für den Medienwechsel wurden unterschiedliche Techniken erprobt, bis eine geeignete Methode gefunden war. Bei *Methode 1* wurde im Brutschrank das alte Medium-Gefäß gegen ein neues Medium-Gefäß mit frischem Perfusionsmedium ausgetauscht. Das in sich geschlossene sterile System wurde also für einen kurzen Moment geöffnet. Diese Methode führte zu einer bakteriellen Kontamination des Mediums und wurde daher nicht erneut durchgeführt. Für *Methode 2* wurde in das Schlauchsystem nahe des Medium-Gefäßes sowohl in den ein- als auch in den abgehenden Schlauch ein Schlauchverbindungsstück eingebaut (siehe Abbildung 5.6a). Zum Medienwechsel wurden die Schläuche beidseits der Verbindungsstücke abgeklemmt, die Verbindungen geöffnet, steril abgedeckt und das Gefäß unter der Sterilbank durch Umsetzen des Deckels gegen ein neues Gefäß mit frischem Perfusionsmedium ausgetauscht. Diese Methode funktionierte und wurde in einigen Versuchen angewandt. Da sie jedoch recht umständlich und zeitaufwändig war, wurde eine weitere Technik entwickelt.

Hierfür wurden beim Zusammenbau der Kammer zwei 3-Wege-Hähne in das

Schlauchsystem integriert, welche mit einem Kombi-Stopper (Hahn 1) bzw. einem Sterilfilter und einem Kombistopper (Hahn 2) verschlossen wurden (siehe Abbildung 5.6b). Die Verbindung zu den Schläuchen wurde mit Hilfe einer Heidelberger Verlängerung hergestellt. Um Medium abzulassen wurde auf Hahn 1 ein autoklaviertes Schlauchstück aufgesetzt, der Hahn geöffnet und so viel Medium abgelassen, bis das Medium-Gefäß fast leer war. Der Hahn wurde mit einem neuen Kombi-Stopper abgedeckt. Um Perfusionsmedium einzufüllen wurde frisches Medium steril in eine Spritze aufgezogen, die Pumpe gestoppt und Hahn 2 zum Medium-Gefäß hin geöffnet. Das Medium wurde durch den Sterilfilter in das System eingespritzt. Der Filter verblieb auf dem Hahn und wurde ebenfalls mit einem frischen Kombi-Stopper abgedeckt.

*Methode 3* funktionierte, war einfach und unkompliziert, schnell durchzuführen und wenig fehleranfällig. Daher wurde sie beibehalten und beim Großteil der Kammern angewandt.



**Abbildung 5.6: Methoden zum Medienwechsel.**

(a) *Methode 2:* Im Schlauchsystem sind Schlauchverbindungsstücke eingebaut. Diese werden zum Medienwechsel entfernt, sodass das Medium-Gefäß unter die Sterilbank genommen werden kann. (b) *Methode 3:* Im Schlauchsystem sind zwei 3-Wege-Hähne eingebaut, durch welche Medium abgelassen und eingespritzt werden kann.

### Auftretende Probleme während des Versuches

Wiederholt auftretende Probleme während der zweiwöchigen Versuchsdauer waren zum einen die mikrobielle Kontamination des Perfusionsmediums, zum anderen

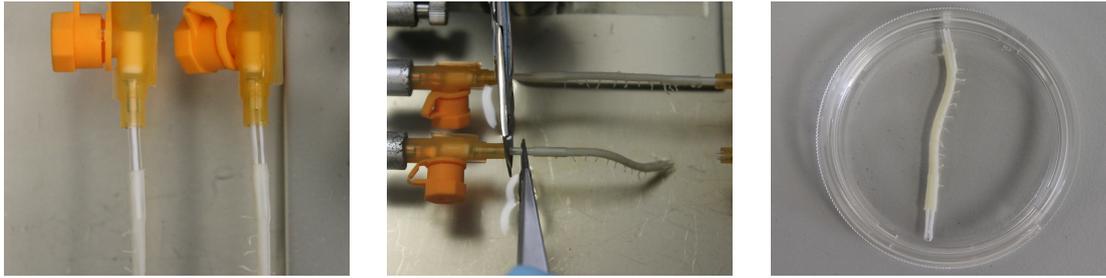
der Verlust von Perfusionsmedium. Ersteres führte zu einer sichtbaren Trübung des Perfusionsmediums. Betroffene Versuche wurden abgebrochen, die Aorten aus kontaminierten Kammern wurden nicht untersucht. Mögliche Ursachen waren die Öffnung des sterilen Systems im Brutschrank beim Medienwechsel (Methode 1) und eine Kontamination bereits beim Aufbau des Versuchs.

Ein sinkender Pegelstand im Medium-Gefäß wies auf einen Verlust von Perfusionsmedium hin. Eine Fehlerquelle war ein nicht korrekt in die Pumpe eingeleiteter Pumpenschlauch. Dies führte zu einer defekten Schlauchwand und folglich zum Austritt von Perfusionsmedium in den Brutschrank. Defekte Schläuche wurden ausgetauscht. Weitere Schwachstellen lagen im Inneren der Kammer. Eine mögliche Ursache für den Verlust von Perfusionsmedium in die Tyrode war eine vom Venenkatheter gerutschte Aorta. Die betroffene Aorta wurde wieder auf den Schlauch gezogen. Das Problem trat vor allem dann auf, wenn die Spendertiere über 450 g wogen und konnte durch Verwendung von Tieren mit einem Gewicht von etwa 400 g verringert werden. Zum anderen führten nicht vollständig koagulierte Aortenabgänge oder Löcher in der Aortenwand zum Verlust von Perfusionsmedium. Aorten mit undichten Abgängen wurden aus der Kammer entnommen, nochmals koaguliert und wieder in die Kammer eingesetzt. Löcher in der Aortenwand konnten durch Koagulation nicht verschlossen werden, sodass betroffene Aorten aus dem Versuch entfernt werden mussten.

Falls die Kammer vorübergehend trockengelassen war, sodass sich kein Medium mehr im Medium-Glas befand, wurde dies notiert, der Versuch aber regulär beendet und die Aorten untersucht. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigten die betroffenen Kammern keine Auffälligkeiten, sodass ein Einfluss auf die Kalzifizierung unwahrscheinlich erscheint.

### 5.1.11 Versuchsende

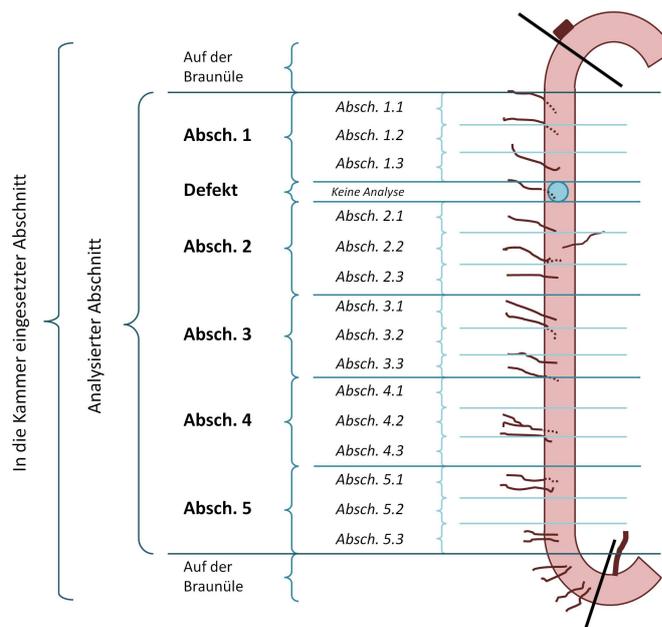
Die Versuchsdauer betrug in Anlehnung an *ex vivo*-Versuche 14 Tage. Die Aorten wurden durch Abschneiden der Venenkatheterschläuche aus der Kammer entnommen und in Zellkulturschalen überführt (siehe Abbildung 5.7). Der auf die Venenkatheter aufgezogene Bereich wurde nicht analysiert. Der restliche, zur Untersuchung verfügbare Bereich hatte eine durchschnittliche Länge von 2,5 cm. Die Aorten wurden mit einem Skalpell in Ringe geschnitten, wobei jede Aorta in 5 Abschnitte mit je 3 Unterabschnitten geteilt wurde. Dadurch ergaben sich circa 1 – 2 mm breite Ringe. In der zum Einsetzen angefertigten Schemazeichnung (Ab-



**Abbildung 5.7: Versuchsende.**

*Links:* In die Kammer eingespannte Aorten. *Mitte:* Entnahme der Aorten aus der Kammer durch Abschneiden der Schläuche. *Rechts:* Aorta nach 2 Wochen Perfusion.

bildung 5.3) wurden die genauen Schnittstellen markiert (siehe Abbildung 5.8). Beschädigte Wandbereiche wurden entsprechend gekennzeichnet oder nicht analysiert. Unterabschnitt X.1 wurde zur Dekalzifizierung in HCl (0,6 M) gegeben, Unterabschnitt X.2 wurde für die histologische Analyse formalinfixiert und Unterabschnitt X.3 in flüssigem Stickstoff fixiert und für spätere Untersuchungen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert.



**Abbildung 5.8: Schemazeichnung der Aorta zur Aufarbeitung**

Die Aorta wird in 5 Abschnitte mit je 3 Unterabschnitten aufgeteilt. Die Schnittstellen werden in der Schemazeichnung markiert. Unterabschnitt X.1: Bestimmung des Kalziumgehaltes. Unterabschnitt X.2: Histologische Analyse. Unterabschnitt X.3: Kryo-Konservierung.

## 5.2 Durchgeführte Versuche

Insgesamt wurden 17 Kammern gestartet (siehe Anhang, Tabelle 10.1). 5 Kammern mussten vorzeitig abgebrochen werden, sodass 12 Kammern beendet wurden. In diesen Kammern befanden sich insgesamt 36 Aorten. 5 der beendeten Kammern waren fehlerbehaftet, außerdem 6 einzelne Aorten aus fehlerfreien Kammern (insgesamt 15 Aorten), sodass letztendlich valide Ergebnisse von 21 Aorten aus 7 Kammern vorlagen.

### 5.2.1 Abgebrochene Versuche

Fünf Kammern mussten aus unterschiedlichen Gründen vorzeitig abgebrochen werden (IPA<sub>A1</sub>–IPA<sub>A5</sub>. Siehe Anhang, Tabelle 10.2). Kammer IPA<sub>A1</sub> wurde aufgrund eines technischen Problems mit dem Brutschrank abgebrochen. Kammer IPA<sub>A2</sub> musste aufgrund von bakterieller Kontamination abgebrochen werden: Drei Tage nach dem Medienwechsel (Methode 1) zeigte das Perfusionsmedium makroskopisch eine deutliche Trübung, mikroskopisch wurden sowohl im Perfusionsmedium als auch in der Tyrode Bakterien nachgewiesen. Da die Kammer zum Zeitpunkt des Medienwechsels bereits drei Tage ohne Anzeichen für eine Kontamination lief, ist anzunehmen, dass die Keime beim Medienwechsel eingetragen wurden. Daher wurde die Technik für den Medienwechsel geändert. Kammer IPA<sub>A3</sub> wurde nach fünf Tagen ebenfalls wegen bakterieller Kontamination abgebrochen. Diese wurde vermutlich bereits beim Ansetzen der Kammer verursacht.

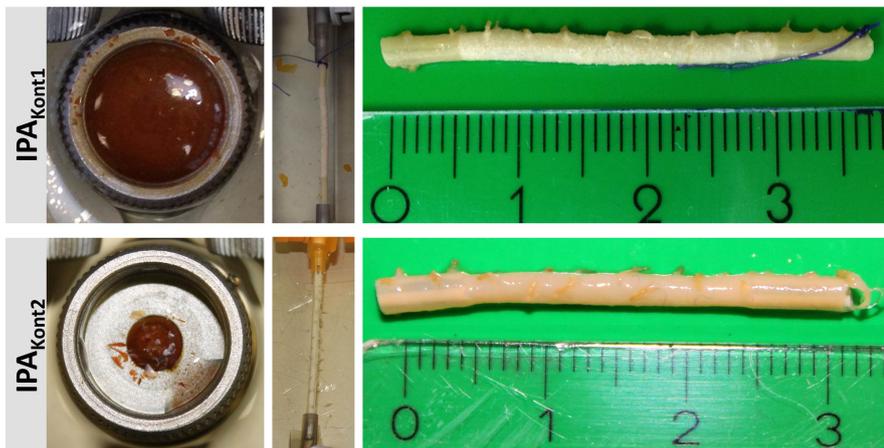
Kammer IPA<sub>A4</sub> wurde abgebrochen, da sie über Nacht trockengelaufen war (Medium-Gefäß leer, kein Perfusionsmedium in den Schläuchen). Beim Öffnen der Kammer zeigte sich, dass ein Aortenabgang nicht koaguliert war, sodass das Perfusionsmedium durch den offenen Abgang in die Tyrode floss. Auch Kammer IPA<sub>A5</sub> wurde wegen Verlust von Perfusionsmedium abgebrochen, welcher nach fünf Tagen plötzlich einsetzte. Ursache hierfür war eine vom Venenkatheterschlauch gerutschte Aorta, wodurch das Perfusionsmedium in die Tyrode gepumpt wurde.

### 5.2.2 Beendete Kontrollkammern

Es wurden 6 mit Kontrollmedium perfundierte Kammern (IPA<sub>Kont1</sub>–IPA<sub>Kont6</sub>) mit insgesamt 19 Aorten beendet (siehe Anhang, Tabelle 10.4). Jedoch waren sowohl ganze Kammern als auch einzelne Aorten fehlerbehaftet.

3 der Kammern (IPA<sub>Kont1</sub>–IPA<sub>Kont3</sub>) zeigten nach Beenden des Versuchs die glei-

chen Auffälligkeiten in unterschiedlicher Ausprägung (siehe Abbildung 5.9). Bei allen 3 Kammern befand sich rostrot gefärbte Flüssigkeit im Kopf der Stellschraube, in  $IPA_{Kont1}$  und  $IPA_{Kont2}$  war die Tyrode leicht orange verfärbt und in  $IPA_{Kont1}$  zusätzlich mit orangenen Schlieren bedeckt. Von der Flüssigkeit im Schraubenkopf wurden Proben genommen, abzentrifugiert und das Sediment mikroskopisch untersucht. Es stellte sich als fein-grisselige, unregelmäßige Struktur von rostrot/orangener Farbe dar. Dieses Bild, im Zusammenhang mit der Lokalisation des Herdes im Schraubenkopf (die Schraube ist das einzige Bauteil der Kammer, welches lediglich mit Edelstahl beschichtet ist) legte die Vermutung nahe, dass es sich um Rost handelte. In den 2 stärker betroffenen Kammern  $IPA_{Kont1}$  und  $IPA_{Kont2}$  waren auch die Aorten makroskopisch sichtbar verändert. Ihre Wand wirkte verdickt und die Aorten insgesamt steif. Ihre Oberflächenstruktur war aufgeraut und teilweise wie mit einem weißen Vlies bedeckt. Die gesamten Aorten, insbesondere die Gefäßabgänge, zeigten eine leicht orangene Färbung. Da der Rost in den durchgeführten Analysen zum Kalziumnachweis mit den Kalziumionen interferierte, wurden die mit Rost belasteten Kammern als fehlerhaft definiert und aus der Bewertung genommen. Die Kammern werden im Folgenden "korrodierte Kammern" genannt. Des Weiteren kam es vor, dass nicht alle in die Kammer eingespannten Aorten perfundiert waren. Nicht perfundierte Aorten wurden ebenfalls als fehlerhaft definiert und nicht ausgewertet. Nach Ausschluss aller fehlerhaften Aorten blieben 9 Aorten aus 3 Kontrollkammern zur Auswertung übrig.



**Abbildung 5.9: Korrodierte Kammern.**

*Oben:  $IPA_{Kont1}$ .* In der Stellschraube befindet sich in großer Menge rostrote Flüssigkeit, auf der leicht orange gefärbten Tyrode schwimmen orangene Schlieren, die Oberfläche der Aorten ist pelzig. *Unten:  $IPA_{Kont2}$ .* In der Stellschraube befindet sich in mittlerer Menge rostrote Flüssigkeit, die Tyrode ist leicht orange gefärbt, die Aorten sind orange verfärbt.

### 5.2.3 Beendete Kalzifizierungskammern

Es wurden 6 Kalzifizierungskammern ( $IPA_{\text{Kalz1}} - IPA_{\text{Kalz6}}$ ) mit 17 Aorten gestartet (siehe Anhang, Tabelle 10.5).  $IPA_{\text{Kalz1}}$  und  $IPA_{\text{Kalz2}}$  mussten wegen Rost-Bildung aus der Auswertung genommen werden, ebenso 3 einzelne Aorten wegen fehlender Perfusion, sodass 12 Aorten aus 4 Kalzifizierungskammern zur Auswertung zur Verfügung standen.  $IPA_{\text{Kalz6}}$  verlor in geringer Menge Perfusionsmedium in die Tyrode, das Leck konnte jedoch nicht gefunden werden. Da der Verlust gering war, wurde der Versuch nicht abgebrochen sondern regelmäßig Perfusionsmedium nachgefüllt. Bis Tag 7 waren ca. 70 ml Perfusionsmedium in die Tyrode ausgetreten. Um eine zu hohe Konzentration von kalzifizierendem Perfusionsmedium im äußeren Nährmedium zu verhindern, wurde die Tyrode abgesaugt und die Kammer mit frischer Tyrode befüllt. Bis zur Beendigung des Versuchs an Tag 14 traten erneut ca. 30 ml Perfusionsmedium aus.

### 5.2.4 Kontrollstücke

Von jeder Aorta wurden Kontrollstücke (K) genommen, und zwar sowohl von proximal ( $K_{\text{prox}}$ ), als auch von distal ( $K_{\text{dist}}$ ) des in die Kammer eingespannten Aortenbereichs. Ein Abschnitt des kranialen Kontrollstücks wurde unmittelbar nach Entnahme hinsichtlich seines Kalziumgehaltes analysiert ( $K_0$ ), die anderen Stücke wurden für 14 Tage in Tyrode ( $K_T$ ), in Kontrollmedium ( $K_{\text{Kont}}$ ) oder in Kalzifizierungsmedium ( $K_{\text{Kalz}}$ ) inkubiert (siehe Anhang, Tabelle 10.3).

## 5.3 Versuchsergebnisse

Die Kalzifizierung der IPAs und der proximalen und distalen Kontrollstücke wurde sowohl quantitativ als auch histologisch, die der  $K_0$ -Stücke lediglich quantitativ untersucht. Die 5 Aortenabschnitte und die Kontrollstücke wurden einzeln analysiert. Die quantitative Bestimmung des Kalziumgehaltes erfolgte mittels photometrischer Messung des Ca-o-Kresolphthalein-Komplexes. Der gemessene absolute Kalziumgehalt wurde auf das Trockengewicht der Aortenringe normiert, um die Ergebnisse in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht zu erhalten. Zur histologischen Analyse wurden histologische Präparate mit etwa 6 Aortenringen pro Objektträger angefertigt. Von jedem Abschnitt wurde ein Objektträger HE, einer Alizarin-Rot und einer von Kossa gefärbt, sodass pro IPA ca. 30 Aortenringe je Färbung vorlagen (1 Aorta à 5 Abschnitte à 6 Ringe = 30 Ringe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test, ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

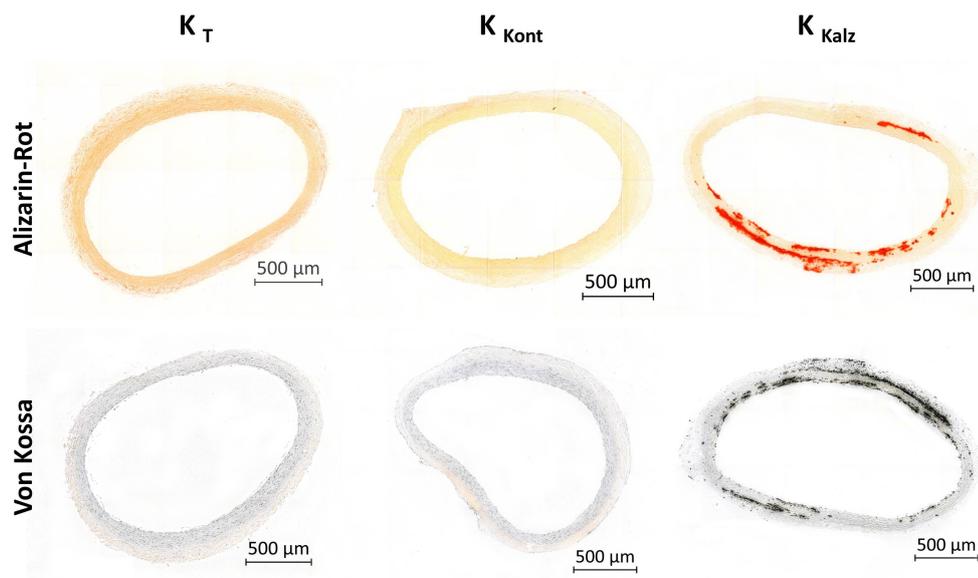
### 5.3.1 Ergebnisse der Kontrollstücke

Die Induktion einer medialen Kalzifizierung *in vitro* und *ex vivo* ist in der Literatur hinreichend beschrieben. Um diese Ergebnisse zu reproduzieren und um den Einfluss der verwendeten Medien auf die Kalzifizierung der Aorten zu überprüfen, wurden Teile der Aorten als Kontrollstücke (K) für 14 Tage in unterschiedlichen Medien inkubiert ( $K_T$  in Tyrode,  $K_{Kont}$  in Kontrollmedium,  $K_{Kalz}$  in Kalzifizierungsmedium). Die Ergebnisse der quantitativen Kalziumbestimmung (Tabelle 5.1) wurden miteinander und mit den Werten nicht inkubierter Kontrollen ( $K_0$ ) verglichen. Die Werte von in Kontrollmedium inkubierten Ringen ( $0,86 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) zeigten keine signifikante Differenz zu Werten von nicht inkubierten Ringen ( $0,58 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). Die Werte von in Tyrode inkubierten Ringen ( $0,24 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) waren niedriger als die von  $K_0$  und  $K_{Kont}$ . Dagegen war der Kalziumgehalt von in Kalzifizierungsmedium inkubierten Ringen ( $76,49 \pm 14,97 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) höher als der der  $K_{Kont}$  und der  $K_0$ . Der Mittelwert der distalen Stücke ( $93,12 \pm 11,39 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) lag dabei höher als der der proximalen Stücke ( $59,86 \pm 19,94 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), die Differenz war jedoch nicht signifikant. Histologisch fiel auf, dass sich das eingelagerte Kalzium in den  $K_{Kalz}$  an einer Stelle des Aortenrings konzentrierte, wo es diffus in der gesamten Wand verteilt war (siehe Abbildung 5.10).

**Tabelle 5.1: Kalziumgehalt der Kontrollstücke.**

Nach 14 Tagen Inkubation in Tyrode ( $K_T$ ), Kontrollmedium ( $K_{Kont}$ ), Kalzifizierungsmedium ( $K_{Kalz}$ ), bzw. ohne Inkubation ( $K_0$ ). Angaben in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht.

	$K_0$ $n=21$	$K_T$ $n=11$	$K_{Kont}$ $n=9$	$K_{Kalz}$ $n=11$
$K_{prox}$	$0,52 \pm 0,12$	$0,37 \pm 0,20$	$0,81 \pm 0,34$	$59,86 \pm 19,94$
$K_{dist}$	$0,64 \pm 0,12$	$0,10 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,21$	$93,12 \pm 11,39$
$\emptyset$	$0,58 \pm 0,10$	$0,24 \pm 0,10$	$0,86 \pm 0,24$	$76,49 \pm 14,97$

**Abbildung 5.10: Histologischer Kalziumnachweis in den Kontrollstücken.**

Kein Nachweis von Kalzium in Aortenringen, welche für 14 Tage in Tyrode ( $K_T$ ) oder Kontrollmedium ( $K_{Kont}$ ) inkubiert wurden. Deutliche Färbung und damit Nachweis von Kalzium in Aortenringen, welche für 14 Tage in Kalzifizierungsmedium ( $K_{Kalz}$ ) inkubiert wurden. Das Kalzium ist diffus und unregelmäßig in allen Wandschichten verteilt. Abgebildet sind die distalen Kontrollstücke, die proximalen Kontrollen zeigen die gleichen Ergebnisse.

### 5.3.2 Ergebnisse der fehlerhaften Kammern

#### Aorten aus korrodierten Kammern

Die Analyse der Aorten aus korrodierten Kammern ergab bei allen perfundierten Aorten einen sehr hohen Kalziumgehalt von  $18,79 \pm 2,41 \mu\text{m}/\text{mg}$  (Mittlerer Wert aller Aorten aus korrodierten Kontroll- und Kalzifizierungskammern). Die Werte waren höher als die Werte fehlerfreier Aorten (Mittlerer Wert aller fehlerfreien Aorten aus Kontroll- und Kalzifizierungskammern:  $3,24 \pm 0,25 \mu\text{m}/\text{mg}$ ). Die Differenz blieb bestehen, wenn man Aorten aus Kontroll- und Kalzifizierungskammern getrennt betrachtete (siehe Tabelle 5.2), für eine statistische Aussage war die Anzahl der Proben jedoch zu gering. Die histologischen Präparate der Aorten aus korrodierten Kammern zeigten in den Färbungen zum Kalziumnachweis eine starke Anfärbung (Abbildung 5.11, Mitte). Diese beschränkte sich auf die äußeren Wandschichten, insbesondere auf die äußere Schicht der Media, wo sie sich als kräftiger, durchgängiger Ring darstellte, sowie teilweise auf die Adventitia und das anhaftende Bindegewebe.

**Tabelle 5.2: Kalziumgehalt der Aorten aus korrodierten Kammern.**

Vergleich der Kalziumwerte von perfundierten Aorten aus korrodierten Kontroll- und Kalzifizierungskammern mit fehlerfreien Aorten. Angaben in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht.

	$\text{IPA}_{\text{Kont}}$	$\text{IPA}_{\text{Kalz}}$	$\emptyset$
korrodierte Kammern	$17,29 \pm 3,04, n=4$	$22,13 \pm 3,57, n=2$	$18,79 \pm 2,41, n=6$
fehlerfreie Aorten	$1,62 \pm 0,23, n=9$	$4,42 \pm 0,32, n=12$	$3,24 \pm 0,25, n=21$

#### Nicht perfundierte Aorten

Die Analyse der nicht perfundierten Aorten ergab bei allen Aorten einen sehr niedrigen Kalziumgehalt von  $1,55 \pm 0,40 \mu\text{m}/\text{mg}$  (Mittlere Wert aller nicht-perfundierten Aorten aus Kontroll- und Kalzifizierungskammern). Die Werte waren niedriger als die Werte perfundierter Aorten aus denselben Kammern (Mittlerer Wert der perfundierten Aorten aus den betroffenen Kontroll- und Kalzifizierungskammern:  $7,45 \pm 1,55 \mu\text{m}/\text{mg}$ ). Die Differenz blieb bestehen wenn man Aorten aus Kontroll- und Kalzifizierungskammern getrennt betrachtete (siehe Tabelle 5.3), für eine statistische Aussage war die Anzahl der Proben jedoch zu gering. In korrodierten Kammern war die Differenz zwischen perfundierten und nicht perfundierten Aorten ebenfalls deutlich, weshalb die Werte von Aorten aus korrodierten

Kammern miteinbezogen wurden. Die Werte der Kontrollkammern lagen über den Werten der Kalzifizierungskammern, da zwei der Kontrollkammern, jedoch keine der Kalzifizierungskammern von Rost betroffen waren.

Histologisch zeigten die nicht perfundierten Aorten keinerlei mediale oder adventitielle Anfärbung, weder in den fehlerfreien, noch in den korrodierten Kammern. 3 Aorten (aus 2 verschiedenen Kammern) der insgesamt 6 nicht perfundierten Aorten (aus 4 verschiedenen Kammern) zeigten eine fokale intimale Färbung (Abbildung 5.11, rechts). Bei der Ausbildung dieser Färbung schien weder das Perfusionsmedium, noch die Rostbildung eine Rolle zu spielen.

**Tabelle 5.3: Kalziumgehalt der nicht perfundierten Aorten.**

Vergleich der Kalziumwerte von nicht perfundierten Aorten aus Kontroll- und Kalzifizierungskammern mit perfundierten Aorten aus denselben Kammern. Korrodierte Kammern wurden miteinbezogen. Angaben in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht.

	$\text{IPA}_{\text{Kont}}$	$\text{IPA}_{\text{Kalz}}$	$\emptyset$
nicht perfundierte Aorten	$1,64 \pm 0,53, n=5$	$1,32 \pm 0,34, n=2$	$1,55 \pm 0,40, n=7$
perfundierte Aorten	$13,25 \pm 3,60, n=4$	$3,78 \pm 0,27, n=6$	$7,45 \pm 1,55, n=10$

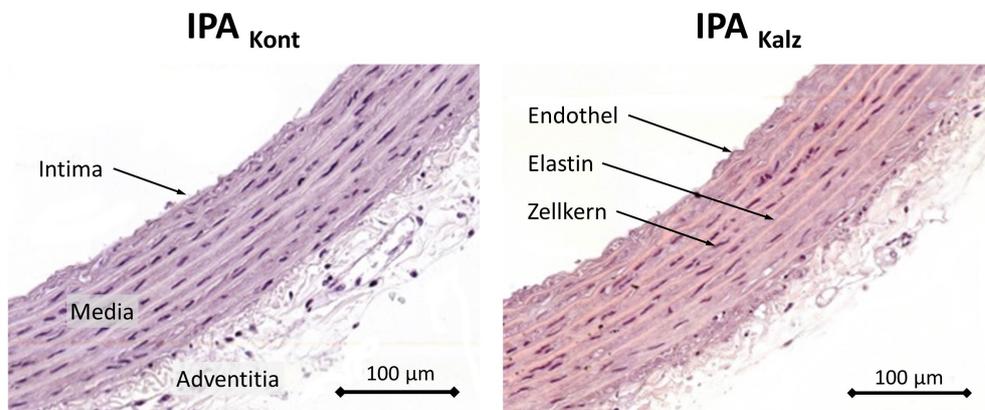


**Abbildung 5.11: Histologischer Kalziumnachweis in fehlerhaften Aorten.**

Aorten aus korrodierten Kammern zeigen eine kräftige Anfärbung, insbesondere der äußeren Wandschichten. Nicht perfundierte Aorten zeigen teilweise eine fokale intimale Anfärbung.

### 5.3.3 HE-Färbung der IPAs

Um den Zustand der Gefäße nach 14 Tagen Perfusion beurteilen zu können, wurden HE-Färbungen angefertigt (siehe Abbildung 5.12). Diese zeigten sowohl in Kontrollaorten als auch in kalzifizierten Aorten eine vitale Gefäßwand, die Perfusion schien die Wandstruktur nicht sichtbar zu verändern. Die Media zeigte ihre physiologische Struktur: Die Elastinlamellen waren parallel angeordnet, die Zellkerne stellten sich typisch spindelförmig dar. Das Endothel war deutlich zu erkennen und klar zur Media hin abgrenzbar. Es erschien weitestgehend durchgängig. Da es sich bei der HE-Färbung um keine endothelspezifische Färbung handelt, wäre zur weiteren Abklärung eine gezielte Darstellung des Endothels sinnvoll, beispielsweise immunhistologisch mittels endothelspezifischer Marker wie CD31 oder von-Willebrand-Faktor.



**Abbildung 5.12: HE-Färbung der IPAs.**

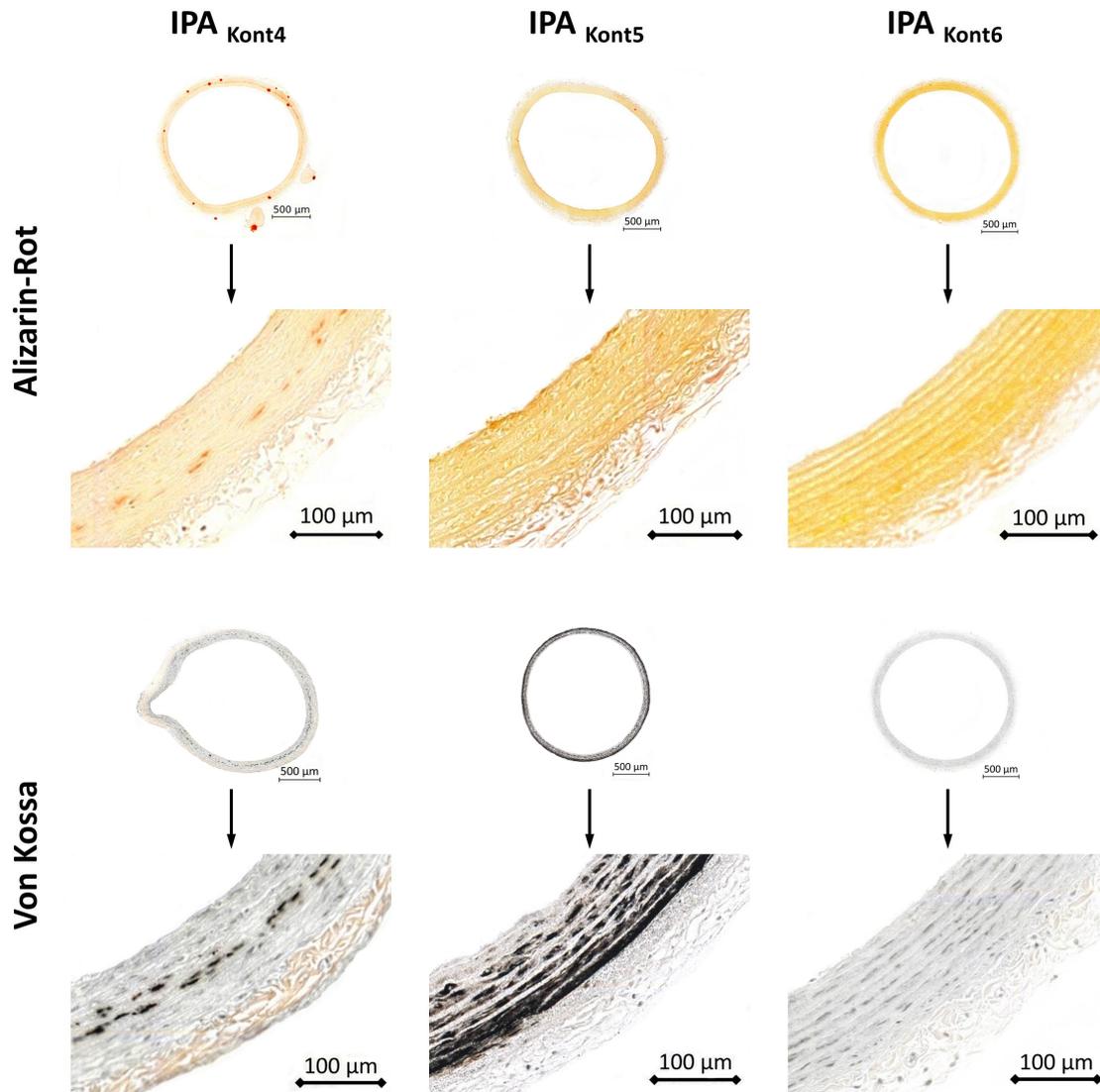
Die HE-Bilder der IPAs zeigen eine vitale Gefäßwand mit deutlicher Abgrenzung der Schichten, sowohl in Kontrollaorten als auch in kalzifizierten Aorten. Das Endothel ist intakt, die Elastinfasern parallel angeordnet und die Zellkerne zeigen ihre typische Form.

### 5.3.4 Ergebnisse der Kontrollkammern

Zur Bewertung standen 9 Aorten aus 3 verschiedenen Kammern (IPA<sub>Kont4-6</sub>) zur Verfügung. Tabelle 5.4 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Kalziumbestimmung. Der Kalziumgehalt lag zwischen 0,25 µg/mg und 5,25 µg/mg Trockengewicht. Der Mittelwert lag bei  $1,68 \pm 0,48$  µg/mg. Dabei unterschied sich der durchschnittliche Gehalt der verschiedenen Abschnitte nicht signifikant (rechte Spalte). Die Mittelwerte von IPA<sub>Kont4</sub> ( $1,24 \pm 0,18$  µg/mg) und IPA<sub>Kont6</sub> ( $0,71 \pm 0,13$  µg/mg) lagen in einem ähnlichen Bereich, wohingegen die Werte von

IPA<sub>Kont5</sub> ( $4,28 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) etwas höher lagen. Beim Vergleich der Ergebnisse von Kontrollkammern mit Ergebnissen von in Kontrollmedium inkubierten Kontrollstücken zeigte sich, dass die Werte der Kontrollkammern ( $1,62 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) etwas höher waren, als die der Kontrollstücke ( $0,86 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), die Differenz war jedoch nicht signifikant. Außerdem verringerte sich die Differenz deutlich, wenn man anstelle der Durchschnitte die Mediane miteinander verglich (IPA<sub>Kont</sub>:  $0,95 \mu\text{g}/\text{mg}$ ; K<sub>Kont</sub>:  $0,68 \mu\text{g}/\text{mg}$ ).

Die Ergebnisse der histologischen Analyse (Abbildung 5.13) deckten sich nur teilweise mit den Ergebnissen der quantitativen Kalziumbestimmung. IPA<sub>Kont4</sub> zeigte in beiden Färbungen zum Kalziumnachweis eine schwache, aber dennoch deutlich sichtbare mediale Anfärbung. IPA<sub>Kont5</sub> zeigte in der Alizarin-Rot-Färbung keine, in der von Kossa-Färbung dagegen eine deutliche Anfärbung. Diese war nicht auf eine Wandschicht beschränkt, sondern verteilte sich diffus in der gesamten Wand, wobei die äußeren Schichten besonders kräftig anfärbten. IPA<sub>Kont6</sub> zeigte keinerlei Anfärbung, weder in der Alizarin-Rot-, noch in der von Kossa-Färbung.



**Abbildung 5.13: Histologischer Kalziumnachweis in IPAs aus Kontrollkammern.**

*IPA<sub>Kont4</sub>*: Alizarin-Rot – schwache mediale Färbung (plus Färbeartefakte in der Übersicht).  
 Von Kossa – schwache mediale Färbung.

*IPA<sub>Kont5</sub>*: Alizarin-Rot – keine Färbung. Von Kossa – Färbung der ganzen Wand.

*IPA<sub>Kont6</sub>*: Alizarin-Rot – keine Färbung. Von Kossa – keine Färbung.

**Tabelle 5.4:** Kalziumgehalt der  $\text{IPA}_{\text{Kont}}$ , Angaben in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht.

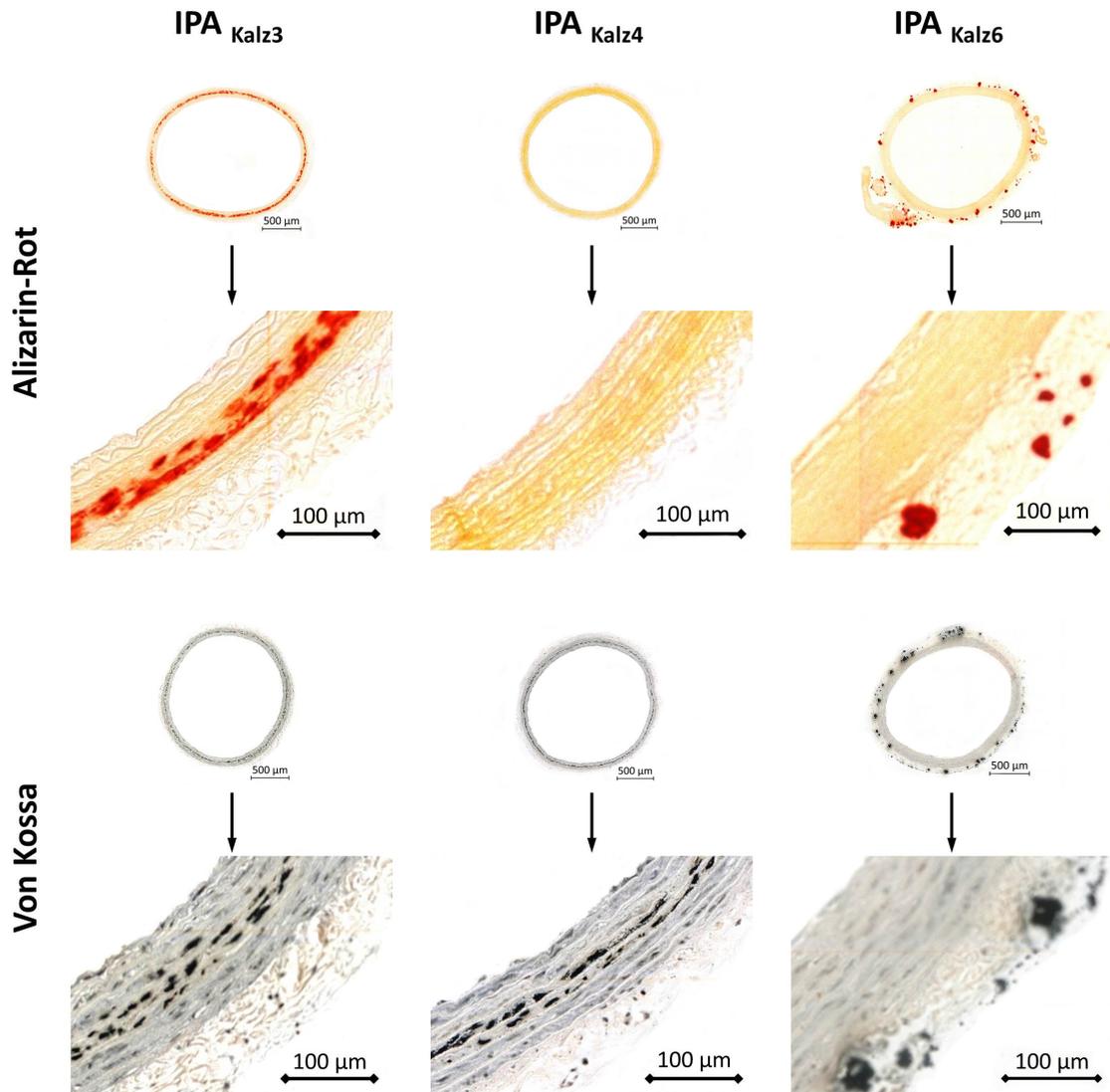
Kammer	$\text{IPA}_{\text{Kont4}}$			$\text{IPA}_{\text{Kont5}}$		$\text{IPA}_{\text{Kont6}}$				$\emptyset$
	1	3	4	1	4	1	2	3	4	
Aorta										
Abschnitt 1	0,95	2,60	0,57	3,93	4,80	0,30	0,25	1,87	0,38	<b>1,74</b> $\pm 0,53$
Abschnitt 2	0,96	1,58	0,48	3,38	4,08	0,34	0,32	0,33	0,28	<b>1,31</b> $\pm 0,46$
Abschnitt 3	1,35	1,87	0,58	5,25	3,20	0,28	0,37	2,36	0,33	<b>1,73</b> $\pm 0,53$
Abschnitt 4	1,13	1,17	0,59	4,31	4,91	0,33	1,90	0,62	0,45	<b>1,71</b> $\pm 0,54$
Abschnitt 5	1,90	0,83	1,98	–	4,69	1,94	0,33	0,57	0,66	<b>1,61</b> $\pm 0,47$
$\emptyset$	<b>1,26</b> $\pm 0,16$	<b>1,61</b> $\pm 0,27$	<b>0,84</b> $\pm 0,26$	<b>4,22</b> $\pm 0,34$	<b>4,34</b> $\pm 0,28$	<b>0,64</b> $\pm 0,29$	<b>0,63</b> $\pm 0,28$	<b>1,15</b> $\pm 0,36$	<b>0,42</b> $\pm 0,06$	<b>1,68</b> $\pm 0,48$
$\emptyset$	1,24 $\pm 0,18$			4,28 $\pm 0,04$		0,71 $\pm 0,13$				

### 5.3.5 Ergebnisse der Kalzifizierungskammern

Zur Bewertung standen 12 Aorten aus 4 Kammern (IPA<sub>Kalz3-6</sub>) zur Verfügung. Tabelle 5.5 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Kalziumbestimmung. Der Kalziumgehalt lag zwischen 0,74 µg/mg und 17,78 µg/mg Trockengewicht. Der Mittelwert lag bei  $4,42 \pm 0,48$  µg/mg. Die Werte der kranialen Abschnitte waren geringfügig höher als die der distalen Abschnitte, die Differenz war jedoch nicht signifikant. Die Mittelwerte der Kammern lagen zwischen 3,14 µg/mg (IPA<sub>Kont5</sub>) und 6,72 µg/mg (IPA<sub>Kont4</sub>). Beim Vergleich der Ergebnisse der Kalzifizierungskammern mit den Ergebnissen von in Kalzifizierungsmedium inkubierten Kontrollstücken zeigte sich, dass die Werte der Kalzifizierungskammern ( $4,42 \pm 0,48$  µg/mg) niedriger waren, als die der Kontrollstücke ( $76,49 \pm 14,97$  µg/mg).

Die Ergebnisse der histologischen Analyse (Abbildung 5.14) deckten sich nur teilweise mit den Ergebnissen der quantitativen Kalziumbestimmung. IPA<sub>Kalz3</sub> zeigte in beiden Färbungen zum Kalziumnachweis eine deutliche mediale Anfärbung. Die Färbung beschränkte sich auf die Media der Aorten, wo sie in den meisten Aorten einen durchgängigen Ring bildete. Die Färbung war in allen 3 Aorten und in allen 5 Abschnitten ähnlich stark ausgeprägt. IPA<sub>Kalz4</sub> zeigte in der Alizarin-Rot-Färbung keine Färbung, in der von Kossa-Färbung zeigte sich dagegen eine deutlich ausgeprägte mediale Färbung, entsprechend der Färbung von IPA<sub>Kalz3</sub>. Bei IPA<sub>Kalz5</sub> zeigte eine Aorta in beiden Färbungen eine schwache intimale Färbung (Vergleich nicht perfundierte Aorten, Abbildung 5.11). Die zweite Aorta zeigte in Alizarin-Rot keine und in von Kossa eine minimale mediale Färbung. Die dritte Aorta zeigte in Alizarin-Rot eine minimale, in von Kossa eine deutliche mediale Färbung. IPA<sub>Kalz6</sub> zeigte in beiden Färbungen eine fokale adventitiale Färbung, welche in 2 Aorten deutlich und in einer Aorta schwach ausgeprägt war. Eine mediale Färbung war nicht vorhanden.

Vergleich man die histologischen Bilder der mit Kalzifizierungsmedium perfundierten Aorten mit den Bildern von im gleichen Medium inkubierten Kontrollstücken, so fiel die unterschiedliche Lokalisation der Kalzifizierung auf. Während die Einlagerungen in den Kontrollstücken diffus und ungleichmäßig in der ganzen Wand verteilt waren, beschränkten sie sich in den IPAs auf die Media der Aortenwand, wo sie einen durchgängigen Ring bildeten. Dieser war je nach Ausprägung der Kalzifizierung unterbrochen, die zirkuläre Form war aber immer zumindest angedeutet.



**Abbildung 5.14: Histologischer Kalziumnachweis in IPAs aus Kalzifizierungskammern.**

*IPA<sub>Kalz3</sub>*: Alizarin-Rot – deutliche mediale Färbung. Von Kossa – deutliche mediale Färbung.

*IPA<sub>Kalz4</sub>*: Alizarin-Rot – keine Färbung. Von Kossa – deutliche mediale Färbung.

*IPA<sub>Kalz6</sub>*: Alizarin-Rot – fokale adventitielle Färbung. Von Kossa – fokale adventitielle Färbung.

**Tabelle 5.5:** Kalziumgehalt der  $\text{IPA}_{\text{Kalz}}$ , Angaben in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht.

Kammer	$\text{IPA}_{\text{Kalz3}}$			$\text{IPA}_{\text{Kalz4}}$			$\text{IPA}_{\text{Kalz5}}$			$\text{IPA}_{\text{Kalz6}}$			$\emptyset$
	1	2	3	1	2	3	2	3	4	1	2	3	
Aorta													
Abschnitt 1	2,48	3,41	4,44	4,06	4,77	9,85	2,70	2,72	3,22	4,61	6,06	4,03	<b>4,39</b> $\pm 0,55$
Abschnitt 2	2,44	3,25	4,46	5,03	17,78	8,17	3,58	4,38	3,55	3,29	5,27	8,12	<b>5,78</b> $\pm 1,16$
Abschnitt 3	4,01	2,72	3,53	5,33	7,61	7,08	3,23	2,73	2,76	0,74	4,45	5,15	<b>4,11</b> $\pm 0,54$
Abschnitt 4	3,93	2,63	2,49	3,18	5,39	4,90	3,09	1,95	6,06	3,25	5,64	4,66	<b>3,93</b> $\pm 0,38$
Abschnitt 5	5,47	2,62	2,66	6,81	3,91	6,98	3,04	2,49	1,60	3,04	5,03	2,99	<b>3,89</b> $\pm 0,49$
$\emptyset$	<b>3,74</b> $\pm 0,47$	<b>2,93</b> $\pm 0,15$	<b>3,52</b> $\pm 0,38$	<b>4,88</b> $\pm 0,55$	<b>7,89</b> $\pm 2,28$	<b>7,40</b> $\pm 0,72$	<b>3,13</b> $\pm 0,13$	<b>2,86</b> $\pm 0,36$	<b>3,44</b> $\pm 0,66$	<b>2,98</b> $\pm 0,56$	<b>5,29</b> $\pm 0,24$	<b>4,99</b> $\pm 0,77$	<b>4,42</b> $\pm 0,48$
$\emptyset$	3,39 $\pm 0,20$			6,72 $\pm 0,76$			3,14 $\pm 0,14$			4,42 $\pm 0,59$			

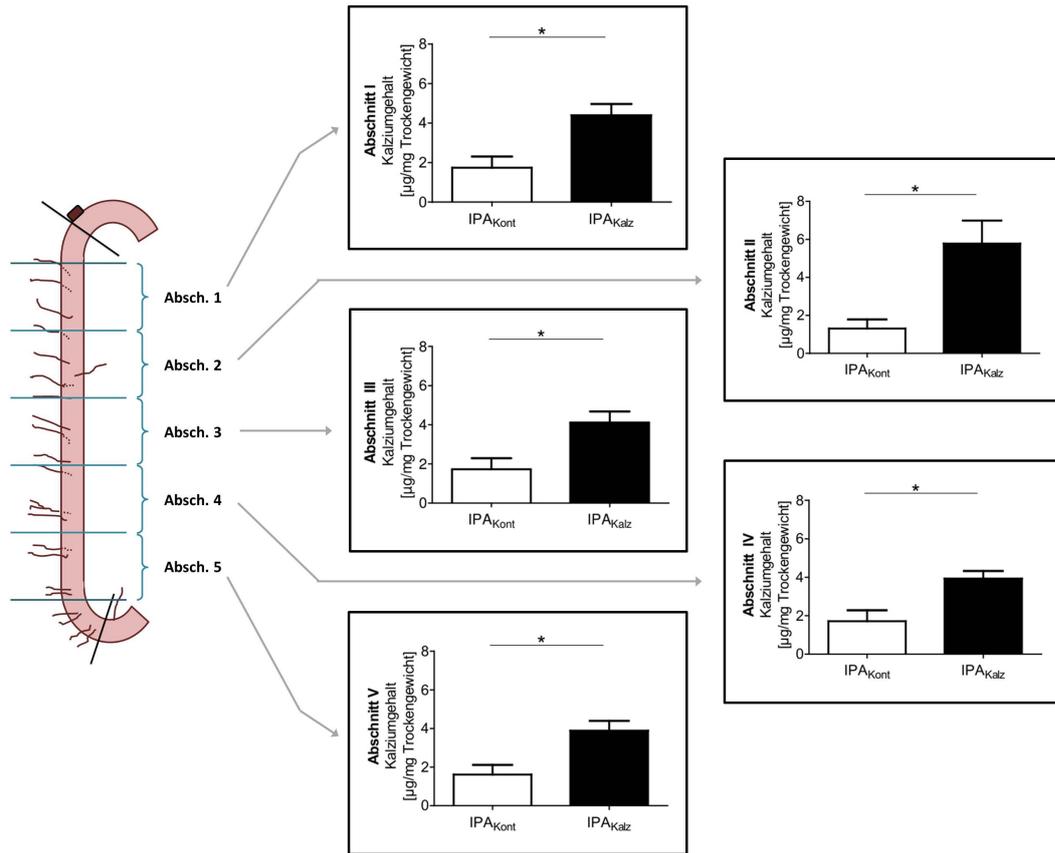
### 5.3.6 Vergleich von Kontroll- und Kalzifizierungskammern

Die  $IPA_{\text{Kalz}}$  zeigten einen signifikant höheren Kalziumgehalt als die  $IPA_{\text{Kont}}$ , sowohl in Bezug auf den Mittelwert, als auch bei separater Betrachtung der einzelnen Abschnitte. Abbildung 5.15 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Aortenabschnitte. Die Werte der  $IPA_{\text{Kalz}}$  waren in jedem Abschnitt höher als die der  $IPA_{\text{Kont}}$ . Abbildung 5.16a stellt dieselben Werte zusammengefasst dar, wobei der Mittelwert jeder Aorta verwendet wurde. Der Mittelwert aller  $IPA_{\text{Kont}}$  lag mit  $1,62 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{mg}$  höher als der aller  $IPA_{\text{Kalz}}$ , welcher  $4,42 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{mg}$  betrug.

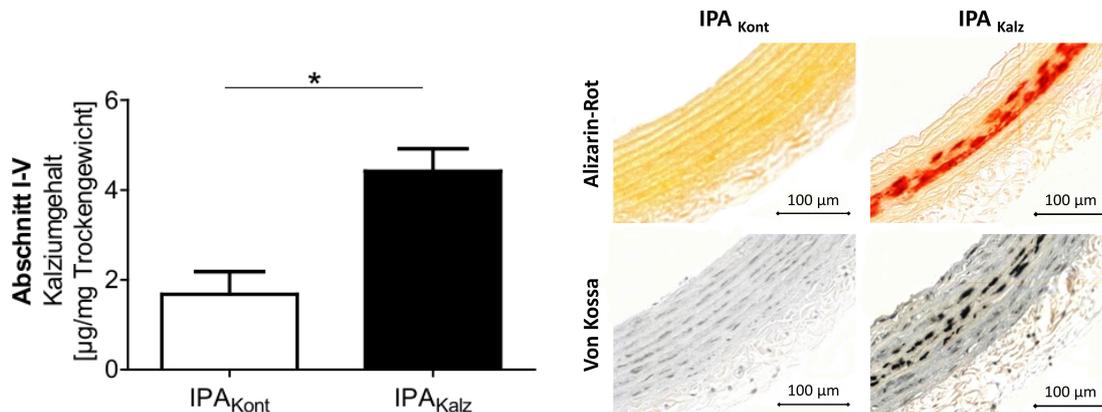
Die histologischen Ergebnisse (zusammengefasst dargestellt in Tabelle 5.6) stimmten nur teilweise mit den Ergebnissen der Kalziummessung überein. Von 9  $IPA_{\text{Kont}}$  färbten in Alizarin-Rot 1 Aorta deutlich und 2 Aorten schwach an, in von Kossa färbten dieselben 3 Aorten deutlich an. Von 12  $IPA_{\text{Kalz}}$  färbten in Alizarin-Rot 3 Aorten deutlich und eine schwach an, in von Kossa färbten 7 Aorten deutlich und eine schwach an. Es zeigte sich die Tendenz, dass die  $IPA_{\text{Kalz}}$  häufiger und deutlicher anfärbten, als die  $IPA_{\text{Kont}}$  (Abbildung 5.16b), wobei die Färbung in von Kossa insgesamt stärker ausgeprägt war, als in Alizarin-Rot. Jedoch ergab die statistische Prüfung von Rangnummern (vergeben in Anlehnung an Tabelle 5.6:  $- = 0$ ;  $(\surd) = 0,5$ ;  $\surd = 1$ ) keine Signifikanz.

**Tabelle 5.6: Vergleich der histologischen Ergebnisse von  $IPA_{\text{Kont}}$  und  $IPA_{\text{Kalz}}$ .**  $\surd \hat{=}$  deutliche mediale Färbung der meisten Aortenringen.  $(\surd) \hat{=}$  schwache mediale Färbung weniger Ringe.  $- \hat{=}$  keine mediale Färbung. Setzt man die Anzahl aller  $\surd$  (dabei gilt:  $1 (\surd) = \frac{1}{2} \surd$ ) und aller  $-$  miteinander in Verhältnis, erhält man einen Wert, welcher den Anfärbungsgrad widerspiegelt.

		Kammer		$IPA_{\text{Kont}}$			$IPA_{\text{Kalz}}$		
		Aorta	4	5	6	3	4	5	6
<b>Alizarin-Rot</b>	Aorta 1	$(\surd)$	-	-	$\surd$	-	-	-	
	Aorta 2	$(\surd)$	-	-	$\surd$	-	$(\surd)$	-	
	Aorta 3	$\surd$	-	-	$\surd$	-	-	-	
	Aorta 4		-	-					
	gesamt		$2 \surd : 7 - = \mathbf{0,29}$			$3,5 \surd : 9 - = \mathbf{0,38}$			
<b>von Kossa</b>	Aorta 1	$\surd$	-	-	$\surd$	$\surd$	-	-	
	Aorta 2	$\surd$	-	-	$\surd$	$\surd$	$\surd$	-	
	Aorta 3	$\surd$	-	-	$\surd$	$\surd$	$(\surd)$	-	
	Aorta 4		-	-					
	gesamt		$3 \surd : 6 - = \mathbf{0,50}$			$7,5 \surd : 4 - = \mathbf{1,78}$			



**Abbildung 5.15: Vergleich des Kalziumgehaltes von IPA<sub>Kont</sub> und IPA<sub>Kalz</sub>.** Vergleich der Werte von IPA<sub>Kont</sub> ( $n=9$ , weiße Balken) und IPA<sub>Kalz</sub> ( $n=12$ , schwarze Balken) in den 5 Aortenabschnitten. Der Kalziumgehalt der IPA<sub>Kalz</sub> ist in allen Abschnitten signifikant höher als der der IPA<sub>Kont</sub>. \* $p < 0,05$



**(a) Quantitativer Kalziumnachweis.** Vergleich der Mittelwerte aller Aorten. Die Werte der IPA<sub>Kalz</sub> ( $n=12$ ) sind signifikant höher als die der IPA<sub>Kont</sub> ( $n=9$ ). \* $p < 0,05$

**(b) Histologischer Kalziumnachweis.** Direkter Vergleich der in Abb. 5.13 und 5.14 gezeigten Bilder: IPA<sub>Kont</sub>: Keine Anfärbung. IPA<sub>Kalz</sub>: mediale Anfärbung.

**Abbildung 5.16: Vergleich der Ergebnisse von IPA<sub>Kont</sub> und IPA<sub>Kalz</sub>.**

## 6 Diskussion

Die mediale vaskuläre Kalzifizierung, wie sie gehäuft bei chronischer Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus auftritt, führt zu teils massiven Beeinträchtigungen des Herz-Kreislauf-Systems und ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert.<sup>[3]</sup> Grundlage für die Entwicklung von benötigten Therapie- und Präventionsstrategien ist ein fundiertes Wissen bezüglich der Pathogenese der Gefäßverkalkung. Beim Gewinn neuer Erkenntnisse spielen neben klinischen Studien verschiedene *in vivo*-, *in vitro*- und *ex vivo*-Modelle eine wichtige Rolle. Mit ihrer Hilfe konnten in den letzten Jahren zahlreiche neue Erkenntnisse gewonnen werden. Beispielsweise wurde die Rolle von Matrixvesikeln und apoptotischen Körpern als Kristallisationszentren entdeckt<sup>[61,63]</sup> und die Prozesse, welche der osteochondrogenen Transdifferenzierung der VSMCs zugrunde liegen, konnten teilweise identifiziert und eingeordnet werden.<sup>[83,91]</sup>

Die etablierten Modelle haben wesentlich zum heutigen Verständnis der medialen vaskulären Kalzifizierung beigetragen, dennoch hat jedes Modell neben seinen Vorteilen auch Schwachstellen. In Tiermodellen lassen sich am besten die im Menschen vorkommenden (patho)physiologischen Prozesse nachahmen und untersuchen,<sup>[106]</sup> da die komplexen Regulationsmechanismen eines intakten Organismus greifen. Sie haben gegenüber klinischen Studien den Vorteil, dass die direkte Wirkung bestimmter Substanzen auf den Organismus unter standardisierten Bedingungen untersucht werden kann, ohne dass die Ergebnisse durch Grund- oder Begleiterkrankungen oder Interaktionen mit anderen Medikamenten beeinflusst werden, wie es häufig bei Patienten der Fall ist.<sup>[106]</sup> Zur Untersuchung der vaskulären Kalzifizierung eignen sich am besten kleine Nager. Mäuse und Ratten sind unkompliziert in Handhabung und Haltung, haben eine kurze Lebensspanne und ähneln Menschen hinsichtlich ihres Stoffwechsels und ihrer Physiologie.<sup>[106]</sup> Jedoch weisen sie eine hohe natürliche Resistenz gegen vaskuläre Kalzifizierung auf, sodass massive Eingriffe in die Physiologie vonnöten sind, um eine Gefäßmineralisierung zu induzieren. Die gängigsten *in vivo*-Modelle sind das  $\frac{5}{6}$  Nephrektomie-Modell und das Adenin-Modell. In beiden Modellen wird im Versuchstier das funktionelle Nierengewebe reduziert und somit eine Niereninsuffizienz induziert. Zusätzlich wird die Kalzifizierung durch spezifische Diäten oder durch die Verabreichung kalzifizierungsfördernder Substanzen unterstützt. Lediglich diese Kombination führt zu einer zuverlässigen medialen Kalzifizierung. Da Mäuse zur Ausbildung von intima-

ler Kalzifizierung neigen, müssen DBA2-Mäuse eingesetzt werden, ein für mediale Kalzifizierung anfälliger Inzuchtstamm. Dieser entwickelt nach  $\frac{5}{6}$  Nephrektomie unter Hochphosphatdiät eine ausgeprägte mediale, jedoch keinerlei intimale Kalzifizierung.<sup>[121]</sup>

Die Tiermodelle sind allerdings nicht ohne Nachteile: Ein Punkt, der bei *in vivo*-Modellen immer zu diskutieren sein wird, ist die Übertragbarkeit von gewonnenen Erkenntnissen auf den Menschen. Bei allen Bemühungen, mit den Modellen die Vorgänge im menschlichen Organismus nachzuahmen, werden immer Unterschiede bestehen bleiben. Obwohl es im Bereich chronischer Nierenerkrankungen viele gute Modelle für einzelne Krankheitsaspekte gibt, so gibt es doch kein Modell, das die Pathophysiologie und die daraus resultierende Klinik beim Menschen in seiner Gesamtheit widerspiegelt.<sup>[122]</sup> Ein anderer nicht zu vernachlässigender Punkt ist der Tierschutzaspekt. Nach den Prinzipien der 3R (*Replace, Reduce, Refine*) sollen Tierversuche soweit möglich ersetzt, reduziert oder verbessert werden, da die Induktion pathologischer Zustände beim Versuchstier mit Schmerzen, Leiden und Schäden einhergeht.<sup>[123]</sup> Zudem schreitet der Kalzifizierungsprozess *in vivo* nur langsam voran, die experimentelle Phase dauert in den Regel mindestens 5 Wochen.<sup>[124,125]</sup> Erschwerend hinzu kommt die individuelle Reaktivität jedes Organismus, wodurch die Ergebnisse in der Regel eine breite Streuung aufweisen. Diese Faktoren machen das Erstellen von Dosis-Wirkungs-Kurven schwierig.

Die Schwächen der *in vivo*-Modelle sind die Stärken der Zellkulturmodelle: In ihnen lässt sich vergleichsweise schnell und unkompliziert der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Kalzifizierung in Abhängigkeit von Dosis und Zeit untersuchen. Somit eignen sie sich sowohl hervorragend zur Identifikation neuer Substanzen, die bei der Kalzifizierung eine Rolle spielen, als auch zur Untersuchung der dabei involvierten Signalwege.

Die Nachteile der Zellkultur liegen in ihren eher unphysiologischen Bedingungen. Die Kalzifizierung wird innerhalb weniger Tage durch die Zugabe einzelner Substanzen zum Medium induziert. Dagegen handelt es sich bei der *in vivo* auftretenden Kalzifizierung um einen komplex regulierten, langsam fortschreitenden Prozess, welcher sich über einen Zeitraum von Monaten bis Jahren hinweg entwickelt. Die bei *in vitro*-Versuchen eingesetzten Zellen (meist VSMCs) werden aus kultivierten Gefäßringen gewonnen und passagiert, bis sie etwa in Passage 3–7 für Versuche eingesetzt werden.<sup>[126,127]</sup> Es wird mit einer isolierten Zellpopulation in einer zweidimensionalen Kultur gearbeitet. Es gibt keinen zusammenhängenden

Zell- und Gewebeverband, Interaktionen mit der extrazellulären Matrix sind ausgeschlossen. Somit werden die realen Verhältnisse nur bedingt widerspiegelt, weshalb sich Genexpression, Signalwege und Zellmorphologie von denen *in vivo* unterscheiden können.<sup>[128]</sup> Eine Weiterentwicklung der 2D-Zellkultur stellt die 3D-Zellkultur dar. Mittels verschiedener Methoden, beispielsweise durch Einsatz von Hydrogelen als extrazelluläre Matrix,<sup>[129]</sup> wird die Dreidimensionalität von Gewebe nachgeahmt. Dadurch werden die natürlichen Eigenschaften der Zellen besser imitiert, als es in der einlagigen Zellschicht einer zweidimensionalen Kultur möglich ist.<sup>[130]</sup> Die 2010 von Souza *et al.* entwickelte *Magnetic levitation method* (MLM), bei welcher die Zellen in einem magnetischen Feld schweben, ermöglicht ein besonders schnelles Zellwachstum.<sup>[128]</sup> Castro-Chavez *et al.* wandten die Methode erfolgreich an VSMCs an und konnten ein 3–4fach schnelleres Zellwachstum beobachten. Sie untersuchten den Einfluss von Lysophosphatidylcholin auf die Kalzifizierung der VSMCs und konnten nachweisen, dass es die osteochondrogene Transdifferenzierung fördert, ein Effekt, der durch Schnurri-3 aufgehoben wird.<sup>[131]</sup>

Jedoch arbeitet auch die 3D-Zellkultur lediglich mit einer isolierten Zellart. Ein Modell, bei welchem die natürliche Gewebestruktur der Gefäße erhalten bleibt, ist die *ex vivo*-Kultivierung von Gefäßringen, wie sie beispielsweise von Schuchardt *et al.*<sup>[98]</sup> und Prüfer *et al.*<sup>[99]</sup> praktiziert wurde. Hierbei bleibt der Zellverband erhalten, verschiedene Zellarten stehen untereinander und mit der extrazellulären Matrix in Verbindung, sodass das Modell den physiologischen Bedingungen näher kommt als *in vitro*-Modelle. Jedoch werden die Gefäßringe auch von extraluminal mit Medium umspült, was nicht den Bedingungen im Körper entspricht. Der Kontakt der Adventitia mit den kalzifizierungsfördernden Substanzen führt zu deren Kalzifizierung.<sup>[76]</sup> Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dadurch auch die mediale Kalzifizierung beeinflusst wird.

An diesem Punkt setzt das neu entwickelte Modell der IPA an, welches als Weiterentwicklung der *ex vivo*-Modelle gesehen werden kann. Es wird nach ähnlichen Prinzipien gearbeitet: Die Aorten werden für 14 Tage mit den gleichen Zellkulturmedien inkubiert und die Kalzifizierung wird durch Zusätze im Medium induziert. Der entscheidende Unterschied ist, dass im Modell der IPA die Aorten mit dem Kalzifizierungsmedium perfundiert werden, sodass im Gegensatz zu den *ex vivo*-Modellen lediglich die luminal Gefäßwand in Kontakt damit kommt. Durch die Perfusion ist die Intima gewissen Scherkräften ausgesetzt, wie sie auch durch den

Blutfluss im Organismus bestehen. Mit der Aorta wird mit einem vollständigen Organ gearbeitet, sodass die natürliche Gewebestruktur erhalten bleibt. Somit ist das Modell der IPA den physiologischen Konditionen im Körper deutlich ähnlicher als bestehende *in vitro*- und *ex vivo*-Modelle. Zugleich trägt die IPA zur Umsetzung der 3R-Prinzipien bei. Die etablierten *in vivo*-Modelle gehen für die Tiere mit nicht zu vernachlässigenden Schmerzen, Leiden und Schäden einher (Induktion einer chronischen Niereninsuffizienz, chirurgische Eingriffe, Gewichtsverlust). Zwar werden auch für die IPA Spendertiere benötigt, es werden jedoch gesunde Tiere eingesetzt, deren einzige Belastung in der schmerzfreien Euthanasie besteht. Bei entsprechender Versuchsplanung und Kooperation können die gesunden Organe der Tiere zudem für andere Versuchsreihen verwendet werden, wodurch die benötigte Gesamtzahl an Versuchstieren reduziert werden kann.

Ein weiterer Vorteil des Modells der IPA besteht in der Möglichkeit zur gezielten Manipulation des Endothels. Es gibt bisher kaum Studien, welche die Rolle des Endothels bei der Entwicklung der medialen Gefäßverkalkung untersuchen, obwohl es Hinweise auf eine Beteiligung gibt. Beispielsweise konnte der kalzifizierungsfördernde Effekt von  $Up_4A$ , einem aus dem Endothel sezernierten Faktor, nachgewiesen werden.<sup>[98]</sup> Ein Grund hierfür mag sein, dass sich das Endothel in den bestehenden Modellen nur schlecht beeinflussen und untersuchen lässt. *In vitro*-Modelle eignen sich ausschließlich dazu, den Einfluss einzelner, mit dem Endothel assoziierter Substanzen wie  $Up_4A$  zu untersuchen, wobei andere Einflüsse des Endothels unberücksichtigt bleiben. *In vivo* besteht sowohl im Tiermodell<sup>[93,132]</sup> als auch im menschlichen Probanden<sup>[94]</sup> die Möglichkeit, den Einfluss endothelassoziierter Substanzen zu testen. Dies ist jedoch mit hohem Aufwand verbunden. Zudem ist es bislang nur schlecht möglich den Einfluss eines langfristig geschädigten Endothels auf den Kalzifizierungsprozess zu untersuchen, da das Endothel *in vivo* nur schwierig zugänglich ist. Mit der in den 80ern von Clowes *et al.* entwickelten Ballonkathetermethode, bei welcher ein Ballonkatheter in das Gefäß eingeführt, aufgeblasen und unter Rotation zurückgezogen wird, steht eine Methode zur Verfügung, mit welcher *in vivo* die gesamte Gefäßwand der A. carotis communis beschädigt werden kann.<sup>[133–136]</sup> Eine gezielte Beschädigung lediglich des Endothels ist jedoch nicht möglich. Ersetzt man den Ballonkatheter durch eine Fadenschleife, wie 1990 von Fingerle *et al.* vorgestellt,<sup>[137]</sup> erreicht man eine vollständige Abtragung des Endothels bei Erhalt einer intakten Media. Der operative Aufwand ist jedoch hoch, zudem ist eine Beschädigung der Aorta, an wel-

cher Kalzifizierungsstudien in der Regel durchgeführt werden, nicht möglich. Die beschriebenen Methoden wurden in Studien zur Gefäßregeneration angewandt, Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen auf die Kalzifizierung wurden nicht durchgeführt.

Lomashvili *et al* übertrugen die Methode von Fingerle *et al* auf *ex vivo*-Kalzifizierungsversuche.<sup>[76]</sup> Sie konnten in deendothelialisierten Aortenringen keine gesteigerte Kalzifizierung feststellen. Die Analyse erfolgte jedoch lediglich mittels von Kossa-Färbung, eine quantitative Kalziumbestimmung, welche sensitiver und zuverlässiger ist, wurde nicht durchgeführt. Zudem war der Kalziumgehalt von unbehandelten, in Kalzifizierungsmedium inkubierten Aortenringen im Vergleich zu anderen Studien<sup>[98]</sup> sehr gering, was vermutlich auf den geringen Phosphatgehalt des Kalzifizierungsmediums zurückzuführen ist. Daher schließen die Ergebnisse dieser Untersuchung eine Rolle des Endothels bei der Kalzifizierung nicht aus.

Zwar kann das Endothel in *ex vivo*-Modellen gezielt beschädigt werden, jedoch kann eine Beeinflussung der Kalzifizierung durch den unphysiologischen Kontakt der Adventitia mit dem Medium nicht ausgeschlossen werden. Mögliche Einflüsse des Endothels könnten dadurch überdeckt werden. In *in vitro*-Modellen ist eine Untersuchung des Endothels nicht möglich, da mit isolierten VSMCs gearbeitet wird. In der IPA dagegen bleibt der Gewebeverband erhalten, das Endothel ist leicht zugänglich und lediglich die Intima kommt mit dem Kalzifizierungsmedium in Kontakt. Somit eignet sich das Modell gut, um die Rolle des Endothels bei der medialen vaskulären Kalzifizierung zu untersuchen.

## 6.1 Methodenetablierung

Ziel der Arbeit war die Etablierung des neuen Modells der IPA. Hierfür mussten zunächst die benötigten Methoden entwickelt und etabliert werden. Teilweise konnten etablierte Techniken übernommen werden (Zusammensetzung der Perfusionsmedien, Analysemethoden), teilweise wurden etablierte Methoden modifiziert (Aortenpräparation, Zusammensetzung der Tyrode) und teilweise wurden Methoden neu entwickelt (Koagulation der Aortenabgänge, Technik zum Medienwechsel).

Die im Arbeitskreis üblichen Techniken zur Aortenentnahme und -präparation wurden den Anforderungen angepasst. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, war eine aortenschonende Präparationstechnik erforderlich. Es gibt Hinweise, dass

eine beschädigte Aortenwand, wie sie beispielsweise durch zu starke Manipulation bei der Präparation zustande kommen kann, die Kalzifizierung fördert.<sup>[76]</sup> Das empfindliche Endothel durfte nicht beschädigt werden, um dessen Einfluss auf die Kalzifizierung untersuchen zu können. Daher wurden die gängigen Techniken zur Entnahme und Präparation der Aorten dahingehend modifiziert, dass eine Beschädigung der Aorta vermieden werden sollte. Auch eine intravasale Thrombenbildung kann über Freisetzung von Radikalen zu oxidativem Stress<sup>[138]</sup> und damit zur Beschädigung des Endothels beitragen. Daher wurde eine nicht-letale Narkosedosis eingesetzt, sodass der Tod des Tieres erst durch die Entnahme des Herzens herbeigeführt wurde. So konnte die Zeitspanne zwischen Kreislaufstillstand und Überführung der Aorta in ein Nährmedium kurz gehalten werden. Das an der Aorta haftende Fett- und Bindegewebe wurde zusammen mit der Adventitia entfernt, da aus *ex vivo*-Versuchen bekannt ist, dass unter Einfluss von Kalzifizierungsmedium auch die Adventitia kalzifiziert.<sup>[76]</sup>

Um die Perfusion der Aorta zu ermöglichen, musste diese einen geschlossenen Schlauch bilden. Hierfür wurde eine Technik zum dichten Verschluss der zahlreichen Gefäßabgänge entwickelt. Die gängigen chirurgischen Methoden zum Gefäßverschluss sind die Fadenligatur, das Anbringen von Ligatur-Clips und die Koagulation der Gefäße mittels Hochfrequenz-Chirurgie.<sup>[139]</sup> Der Verschluss der Aortenabgänge mittels Fadenligatur war aufgrund der geringen Größe der Gefäße nicht praktikabel. Ligatur-Clips sind einfach und schnell anzubringen<sup>[139]</sup> und in sehr kleinen Größen erhältlich, sodass der Verschluss einzelner Gefäßabgänge mittels Clips vermutlich möglich gewesen wäre. Jedoch mussten pro Aorta 20–25 Gefäßabgänge verschlossen werden. Eine Beschädigung der Aortenwand oder des Endothels durch das Gewicht der benötigten Clips konnte nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde die Elektrochirurgie als Methode zum Gefäßverschluss gewählt. Bei der Hochfrequenz-Chirurgie wird mittels hochfrequenter elektrischer Ströme (300 – 500 kHz) das Gewebe erhitzt. Bei 70 – 80 °C denaturieren die Proteine, das Gewebe koaguliert.<sup>[140]</sup> Man unterscheidet zwischen der monopolen und der bipolaren Technik. Bei der monopolen Technik erfolgt die Ableitung über eine großflächig mit dem Patientenkörper verbundene Neutralelektrode. Die Technik eignet sich gut zum Schneiden von Gewebe.<sup>[140]</sup> Bei der bipolaren Technik befinden sich beide Pole am chirurgischen Instrument, in der Regel eine Pinzette. Damit eignet sich diese Technik gut zum Koagulieren.<sup>[140]</sup> Durch die Kompression, welche beim Greifen des Gewebes mit der Pinzette entsteht, eignet sich die

bipolare Koagulation besonders gut zum Verschließen von Gefäßen.<sup>[140]</sup> Daher, und aufgrund der hohen Präzision, wurde die bipolare Elektro-Koagulation zum Verschluss der Aortenabgänge gewählt. Bei der Elektro-Chirurgie kann es durch fehlerhafte Anwendung zur Beschädigung von angrenzendem Gewebe (im Falle der IPA: der Aortenwand) kommen. Zudem werden die Koagel instabil, wenn es durch zu starke Erhitzung zur Karbonisation kommt.<sup>[139]</sup> Beides lässt sich durch die korrekte Einstellung des Gerätes und eine adäquate Kontaktdauer vermeiden. Beachtet man diese Punkte, stellt die bipolare Elektrokoagulation eine zuverlässige und aortenschonende Methode zum Verschluss der Gefäßabgänge dar.

Die verwendeten Perfusionsmedien orientierten sich an in der Literatur beschriebenen Medien zur Kalzifizierung von VSMCs, welche in ihrer exakten Zusammensetzung variieren. Das Standard-Medium zur Kultivierung von VSMCs ist das DMEM. Zur Versorgung mit Wachstumsfaktoren wird FCS hinzugegeben, ebenso Pen/Strep, welches einem Verkeimen des Mediums entgegenwirkt.<sup>[100,103]</sup> Die Kalzifizierung wird in Anlehnung an die Hyperphosphatämie bei chronischer Niereninsuffizienz durch Zugabe einer Phosphatquelle, beispielsweise  $\beta$ -Glycerophosphat<sup>[101,102]</sup> oder  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ <sup>[61,141]</sup> induziert. Häufig wird ein DMEM mit erhöhtem Glucose-Gehalt gewählt<sup>[142]</sup> oder Insulin hinzugegeben,<sup>[100]</sup> um die kalzifizierungsfördernden Zustände bei Diabetes mellitus nachzuahmen. Einige Autoren geben weitere kalzifizierungsfördernde Substanzen hinzu, beispielsweise Natriumpyruvat<sup>[99,104]</sup> oder Ascorbinsäure,<sup>[99,100]</sup> welches ein Kofaktor der Osteoblastendifferenzierung ist und in Kombination mit anorganischem Phosphat die Kalzifizierung von VSMCs deutlich steigert.<sup>[143]</sup> Im Arbeitskreis wurden Studien an VSMCs und Aortenringen durchgeführt, welche die Wirkung unterschiedlicher Phosphatquellen in Kombination mit verschiedenen Zusätzen untersuchten (unpublizierte Daten). Die beste Kalzifizierung wurde mit einem DMEM mit erhöhtem Glucose-Gehalt erzielt, welchem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und Ascorbinsäure zugegeben wurde. Daher wurde diese Kombination als kalzifizierendes Perfusionsmedium für die IPA verwendet. Das äußere Nährmedium diente der Nährstoffversorgung von außen, es musste einen physiologischen pH-Wert und eine Pufferkapazität besitzen. Aufgrund guter Erfahrungen im Arbeitskreis aus anderen physiologischen Versuchen wie der isoliert perfundierten Niere,<sup>[144]</sup> wurde die Tyrodelösung gewählt. Es zeigte sich, dass die Tyrode in ihrer üblichen Zusammensetzung bei Inkubation in der Kammer auskristallisierte, weshalb sie in ihrer Zusammensetzung derart modifiziert wurde, dass das Ausfällen verringert werden konnte.

Der Versuchsablauf orientierte sich an etablierten *in vitro*- bzw. *ex vivo*-Kalzifizierungsversuchen von VSMCs und Aortenringen. Die in der Literatur beschriebene Inkubationsdauer zur Induktion der Kalzifizierung liegt größtenteils zwischen 9 und 21 Tagen.<sup>[99,104]</sup> Die meisten Autoren beschreiben eine zuverlässige, deutliche Kalzifizierung nach 14 Tagen,<sup>[98,126,141]</sup> weshalb diese Perfusionsdauer für die IPA gewählt wurde. Studien, welche den Kalzifizierungsprozess über die Zeit betrachten, zeigen, dass die Kalzifizierung progressiv verläuft.<sup>[98,126]</sup> Kang *et al.* verglichen die Kalzifizierung nach 2 und 4 Wochen und zeigten, dass die Kalzifizierung auch nach den gängigen 14 Tagen Versuchsdauer weiter fortschreitet.<sup>[127]</sup> Die bisher mit der IPA gewonnenen Daten zeigen einen signifikanten aber eher geringen Anstieg des Kalziumgehaltes in mit Kalzifizierungsmedium perfundierten Aorten. Eine Verlängerung der Perfusionsdauer würde vermutlich einen ausgeprägteren Anstieg des Kalziumgehaltes bewirken. Ob die Differenz zwischen Kontrollaorten und kalzifizierten Aorten nach 14 Tagen Perfusion deutlich genug ist, muss geprüft werden, sobald mehr Daten vorliegen. Gegebenenfalls sollte die Perfusionsdauer angepasst werden. In Zellkulturversuchen wird alle 2 – 4 Tage das Medium gewechselt,<sup>[127,141]</sup> um eine Übersäuerung durch Stoffwechselprodukte zu verhindern. Dieses Intervall wurde zunächst für die IPA übernommen. Regelmäßige Kontrollen zeigten jedoch keine Veränderungen des pH-Wertes, weshalb das Intervall auf 4 – 5 Tage verlängert wurde. Möglich war dies vermutlich aufgrund der größeren Menge an eingesetztem Medium. Die Technik zum Medienwechsel wurde neu entwickelt. Sie durfte die Sterilität des Systems nicht gefährden, außerdem sollte sie möglichst unkompliziert und zügig durchzuführen sein. Die entwickelte Methode (Einbau von zwei 3-Wege-Hähnen ins Schlauchsystem) erfüllte diese Anforderungen. Die Flussrate der peristaltischen Pumpe wurde zu Beginn der Versuchsreihe willkürlich gewählt, da der Versuchsaufbau neu war und somit keinerlei vergleichbare Daten vorlagen. Die Rate wurde bezogen auf die Leistungsfähigkeit der Pumpe relativ niedrig gewählt (Stufe 10 von 99), um eine Beschädigung der Aortenwand oder des Endothels durch eine zu starke Strömung zu vermeiden. Untersuchungen ob, und falls ja, wie die Flussrate die Kalzifizierung beeinflusst, stehen noch aus.

Bei den zum Kalziumnachweis angewandten Methoden handelt es sich um gängige, im Arbeitskreis etablierte Methoden.<sup>[98,99]</sup> Der Kalziumgehalt der Aorten wurde histologisch durch Alizarin-Rot- und von Kossa-Färbungen nachgewiesen, die quantitative Bestimmung erfolgte durch die photometrische Messung des violet-

ten Ca-o-Kresolphthalein-Komplexes. Es zeigte sich, dass Metallionen (mit hoher Wahrscheinlichkeit Eisen-Ionen), die in Proben aus korrodierten Kammern enthalten waren, mit den Nachweismethoden interferierten. Weder von Kossa<sup>[145]</sup> noch Alizarin-Rot, welches außer mit Kalzium auch mit Magnesium, Mangan, Barium, Strontium und Eisen einen Chelatkomplex bildet,<sup>[146]</sup> färben ausschließlich Kalzium an, sodass die betroffenen Präparate eine stark ausgeprägte Färbung aufwiesen. Der zum quantitativen Kalziumnachweis gemessene Ca-o-Kresolphthalein-Komplex kann sich neben Kalziumionen auch mit Magnesium- und Eisenionen bilden. Das Test-Kit enthält daher 8-Hydroxychinolin, welches Magnesium und Eisen komplexiert und so eine Verfälschung der Kalziummessung verhindern soll.<sup>[147,148]</sup> Trotzdem ergaben betroffene Proben 5–10fach höhere Werte als Proben aus vergleichbaren, rostfreien Kammern. Da das Test-Kit auf die Kalziumbestimmung in Blut- und Urinproben ausgelegt ist, lag die Vermutung nahe, dass die in den Proben enthaltene Menge an Eisenionen die Komplexierungskapazität überstieg. Der Zusammenhang zwischen gerosteten Kammern und dem vermeintlichen Nachweis sehr hoher Kalziummengen war in allen Nachweismethoden einheitlich und deutlich. Daher wurde auf weitere Analysen, beispielsweise die Bestimmung der Eisengehalts in den Proben oder eine Berliner-Blau-Färbung zum Eisennachweis, verzichtet. Die gerosteten Kammern wurden als fehlerhaft definiert und nicht ausgewertet.

## 6.2 Ergebnisse

Nach Etablierung der Methoden galt es zu klären, ob sich im Modell der IPA eine mediale Kalzifizierung induzieren lässt. Hierfür wurden IPAs mit Kontrollmedium (IPA<sub>Kont</sub>) oder Kalzifizierungsmedium (IPA<sub>Kalz</sub>) perfundiert. Der durchschnittliche Kalziumgehalt der IPA<sub>Kont</sub> lag bei  $1,68 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{mg}$ , der der IPA<sub>Kalz</sub> bei  $4,42 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{mg}$  und somit um das 2,7fache höher. Vergleich man die Mediane, wurde die Differenz noch deutlicher: Er lag bei den IPA<sub>Kont</sub> bei  $0,95 \mu\text{g}/\text{mg}$ , bei den IPA<sub>Kalz</sub> bei  $3,92 \mu\text{g}/\text{mg}$  und war somit um das 4,1fache höher. Im Modell der IPA lässt sich mittels Hochphosphatmedium eine Kalzifizierung der Aorten induzieren.

Um Vergleichswerte zu erhalten, wurden Kontrollstücke entsprechend den Methoden von *ex vivo*-Versuchen in Kontrollmedium (K<sub>Kont</sub>), Kalzifizierungsmedium (K<sub>Kalz</sub>) und Tyrode (K<sub>T</sub>) inkubiert. Außerdem wurde der Kalziumge-

halt nicht inkubierter Aorten bestimmt ( $K_0$ ), um einen Ausgangswert zu erhalten. Der Kalziumgehalt der  $K_{\text{Kont}}$  ( $0,86 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) lag im Bereich der  $K_0$  ( $0,58 \pm 0,10 \mu\text{m}/\text{mg}$ ), die Differenz war nicht signifikant. Somit konnte ein Einfluss des Kontrollmediums auf den Kalziumgehalt der Aorten ausgeschlossen werden. Der Kalziumgehalt der  $K_{\text{Kalz}}$  ( $76,49 \pm 14,97 \mu\text{m}/\text{mg}$ ) lag über dem der  $K_{\text{Kont}}$  und der  $K_0$ , womit die kalzifizierungsfördernde Wirkung des Kalzifizierungsmediums nachgewiesen wurde. Der Kalziumgehalt der  $K_{\text{T}}$  ( $0,24 \pm 0,10 \mu\text{m}/\text{mg}$ ) war niedriger, als der der  $K_0$  und der  $K_{\text{Kont}}$ . Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die Tyrode die Kalzifizierung der Aorten förderte. Dass die Werte sogar unter denen der  $K_0$  lagen, war vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Aortenringe in Tyrode nach 14 Tagen Inkubation nicht mehr vital waren. Der Glucose-Gehalt der Tyrode war relativ gering, zudem wurde die Tyrode nicht gewechselt. Diese beiden Faktoren führten wahrscheinlich zum Absterben des Gewebes.

Der durchschnittliche Kalziumgehalt der  $\text{IPA}_{\text{Kont}}$  war mit  $1,62 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{mg}$  etwa doppelt so hoch wie der der  $K_{\text{Kont}}$  ( $0,86 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), die Differenz jedoch nicht signifikant. Vergleich man die Mediane ( $\text{IPA}_{\text{Kont}}$ :  $0,95 \mu\text{g}/\text{mg}$ ;  $K_{\text{Kont}}$ :  $0,68 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) näherten sich die Werte einander an. Die nach oben abweichenden Werte einer Kontrollkammer waren vermutlich auf eine nicht sichtbare Kontamination mit Rost zurückzuführen. Die histologischen Bilder unterstützten diese Vermutung: Die betroffenen Aorten zeigten in von Kossa eine Anfärbung aller Wandschichten, vergleichbar mit den histologischen Bildern korrodierter Kammern. Die meisten Studien zur vaskulären Kalzifizierung werden mit VSMCs durchgeführt, daher gibt es in der Literatur nur wenig direkt vergleichbare Werte inkubierter Aortenringe. Schuchardt *et al.* beschrieben nach 14tägiger Inkubation in Kontrollmedium (DMEM, Pen/Strep, FCS) einen Kalziumgehalt von ca.  $1 \mu\text{g}/\text{mg}$ .<sup>[98]</sup> Lomashvili *et al.* beschrieben nach 9tägiger Inkubation (DMEM, Pen/Strep) einen Kalziumgehalt von ca.  $5 - 10 \text{ nmol}/\text{mg}$ ,<sup>[76]</sup> was  $0,2 - 0,4 \mu\text{g}/\text{mg}$  entspricht. Die mit Kontrollmedium perfundierten IPAs hatten also einen ähnlichen Kalziumgehalt wie in Kontrollmedium inkubierte Aortenringe, sowohl im Vergleich mit Werten aus der Literatur als auch mit den Werten der eigenen Kontrollen. Folglich beeinflusste die Perfusion alleine den Kalziumgehalt der IPAs nicht.

Der durchschnittliche Kalziumgehalt der  $\text{IPA}_{\text{Kalz}}$  war mit  $4,42 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{mg}$  um das 2,7fache höher als der der  $\text{IPA}_{\text{Kont}}$  ( $1,62 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). Betrachtete man die Mediane, stieg der Kalziumgehalt sogar um das 4,1fache. Der Kalziumgehalt der *ex vivo* kalzifizierten Kontrollstücke lag bei  $76,49 \pm 14,97 \mu\text{g}/\text{mg}$  und damit ca.

17fach höher. Die in der Literatur beschriebenen Werte kalzifizierter Aortenringe variieren. Schuchardt *et al.* beschrieben nach 14 Tagen Inkubation einen Anstieg des Kalziumgehaltes um das 3fache von ca.  $1 \mu\text{g}/\text{mg}$  auf  $3 \mu\text{g}/\text{mg}$ .<sup>[98]</sup> Prüfer *et al.* beschrieben nach 14 Tagen einen Anstieg um das 8fache.<sup>[99]</sup> Der stärkere Anstieg ist vermutlich auf die im Kalzifizierungsmedium von Prüfer *et al.* enthaltene Ascorbinsäure zurückzuführen, da sich die Methoden von Schuchardt *et al.* und Prüfer *et al.* lediglich in diesem Punkt unterschieden. Lomashvili *et al.* beschrieben einen Anstieg des Kalziumgehaltes um das 1,6fache auf lediglich  $0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Eine mögliche Ursache stellte die Zusammensetzung des Kalzifizierungsmediums dar, welches einen geringeren Phosphatgehalt, keine kalzifizierungsfördernden Substanzen und kein FCS zugesetzt hatte. Zudem erfolgte die Bestimmung des Kalziumgehaltes mit einer anderen Methode, wodurch der Vergleich der Ergebnisse nur bedingt möglich war. Verglich man die Werte aus der Literatur mit denen der kalzifizierten IPAs, so bewegte sich der Kalziumgehalt der IPAs in einem ähnlichen Rahmen. Die Werte lagen zwar im unteren Bereich, dies ist jedoch kaum verwunderlich, da bei den IPAs lediglich die Intima Kontakt mit dem Kalzifizierungsmedium hatte, im Gegensatz zu den *ex vivo* kalzifizierten Aortenringen, welche von allen Seiten mit Kalzifizierungsmedium umspült wurden. Dies erklärt auch die große Differenz zwischen den  $\text{IPA}_{\text{Kalz}}$  und den  $\text{K}_{\text{Kalz}}$ . Der Kalziumgehalt der kalzifizierten Kontrollstücke war zudem auch deutlich höher als die Werte aus der Literatur. Dies ist möglicherweise auf die optimierte Zusammensetzung des Kalzifizierungsmediums zurückzuführen, eventuell spielte auch die modifizierte Präparationstechnik eine Rolle.

Die histologischen Ergebnisse stimmten nur teilweise mit den Ergebnissen der quantitativen Kalziumbestimmung überein. Eine der Kontrollkammern zeigte überraschenderweise eine mediale Färbung, während nachweislich kalzifizierte Aorten nicht anfärbten. Eine denkbare Erklärung für eine fehlende Färbung wäre, dass der Kalziumgehalt der kalzifizierten IPAs im Bereich der histologischen Nachweisgrenze lag. Möglicherweise ging während des Verarbeitungsprozesses der histologischen Präparate (Fixieren, Einbetten, Schneiden) ein Teil des Kalziums verloren, sodass der Kalziumgehalt einiger Präparate unter die Nachweisgrenze sank. Ein ungleichmäßiger Verlust von Kalzium würde erklären, warum teilweise Aorten mit einem geringeren gemessenen Kalziumgehalt stärker anfärbten als Aorten mit einem höheren gemessenen Kalziumgehalt. Einige Aorten zeigten eine intimale Färbung. Da vor allem nicht perfundierte Aorten betroffen waren, handelte es sich

dabei wahrscheinlich um eine passive Ablagerung von Kalzium aus in den Aorten verbliebenen Resten des Perfusionsmediums. Dasselbe gilt für die adventitielle Färbung aller Aorten einer Kammer. Bei dieser Kammer kam es zum Austritt von Kalzifizierungsmedium in die Tyrode, was vermutlich zu einer passiven Ablagerung von außen an die Aorten führte.

Der histologische Kalziumnachweis schien deutlich fehleranfälliger zu sein, als die quantitative Kalziummessung, deren Ergebnisse einheitlicher und besser nachvollziehbar waren. Daher wurden die gemessenen Kalziumwerte als aussagekräftiger angesehen. Dennoch gaben die histologischen Bilder kalzifizierter IPAs interessante Hinweise bezüglich der Lokalisation der Kalziumeinlagerungen. In Tiermodellen der medialen vaskulären Kalzifizierung beschränken sich die Ablagerungen auf die Media der Gefäße.<sup>[114,124,149]</sup> In *ex vivo*-Modellen ist dies nicht immer der Fall. Lediglich Schuchardt *et al.* beschrieben eine medial lokalisierte Kalzifizierung.<sup>[98]</sup> Bei Prüfer *et al.*<sup>[99]</sup> und Lomashvili *et al.*<sup>[76]</sup> dagegen verteilten sich die Ablagerungen in der gesamten Gefäßwand, eine Konzentration auf die Media war nicht erkennbar. Dies deckte sich mit den Ergebnissen der kalzifizierten Kontrollstücke, bei denen die Kalzifizierung diffus in der gesamten Aortenwand verteilt war. In den kalzifizierten IPAs dagegen waren die Einlagerungen auf die Media beschränkt. Hier waren sie gleichmäßig verteilt, sodass sie einen Ring bildeten. Diese Verteilung war, im Gegensatz zu Bildern von *ex vivo*-Versuchen, mit Ergebnissen von *in vivo* Kalzifizierungen vergleichbar.

Ein bislang wenig untersuchter Aspekt ist das Verteilungsmuster der Kalzifizierung in den verschiedenen Abschnitten der Aorta. Leroux-Berger *et al.* konnten in *ex vivo*- und *in vitro*-Versuchen zeigen, dass der Aortenbogen stärker zur Kalzifizierung neigt, als die thorakale und abdominale Aorta. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass die VSMCs der Aorta unterschiedlichen embryonalen Ursprungs sind, was mit ihrer Anfälligkeit für Kalzifizierung korreliert.<sup>[105]</sup> Shobeiri *et al.* beobachteten im Adenin-Rattenmodell eine stärkere Kalzifizierung der distalen Gefäße (abdominale Aorta, Aa. iliaca, Aa. renales), im Gegensatz zu weniger stark kalzifizierten herznahen Gefäßen (thorakale Aorta, A. carotis).<sup>[120]</sup> Jedoch wird der Aortenbogen nicht separat erwähnt, was den Vergleich mit den Ergebnissen von Leroux-Berger *et al.* erschwert. Alizarin-Rot gefärbte Präparate zusammenhängender Gefäßbäume (Aortenbogen bis Aa. femorales, inklusive Aa. renales) unterstützen die Ergebnisse beider Autoren: In ihnen konzentrieren sich die Kalziumablagerungen auf den Aortenbogen und die abdominale Aorta, inklu-

sive ihrer Abgänge. Die thorakale Aorta zeigt eine schwächere Färbung.<sup>[119,124]</sup> Die Erfahrungen der IPA lassen sich nur bedingt mit den Ergebnissen aus der Literatur vergleichen, da bislang lediglich die thorakale Aorta perfundiert wurde. Bisherige Ergebnisse lassen eine geringfügig stärkere Kalzifizierung der kranialen thorakalen Abschnitte gegenüber den weiter kaudal gelegenen thorakalen Abschnitten vermuten. Die Differenz ist mit den bislang erhobenen Daten jedoch nicht signifikant und müsste durch weitere Versuche überprüft werden. Die proximalen Kontrollstücke stammten vom Übergang Aortenbogen/thorakale Aorta. Ihr Kalziumgehalt schwankte deutlich. In Anlehnung an die Ergebnisse von Leroux-Berger *et al.*, dass der Aortenbogen stärker kalzifiziert als die thorakale Aorta, kann man vermuten, dass einige der proximalen Kontrollstücke aus dem Aortenbogen, andere aus dem proximalen Bereich der thorakalen Aorta stammten. Der Kalziumgehalt der kaudalen Kontrollstücke, welche aus dem kranialen Bereich der abdominalen Aorta stammten, erschien höher als der der proximalen Kontrollstücke, was den Ergebnissen von Leroux-Berger *et al.* widersprechen würde. Jedoch ist auch hier die Differenz nicht von statistischer Signifikanz und müsste durch weitere Versuche überprüft werden.

### 6.3 Limitierungen dieser Arbeit

Die gesetzten Ziele der Arbeit wurden erreicht: Das Modell der IPA konnte erfolgreich entwickelt und etabliert werden und es konnte gezeigt werden, dass sich mittels Hochphosphatmedium eine Kalzifizierung induzieren lässt. Jedoch gibt es Faktoren, deren Einfluss auf die Versuchsergebnisse noch untersucht werden muss. Des Weiteren bestehen zwei Fehlerquellen, die behoben werden sollten.

Die bisher gewonnenen Daten sind ausreichend, um mit statistischer Signifikanz die Kalzifizierung der Aorten zu belegen. Jedoch gibt es bislang nur 2 fehlerfreie Kontrollkammern und die histologischen Ergebnisse der Kalzifizierungskammern sind nicht zufriedenstellend. Daher sind weitere Versuche mit Kontrollmedium und Kalzifizierungsmedium notwendig, um eine breitere Datenbasis zu erhalten. Die Auswertung kryo-konservierter Proben steht noch aus. In ihnen könnten beispielsweise osteogene Marker bestimmt werden, um Hinweise bezüglich der osteochondrogenen Transdifferenzierung der VSMCs zu erhalten. In der Versuchsdurchführung gibt es Parameter, deren Einfluss noch untersucht werden muss. Die Flussrate der peristaltischen Pumpe wurde willkürlich gewählt. Es gilt zu klären,

ob und wie unterschiedliche Flussraten die Kalzifizierung beeinflussen. Dasselbe gilt für die Versuchsdauer. Eine kürzere Versuchsdauer wäre wünschenswert, um den Fortschritt zu beschleunigen. Die Qualität der Ergebnisse steht jedoch im Vordergrund, diese ließe sich möglicherweise durch eine verlängerte Perfusionsdauer noch verbessern.

Eine Fehlerquelle, die bislang nicht behoben werden konnte, waren bei Versuchsende nicht perfundierte Aorten. Trotz Überprüfung der Perfusion bei Versuchsbeginn gingen dadurch regelmäßig Ergebnisse verloren. Daher sollte dieses Problem behoben werden. Auch die Rostbildung stellt nach wie vor ein Risiko dar. Da die Ursache bekannt ist (Flüssigkeit im Kopf der Stellschraube), kann sie zwar weitestgehend vermieden werden (Vermeidung von Flüssigkeit im Kopf der Stellschraube), ganz ausschließen kann man sie in der momentan verwendeten Perfusionskammer jedoch nicht.

## 6.4 Ausblick

Die oben beschriebenen Limitierungen (nicht perfundierte Aorten, Korrosion von Versuchskammern mit Rostbildung) lassen sich mit der Konstruktion einer neuen Perfusionskammer beheben, welche sich bereits in Planung befindet. Die neue Kammer wird zu 100 % aus rostfreiem Edelstahl bestehen, sodass eine Rostbildung ausgeschlossen ist. Außerdem wird der Aufbau der Kammer modifiziert. Anstelle von bislang 6 parallel geschalteten Aortenanschlüssen wird es 4 voneinander getrennte Aortenanschlüsse geben. Jeder dieser Anschlüsse ist in einen separaten Kreislauf eingebunden, sodass keine Verbindung zwischen den eingespannten Aorten besteht. Dies bringt mehrere Vorteile mit sich: Zum einen wird ausgeschlossen, dass einzelne Aorten nicht perfundiert werden. Da jeder Kreislauf nur eine Aorta beinhaltet, muss das Medium durch diese Aorta hindurchfließen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, jeden Kreislauf mit einem anderen Medium zu perfundieren. Dies ermöglicht den direkten Vergleich von Kontrollaorten und Kalzifizierungsaorten aus einer Kammer. Wenn der Einfluss von Substanzen auf die Kalzifizierung untersucht wird, stehen Kontrollaorten aus derselben Kammer zum Vergleich zur Verfügung. Die parallele Perfusion mit einer Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen ist möglich, ebenso die parallele Perfusion mit verschiedenen Substanzen. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei bakterieller Kontamination des Perfusionsmediums nur eine Aorta betroffen ist. Die Abstände zwischen den Modulen

sind einzeln regulierbar, sodass unterschiedliche Längen der Aorten nicht mehr über die Länge der Venenkatheterschläuche ausgeglichen werden müssen. Nachteil der neuen Kammer wird sein, dass 4 separate Kreisläufe auch 4 Mediengläser und 4 Schlauchsysteme mit sich bringen. Dadurch wird der Zusammenbau der Kammer umständlicher, der Transport der Kammer von der Sterilbank in den Brutschrank schwieriger und der Platzbedarf im Brutschrank größer. Außerdem muss bei den Medienwechseln streng darauf geachtet werden, dass es zu keiner Verwechslung der Kreisläufe kommt. Aus diesen Gründen wurde die Anzahl der Aortenanschlüsse von 6 auf 4 reduziert. Insgesamt überwiegen die Vorteile der neu geplanten Kammer jedoch deutlich.

Sobald das Modell vollständig etabliert ist, soll es zur Untersuchung der medialen vaskulären Kalzifizierung eingesetzt werden. Hierbei wird zunächst die Frage im Vordergrund stehen, welche Rolle das Endothel bei der Kalzifizierung spielt, bzw. wie sich ein defektes Endothel auf die Kalziueinlagerung auswirkt. Hierzu muss zunächst eine Methode zur Beschädigung des Endothels etabliert werden. Eine Möglichkeit wäre eine chemische Schädigung, beispielsweise durch Perfusion mit TritonX, einem Detergenz, welches den Verbund von Membranproteinen löst. Ebenso vorstellbar wäre eine mechanische Schädigung mittels einer Fadenschleife, angelehnt an die oben beschriebene Methode von Fingerle *et al.*<sup>[137]</sup> Die Funktionalität des Endothels nach Beschädigung soll mittels Kleingefäßmyograph, engl. *Small vessel myograph* (SVM) überprüft werden. Dabei handelt es sich um eine physiologische Messmethode, mit welcher die Spannung eines isolierten Gefäßringes gemessen wird.<sup>[150]</sup> Ein beschädigtes Endothel führt zu einer verminderten Freisetzung von Stickstoffmonoxid, was die Dilatationsfähigkeit eines Gefäßes einschränkt und mittels SVM detektiert werden kann. Eine eingeschränkte Dilatationsfähigkeit lässt also auf ein beschädigtes Endothel schließen. Sobald eine zuverlässige Methode zur Beschädigung des Endothels etabliert ist, werden Aorten mit defektem Endothel als IPA eingesetzt und der Einfluss auf ihre Kalzifizierung untersucht. Da möglicherweise nicht nur das Endothel, sondern auch eine beschädigte Aortenwand als Ganzes einen Einfluss auf die Kalzifizierung hat,<sup>[76]</sup> ist ein möglicher weiterer Schritt, nicht nur gezielt das Endothel, sondern die gesamte Aortenwand zu schädigen. Dies könnte beispielsweise mit Hilfe eines Ballonkatheters, angelehnt an die Methode von Clowes *et al.*, geschehen,<sup>[151]</sup> oder durch Abreiben der Aorta mit einem Wattestäbchen, wie von Lomashvili *et al.* beschrieben.<sup>[76]</sup> Ein anderer bislang wenig untersuchter Aspekt ist das Verteilungsmuster

der Kalzifizierung in der Aorta. Um dieser Fragestellung weiter nachzugehen, wäre die Perfusion eines längeren Aortenabschnittes interessant. Die Verwendung der abdominalen Aorta sollte möglich sein. Ob Aa. iliacae, Aa. femorales und Aa. renales verwendet werden können, muss geprüft werden. Lediglich die Perfusion des Aortenbogens ist nicht möglich, da die Enden der Aorta (und damit zwangsläufig der Aortenbogen) auf dem Venenkatheterschlauch aufliegen und somit nicht zur Auswertung zur Verfügung stehen.

Neben diesen neuen Ansätzen, welche durch das Modell erst möglich werden, lassen sich auch klassische Ansätze aus der Zellkultur auf die IPA übertragen. So kann man das Modell nutzen, um den Einfluss von Substanzen auf die Kalzifizierung zu untersuchen. Es stellt eine sinnvolle Ergänzung zu etablierten *in vivo*- und *ex vivo*-Modellen dar. Der Vorteil liegt darin, dass die IPA mit ihrem zusammenhängenden Gewebeverband den physiologischen Zuständen im Körper stärker ähnelt, als es bei isolierten Zellen und Aortenringen der Fall ist. Ursprünglich war eine Übertragung des Modells auf Mausearten geplant, um die große Anzahl von genetisch veränderten Mausmodellen nutzen zu können. Dies scheint mit den bestehenden Erfahrungen bezüglich der Aortenpräparation aufgrund der deutlich geringeren Größe der Mausearten jedoch schwierig. Einer Verwendung von Aorten spezieller Rattenstämme, beispielsweise von  $Cy^{+/}$ -Ratten, welche eine polycystische Nierenerkrankung entwickeln<sup>[152,153]</sup> oder von spontan hypertensiven Ratten,<sup>[154]</sup> steht nichts im Wege. Letztendlich wäre auch eine Nutzung des Modells über die Erforschung der medialen vaskulären Kalzifizierung hinaus denkbar. Die IPA könnte zur Untersuchung anderer vaskulärer Veränderungen oder Prozesse eingesetzt werden, beispielsweise der intimalen Kalzifizierung oder der Gefäßregeneration.

# 7 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung des *ex vivo*-Modells der IPA. Es soll zur Untersuchung der medialen vaskulären Kalzifizierung eingesetzt werden und insbesondere zur Klärung der Frage beitragen, welche Rolle das Endothel dabei spielt. Dieses Ziel wurde erreicht. Die Methoden wurden neu entwickelt, bzw. angepasst und optimiert. Hierzu zählten unter anderem die Präparation der Aorten, die Zusammensetzung der Medien, der Zusammenbau und die Handhabung der Perfusionskammer und der Versuchsablauf, inklusive Medienwechsel. Insbesondere im Rahmen des Versuchsablaufs wurden verschiedene Fehlerquellen identifiziert und behoben. In einigen Punkten besteht noch Optimierungsbedarf oder -potential, unter anderem in der Konstruktion der Perfusionskammer. In anderen Punkten wäre eine Überprüfung, inwiefern bestimmte Parameter die Ergebnisse beeinflussen, sinnvoll. Hierzu zählen die Einstellung der peristaltischen Pumpe und die Versuchsdauer. Das Modell ist dennoch in seinem jetzigen Entwicklungsstand einsatzbereit.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich in der IPA mittels Perfusion mit Kalzifizierungsmedium eine mediale Kalzifizierung der Aortenwand induzieren lässt. Die Ergebnisse der quantitativen Kalziummessung weisen eine signifikante Differenz im Kalziumgehalt zwischen mit Kalzifizierungsmedium und Kontrollmedium perfundierten Aorten auf. Obwohl die Daten statistisch belastbar sind, ist eine größere Anzahl von Versuchen sinnvoll, um eine breitere, noch aussagekräftigere Datenbasis zu schaffen. Die Ergebnisse der histologischen Kalziumnachweise sind bislang nicht zufriedenstellend, da sie häufig nicht mit den quantitativen Ergebnissen korrelieren. Dennoch haben sie bereits wertvolle Erkenntnisse geliefert: In der IPA sind die Kalziumablagerungen ausschließlich in der Media lokalisiert, im Gegensatz zu *ex vivo* kalzifizierten Aortenringen, in welchen sie sich diffus in allen Wandschichten verteilen. Somit spiegelt die IPA physiologische Verhältnisse besser wieder, als bislang bestehende Zellkulturmodelle der medialen vaskulären Kalzifizierung.



# 8 Zusammenfassung

## Die isoliert perfundierte Rattenaorta: Etablierung eines *ex vivo*-Modells zur Untersuchung der medialen vaskulären Kalzifizierung

Die mediale vaskuläre Kalzifizierung, auch Arteriosklerose genannt, spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Sie tritt gehäuft bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen auf, wo sie mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert ist. Entgegen früheren Ansichten handelt es sich um einen aktiv regulierten Prozess, welcher durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Ein bislang wenig untersuchter Faktor ist die Rolle des Endothels. Zur Erforschung der Gefäßverkalkung stehen mehrere *in vitro*-, *ex vivo*- und *in vivo*-Modelle zur Verfügung, in welchen mit unterschiedlichen Methoden eine vaskuläre Kalzifizierung induziert wird. Jedoch weist jedes der bestehenden Modelle gewissen Nachteile auf.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines neuartigen physiologischen *ex vivo*-Modells: Der Isoliert perfundierten Aorta (IPA). Rattenaorten wurden in eine Perfusionskammer eingespannt, in einen Kreislauf eingebunden und für 14 Tage mit Zellkulturmedium perfundiert. Die Kalzifizierung wurde durch Zusätze im Medium induziert. Es zeigte sich, dass die IPA die physiologischen Bedingungen besser widerspiegelt als bestehende *in vitro*- und *ex vivo*-Modelle und zugleich tierschonender ist als *in vivo*-Modelle. Zudem ermöglicht es aufgrund der guten Zugänglichkeit die Untersuchung der Rolle des Endothels bei der medialen Gefäßverkalkung.

Der erste Schritt war die Entwicklung und Optimierung der Methoden. Es wurde eine Technik zur schonenden Aortengewinnung und -präparation entwickelt, die Medien wurden in ihrer Zusammensetzung optimiert und der Versuchsaufbau wurde entwickelt und optimiert, ebenso der Versuchsablauf. Nach erfolgreicher Entwicklung des Modells wurde untersucht, ob sich in der IPA mittels Kalzifizierungsmedium eine mediale Kalzifizierung induzieren ließ. Hierfür wurden Versuche mit Kontrollmedium und Kalzifizierungsmedium durchgeführt. Ausgewertet wurden 12 Aorten aus 4 Kalzifizierungsversuchen und 9 Aorten aus 3 Kontrollversuchen. Der Kalziumgehalt der Aorten wurde photometrisch quantifiziert und histologisch mit Färbungen zum Kalziumnachweis untersucht. Der mittlere Kalziumgehalt der Aorten aus Kontrollversuchen lag bei 1,68 µg/mg. In Kalzifizie-

rungsversuchen stieg er auf 4,42  $\mu\text{g}/\text{mg}$  an. Die Differenz war signifikant. Es ist also möglich im Modell der IPA eine mediale Kalzifizierung der Aortenwand zu induzieren. Die Histologie unterstützte dieses Ergebnis. Sie zeigte zudem, dass die Kalziueinlagerungen in den IPAs medial lokalisiert waren. Dies entsprach den Vorgängen *in vivo*, im Gegensatz zu *ex vivo* kalzifizierten Kontrollen, in welchen die Kalziueinlagerungen unselektiv in allen Wandschichten lokalisiert waren. Mit der IPA wurde ein Modell zur Erforschung der medialen vaskulären Kalzifizierung entwickelt und etabliert. Es ermöglicht eine gezielte Manipulation und Untersuchung des Endothels und simuliert physiologische Bedingungen besser als bestehende *in vitro*- und *ex vivo*-Modelle.

## 9 Summary

### The isolated perfused rat aorta: Establishment of an *ex vivo*-model for the study of medial vascular calcification

Medial vascular calcification, also known as arteriosclerosis, plays a vital role in the development of cardiovascular diseases. It frequently occurs in patients with chronic renal disease, where it is associated with increased morbidity and mortality. Contrary to former opinions, medial vascular calcification is an actively regulated process, influenced by various factors. A so far poorly studied factor is the role of the endothelium. For studying vascular calcification, there are several *in vitro*-, *ex vivo*- and *in vivo*-models available in which vascular calcification is induced by different methods. However, each of these models shows certain disadvantages.

The goal of this thesis was the development and establishment of a novel physiological *ex vivo*-model: The Isolated Perfused Aorta (IPA). Rat aortas were placed in a perfusion chamber, integrated into a circular flow and perfused with cell culture medium for 14 days. Calcification was induced by substances added to the medium. It was found that the IPA imitates physiological conditions better than existing *in vitro*- and *ex vivo*-models and it burdens the animals less than *in vivo*-models. Due to its good accessibility it also allows to study the role of the endothelium in medial vascular calcification.

The first step was the development and optimization of methods. A technique for the gentle isolation and preparation of aortas was developed, the composition of perfusion media was optimized and the experimental design was developed and optimized, as well as the experimental process. After the successful development of the model it was examined, whether calcification could be induced by perfusion with a calcifying medium. Therefore, experiments with calcifying medium and control medium were performed. 12 aortas from 4 calcifying experiments and 9 aortas from 3 control experiments were analyzed. The amount of calcium in the aortas was quantified by photometric measurement and examined histologically by stainings for calcium detection. The average amount of calcium in aortas from control experiments was 1.68  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . In calcifying experiments it reached 4.42  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . The difference was significant. Thus, it is possible to induce a medial calcification of the aortic wall in the model of the IPA. Histology supported this result. Moreover, it showed that the incorporated calcium was located in the

media of the aortic wall. This corresponded with the processes *in vivo*, opposed to the *ex vivo* calcified controls, in which the calcium incorporations were located unselectively in all wall layers.

With the IPA, a model for studying the medial vascular calcification was developed and established. It allows the specific manipulation and investigation of the endothelium and it simulates physiological conditions better than established *in vitro*- and *ex vivo*-models.

# 10 Literaturverzeichnis

- [1] S. Mendis *et al.*, *Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control*, World health organization in collaboration with the world heart federation and the world stroke organization. technical report, **2011**.
- [2] Statistisches Bundesamt, *Anzahl der Gestorbenen nach ausgewählten Todesursachen 2011*, <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html>, **2013**.
- [3] P. Lanzer *et al.*, Medial vascular calcification revisited: review and perspectives, *European Heart Journal* **2014**, 1–14.
- [4] J. N. Czermak, Beschreibung und mikroskopische Untersuchung zweier ägyptischer Mumien, *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse* **9 1852**, 427–469.
- [5] J. Mönckeberg, Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose, *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* **1903**, 171, 141–167.
- [6] J. F. Lobstein, *Traité d’anatomie pathologique*, Berger-Levrault, **1829**.
- [7] F. Marchand, Über Arteriosklerose (Atherosklerose), *Verhand. Kongr. inn. Med.* **1904**, 21, 23.
- [8] G. Pickering, Arteriosclerosis and atherosclerosis: The need for clear thinking, *American Journal of Medicine* **1963**, 34, 7–18.
- [9] H. Hees, F. Sinowatz, *Histologie - Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopische Anatomie*, Deutscher Ärzte-Verlag, 4th ed., **2006**.
- [10] G. Schlieper *et al.*, Ultrastructural Analysis of Vascular Calcifications in Uremia, *Journal of the American Society of Nephrology* **2010**, 21, 689–696.
- [11] T. Sonou *et al.*, Mineral Composition of Phosphate-Induced Calcification in a Rat Aortic Tissue Culture Model, *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **2015**, 22, 1197–1206.
- [12] W. C. O’Neill, K. A. Lomashvili, Recent progress in the treatment of vascular calcification, *Kidney International* **2010**, 78, 1232–1239.
- [13] R. G. Micheletti *et al.*, Mönckeberg Sclerosis Revisited: A Clarification of the Histologic Definition of Mönckeberg Sclerosis, *Archives of pathology & laboratory medicine* **2008**, 132, 43–47.

- [14] S. Nakamura *et al.*, Coronary Calcification in Patients with Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Disease, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2009**, *4*, 1892–1900.
- [15] B. Castillo *et al.*, Mönckeberg’s sclerosis in temporal artery biopsy specimens, *British Journal of Ophthalmology* **1999**, *83*, 1091–1092.
- [16] A. Saxena *et al.*, Monckeberg medial calcific sclerosis mimicking malignant calcification pattern at mammography, *Journal of Clinical Pathology* **2005**, *58*, 447–448.
- [17] L. Niskanen *et al.*, Medial artery calcification predicts cardiovascular mortality in patients with NIDDM, *Diabetes Care* **1994**, *17*, 1252–1256.
- [18] S. Lehto *et al.*, Medial Artery Calcification: A Neglected Harbinger of Cardiovascular Complications in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **1996**, *16*, 978–983.
- [19] G. M. London *et al.*, Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2003**, *18*, 1731–1740.
- [20] J. Blacher *et al.*, Arterial Calcifications, Arterial Stiffness, and Cardiovascular Risk in End-Stage Renal Disease, *Hypertension* **2001**, *38*, 938–942.
- [21] E. Neven *et al.*, Cell biological and physicochemical aspects of arterial calcification, *Kidney International* **2011**, *79*, 1166–1177.
- [22] E. Aitken *et al.*, The Prognostic Significance of Iliac Vessel Calcification in Renal Transplantation, *Transplantation Proceedings* **2012**, *44*, 2925 – 2931.
- [23] J. Blacher *et al.*, Impact of Aortic Stiffness on Survival in End-Stage Renal Disease, *Circulation* **1999**, *99*, 2434–2439.
- [24] C. M. Shanahan *et al.*, Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate, *Circulation Research* **2011**, *109*, 697–711.
- [25] M. Sigrist *et al.*, Vascular calcification and cardiovascular function in chronic kidney disease, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2006**, *21*, 707–714.
- [26] C. J. Porter *et al.*, Detection of coronary and peripheral artery calcification in patients with chronic kidney disease stages 3 and 4, with and without diabetes, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2007**, *22*, 3208–3213.
- [27] P. Henry, R.M. nad Kostense *et al.*, Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study, *Kidney International* **2002**, *62*, 1402–1407.

- [28] A. S. Go *et al.*, Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization, *New England Journal of Medicine* **2004**, *351*, 1296–1305.
- [29] P. McCullough *et al.*, Determinants of coronary vascular calcification in patients with chronic kidney disease and end-stage renal disease: a systematic review, *Journal of Nephrology* **2004**, *17*, 205–215.
- [30] D. Yuen *et al.*, The natural history of coronary calcification progression in a cohort of nocturnal haemodialysis patients, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2006**, *21*, 1407–1412.
- [31] G. Jean *et al.*, Vascular Calcification Progression Is an Independent Predictor of Mortality in Patients on Haemodialysis, *Nephron* **2015**, *130*, 169–174.
- [32] C. M. Shanahan, Mechanisms of vascular calcification in CKD—evidence for premature ageing?, *Nature Reviews Nephrology* **2013**, *9*, 661–670.
- [33] W. G. Goodman *et al.*, Coronary-Artery Calcification in Young Adults with End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis, *New England Journal of Medicine* **2000**, *342*, 1478–1483.
- [34] M. M. Mitsnefes, Cardiovascular Disease in Children with Chronic Kidney Disease, *Journal of the American Society of Nephrology* **2012**, *23*, 578–585.
- [35] R. Foley, P. P.S, Cardiovascular disease and mortality in ESRD, *Journal of Nephrology* **1998**, *11*, 239–245.
- [36] M. Tonelli *et al.*, Chronic Kidney Disease and Mortality Risk: A Systematic Review, *Journal of the American Society of Nephrology* **2006**, *17*, 2034–2047.
- [37] M. J. Sarnak *et al.*, Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement From the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention, *Hypertension* **2003**, *42*, 1050–1065.
- [38] G. M. London *et al.*, Vascular Calcifications, Arterial Aging and Arterial Remodeling in ESRD, *Blood Purification* **2013**, *35*, 16–21.
- [39] A. P. Guérin *et al.*, Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2000**, *15*, 1014–1021.
- [40] H. H. Dao *et al.*, Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: Impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension, *Cardiovascular Research* **2005**, *66*, 307–317.

- [41] L. L. Demer, Y. Tintut, Vascular Calcification: Pathobiology of a Multifaceted Disease, *Circulation* **2008**, *117*, 2938–2948.
- [42] R. Essalihi *et al.*, A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment, *American Journal of Hypertension* **2003**, *16*, 103–110.
- [43] W. W. Nichols, B. M. Singh, Augmentation index as a measure of peripheral vascular disease state, *Current Opinion in Cardiology* **2002**, *17*, 543–551.
- [44] J. A. Chirinos, P. Segers, Noninvasive Evaluation of Left Ventricular Afterload: Part 1: Pressure and Flow Measurements and Basic Principles of Wave Conduction and Reflection, *Hypertension* **2010**, *56*, 555–562.
- [45] J. A. Chirinos, P. Segers, Noninvasive Evaluation of Left Ventricular Afterload: Part 2: Arterial Pressure-Flow and Pressure-Volume Relations in Humans, *Hypertension* **2010**, *56*, 563–570.
- [46] G. Soldatos *et al.*, Large artery biomechanics and diastolic dysfunction in patients with Type 2 diabetes, *Diabetic Medicine* **2011**, *28*, 54–60.
- [47] W. J. Paulus, C. Tschöpe, A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Comorbidities Drive Myocardial Dysfunction and Remodeling Through Coronary Microvascular Endothelial Inflammation, *Journal of the American College of Cardiology* **2013**, *62*, 263 – 271.
- [48] G. London, Arterial calcification: cardiovascular function and clinical outcome, *Nefrologia* **2011**, *31*, 644–647.
- [49] C. Vlachopoulos *et al.*, Prediction of Cardiovascular Events and All-Cause Mortality With Arterial Stiffness: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Journal of the American College of Cardiology* **2010**, *55*, 1318–1327.
- [50] S. S. DeLoach, R. R. Townsend, Vascular Stiffness: Its Measurement and Significance for Epidemiologic and Outcome Studies, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2008**, *3*, 184–192.
- [51] A. Adijiang *et al.*, Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2008**, *23*, 1892–1901.
- [52] N. D. Vaziri, Oxidative stress in uremia: Nature, mechanisms, and potential consequences, *Seminars in nephrology* **2004**, *24*, 469–473.
- [53] S. Yamada *et al.*, The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats: Important role of oxidative stress in the pathogenesis

- of vascular calcification in chronic kidney disease, *Journal of Bone and Mineral Research* **2012**, *27*, 474–485.
- [54] K. M. McCabe *et al.*, Dietary vitamin K and therapeutic warfarin alter the susceptibility to vascular calcification in experimental chronic kidney disease, *Kidney International* **2013**, *83*, 835–844.
- [55] G. A. Block *et al.*, Mineral Metabolism, Mortality, and Morbidity in Maintenance Hemodialysis, *Journal of the American Society of Nephrology* **2004**, *15*, 2208–2218.
- [56] M. Ohnishi *et al.*, In Vivo Genetic Evidence for Suppressing Vascular and Soft-Tissue Calcification Through the Reduction of Serum Phosphate Levels, Even in the Presence of High Serum Calcium and 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels, *Circulation: Cardiovascular Genetics* **2009**, *2*, 583–590.
- [57] J. L. Finch *et al.*, Phosphate restriction significantly reduces mortality in uremic rats with established vascular calcification, *Kidney International* **2013**, *84*, 1145–1153.
- [58] M. S. Razzaque, Phosphate Toxicity and Vascular Mineralization, *Contributions to Nephrology* **2013**, *180*, 74–85.
- [59] A. P. Sage *et al.*, Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro, *Kidney International* **2011**, *79*, 414–422.
- [60] A. E. Ewence *et al.*, Calcium Phosphate Crystals Induce Cell Death in Human Vascular Smooth Muscle Cells: A Potential Mechanism in Atherosclerotic Plaque Destabilization, *Circulation Research* **2008**, *103*, e28–e34.
- [61] J. L. Reynolds *et al.*, Human Vascular Smooth Muscle Cells Undergo Vesicle-Mediated Calcification in Response to Changes in Extracellular Calcium and Phosphate Concentrations: A Potential Mechanism for Accelerated Vascular Calcification in ESRD, *Journal of the American Society of Nephrology* **2004**, *15*, 2857–2867.
- [62] J. L. Reynolds *et al.*, Multifunctional Roles for Serum Protein Fetuin-A in Inhibition of Human Vascular Smooth Muscle Cell Calcification, *Journal of the American Society of Nephrology* **2005**, *16*, 2920–2930.
- [63] D. Proudfoot *et al.*, Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification In Vitro: Evidence for Initiation of Vascular Calcification by Apoptotic Bodies, *Circulation Research* **2000**, *87*, 1055–1062.

- [64] E. Aikawa *et al.*, Arterial and Aortic Valve Calcification Abolished by Elastolytic Cathepsin S Deficiency in Chronic Renal Disease, *Circulation* **2009**, *119*, 1785–1794.
- [65] N. Hosaka *et al.*, Elastin Degradation Accelerates Phosphate-Induced Mineralization of Vascular Smooth Muscle Cells, *Calcified Tissue International* **2009**, *85*, 523–529.
- [66] M. Mizobuchi *et al.*, Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease, *Journal of the American Society of Nephrology* **2009**, *20*, 1453–1464.
- [67] T. Sallam *et al.*, Regulatory circuits controlling vascular cell calcification, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2013**, *70*, 3187–3197.
- [68] S. Liabeuf *et al.*, Cardiovascular calcification inhibitors, *Annales de biologie clinique* **2015**, *73*, 315–322.
- [69] C. Schäfer *et al.*, The serum protein  $\alpha$ 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification, *The Journal of Clinical Investigation* **2003**, *112*, 357–366.
- [70] M. Schoppet *et al.*, Serum fetuin-A levels and abdominal aortic calcification in healthy men - The STRAMBO study, *Bone* **2015**, *79*, 196–202.
- [71] P. A. Price *et al.*, Mineralization by Inhibitor Exclusion: The calcification of collagen with fetuin, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 17092–17101.
- [72] G. Luo *et al.*, Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein, *Nature* **1997**, *386*, 78–81.
- [73] Y. Yao *et al.*, Inhibition of Bone Morphogenetic Proteins Protects Against Atherosclerosis and Vascular Calcification, *Circulation Research* **2010**, *107*, 485–494.
- [74] L. J. Schurgers *et al.*, Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2007**, *5*, 2503–2511.
- [75] M. Roy, S. Nishimoto, Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity, *Bone* **2002**, *31*, 296–302.
- [76] K. A. Lomashvili *et al.*, Phosphate-Induced Vascular Calcification: Role of

- Pyrophosphate and Osteopontin, *Journal of the American Society of Nephrology* **2004**, *15*, 1392–1401.
- [77] D. Harmey *et al.*, Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank, *The American Journal of Pathology* **2004**, *164*, 1199–1209.
- [78] K. Johnson *et al.*, Chondrogenesis Mediated by PPi Depletion Promotes Spontaneous Aortic Calcification in NPP1<sup>-/-</sup> Mice, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2005**, *25*, 686–691.
- [79] D. A. Towler, Inorganic Pyrophosphate: A Paracrine Regulator of Vascular Calcification and Smooth Muscle Phenotype, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2005**, *25*, 651–654.
- [80] A. Boskey *et al.*, Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel, *Bone and Mineral* **1993**, *22*, 147–159.
- [81] M. Chellaiah, K. Hruska, The Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 and CD44 Regulate the Actions of Osteopontin on Osteoclast Motility, *Calcified Tissue International* **2003**, *72*, 197–205.
- [82] Y. Tintut *et al.*, Multilineage Potential of Cells From the Artery Wall, *Circulation* **2003**, *108*, 2505–2510.
- [83] V. Iyemere *et al.*, Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification, *Journal of Internal Medicine* **2006**, *260*, 192–210.
- [84] C. M. Giachelli *et al.*, Regulation of Vascular Calcification: Roles of Phosphate and Osteopontin, *Circulation Research* **2005**, *96*, 717–722.
- [85] S. A. Steitz *et al.*, Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification: Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers, *Circulation Research* **2001**, *89*, 1147–1154.
- [86] Z.-Y. Xia *et al.*, Runx2/miR-3960/miR-2861 Positive Feedback Loop Is Responsible for Osteogenic Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells, *BioMed Research International* **2015**, *Epub 2015*, Article ID 624037.
- [87] X. Li, C. M. Giachelli, Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification, *Current Opinion in Nephrology & Hypertension* **2007**, *16*, 325–328.

- [88] C. H. Byon *et al.*, Oxidative Stress Induces Vascular Calcification through Modulation of the Osteogenic Transcription Factor Runx2 by AKT Signaling, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 15319–15327.
- [89] S. Narisawa *et al.*, Novel Inhibitors of Alkaline Phosphatase Suppress Vascular Smooth Muscle Cell Calcification, *Journal of Bone and Mineral Research* **2007**, *22*, 1700–1710.
- [90] K. Lomashvili *et al.*, Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: Potential mechanism for uremic vascular calcification, *Kidney International* **2008**, *73*, 1024–1030.
- [91] M. Wu *et al.*, Vascular Calcification: An Update on Mechanisms and Challenges in Treatment, *Calcified Tissue International* **2013**, *93*, 365–373.
- [92] A. Bargnoux *et al.*, Biomarkers of vascular calcifications: the osteoprotegerin/RANK/RANK L axis, *Annales de biologie clinique* **2015**, *73*, 289–298.
- [93] I. B. Wilkinson *et al.*, Nitric Oxide Regulates Local Arterial Distensibility In Vivo, *Circulation* **2002**, *105*, 213–217.
- [94] M. Schmitt *et al.*, Basal NO Locally Modulates Human Iliac Artery Function In Vivo, *Hypertension* **2005**, *46*, 227–231.
- [95] C. M. McEniery *et al.*, Endothelial Function Is Associated With Pulse Pressure, Pulse Wave Velocity, and Augmentation Index in Healthy Humans, *Hypertension* **2006**, *48*, 602–608.
- [96] Y. Kanno *et al.*, Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- $\beta$  signalling, *Cardiovascular Research* **2008**, *77*, 221–230.
- [97] N. Mody *et al.*, Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells, *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *31*, 509–519.
- [98] M. Schuchardt *et al.*, Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances in vitro vascular calcification, *Kidney International* **2012**, *81*, 256–265.
- [99] J. Prüfer *et al.*, Harmful Effects of the Azathioprine Metabolite 6-Mercaptopurine in Vascular Cells: Induction of Mineralization, *PLoS One* **2014**, *9*, e101709.
- [100] A. Shioi *et al.*,  $\beta$ -Glycerophosphate Accelerates Calcification in Cultured Bovine Vascular Smooth Muscle Cells, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **1995**, *15*, 2003–2009.

- [101] R.-R. Cui *et al.*, MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo, *Cardiovascular Research* **2012**, *96*, 320–329.
- [102] Y. Zhou *et al.*, Overexpression of C1q/Tumor Necrosis Factor-Related Protein-3 Promotes Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Both In Vivo and In Vitro, *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* **2014**, *34.*, 1002–1010.
- [103] K. Mori *et al.*, Dexamethasone Enhances In Vitro Vascular Calcification by Promoting Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **1999**, *19*, 2112–2118.
- [104] A. Montes de Oca *et al.*, Magnesium Inhibits Wnt/ $\beta$ -Catenin Activity and Reverses the Osteogenic Transformation of Vascular Smooth Muscle Cells, *PLoS One* **2014**, *9*, e89525.
- [105] M. Leroux-Berger *et al.*, Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin, *Journal of Bone and Mineral Research* **2011**, *26*, 1543–1553.
- [106] E. Neven, P. C. D’Haese, Vascular Calcification in Chronic Renal Failure: What Have We Learned From Animal Studies?, *Circulation Research* **2011**, *108*, 249–264.
- [107] N. Shobeiri *et al.*, Vascular Calcification in Animal Models of CKD: A Review, *American Journal of Nephrology* **2010**, *31*, 471–481.
- [108] A. Chanutin, E. Ferris, Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy: I. control diet, *Archives of Internal Medicine* **1932**, *49*, 767–787.
- [109] J. Sancho *et al.*, A new experimental model for secondary hyperparathyroidism, *Surgery* **1989**, *106*, 1002–1008.
- [110] S. R. Vercauteren *et al.*, Chronic Reduction in Renal Mass in the Rat Attenuates Ischemia/Reperfusion Injury and Does Not Impair Tubular Regeneration, *Journal of the American Society of Nephrology* **1999**, *10*, 2551–2561.
- [111] N. Koleganova *et al.*, A calcimimetic (R-568), but not calcitriol, prevents vascular remodeling in uremia, *Kidney International* **2009**, *75*, 60–71.
- [112] I. Lopez *et al.*, Calcimimetic R-568 Decreases Extraosseous Calcifications in Uremic Rats Treated with Calcitriol, *Journal of the American Society of Nephrology* **2006**, *17*, 795–804.

- [113] D. Haffner *et al.*, Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, *Journal of Hypertension* **2005**, *23*, 1067–1075.
- [114] I. Lopez *et al.*, The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats, *Kidney International* **2008**, *73*, 300–307.
- [115] M. Mizobuchi *et al.*, Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats, *Kidney International* **2007**, *72*, 709–715.
- [116] J. B. Wyngaarden, J. T. Dunn, 8-Hydroxyadenine as the intermediate in the oxidation of adenine to 2,8-dihydroxyadenine by xanthine oxidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1957**, *70*, 150–156.
- [117] T. Yokozawa *et al.*, Animal model of adenine-induced chronic renal failure in ratsho, *Nephron* **1986**, *44*, 230–234.
- [118] H. Okada *et al.*, Reversibility of adenine-induced renal failure in rats, *Clinical and Experimental Nephrology* **1999**, *3*, 82–88.
- [119] P. Price *et al.*, Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate, *Kidney International* **2006**, *70*, 1577–1583.
- [120] N. Shobeiri *et al.*, Cardiovascular disease in an adenine-induced model of chronic kidney disease: the temporal link between vascular calcification and haemodynamic consequences, *Journal of hypertension* **2013**, *31*, 160–168.
- [121] M. M. El-Abbadi *et al.*, Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin, *Kidney International* **2009**, *75*, 1297–1307.
- [122] G. J. Becker, T. D. Hewitson, Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2013**, *28*, 2432–2438.
- [123] Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, *Guide for the care and use of laboratory animals*, The national academies Press, 8th ed., **2011**.
- [124] I. Matsui *et al.*, Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure, *Kidney International* **2009**, *75*, 915–928.

- [125] M. Mizobuchi *et al.*, Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2006**, *21*, 911–916.
- [126] J. Xu *et al.*, Magnesium modulates the expression levels of calcification-associated factors to inhibit calcification in a time-dependent manner., *Experimental and therapeutic medicine* **2015**, *9*, 1028–1034.
- [127] Y. H. Kang *et al.*, Long Term Effect of High Glucose and Phosphate Levels on the OPG/RANK/RANKL/TRAIL System in the Progression of Vascular Calcification in rat Aortic Smooth Muscle Cells, *The Korean journal of physiology & pharmacology* **2015**, *19*, 111–118.
- [128] G. R. Souza *et al.*, Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation, *Nature Nanotechnology* **2010**, *5*, 291–296.
- [129] M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture, *Biotechnology and Bioengineering* **2009**, *103*, 655–663.
- [130] D. Antoni *et al.*, Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo, *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, 5517–5527.
- [131] F. Castro-Chavez *et al.*, Effect of Lyso-phosphatidylcholine and Sphingosine-3 on Osteogenic Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells to Calcifying Vascular Cells in 3D Culture, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2013**, *1830*, 3828–3834.
- [132] C. M. McEniery *et al.*, Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo, *Journal of the American College of Cardiology* **2003**, *42*, 1975–1981.
- [133] A. Clowes *et al.*, Mechanisms of stenosis after arterial injury, *Laboratory investigation* **1983**, *49*, 208–215.
- [134] A. Clowes *et al.*, Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium, *Laboratory investigation* **1983**, *49*, 327–333.
- [135] A. Clowes, M. Clowes, Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. II. Inhibition of smooth muscle growth by heparin, *Laboratory investigation* **1985**, *52*, 611–616.
- [136] A. Clowes *et al.*, Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels, *Laboratory investigation* **1986**, *54*, 295–303.

- [137] J. Fingerle *et al.*, Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury., *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **1990**, *10*, 1082–1087.
- [138] J. L. Martin-Ventura *et al.*, Erythrocytes, leukocytes and platelets as a source of oxidative stress in chronic vascular diseases: Detoxifying mechanisms and potential therapeutic options, *Thrombosis and haemostasis* **2012**, *108*, 435–442.
- [139] J. E. Carter, Suture? Staple? Electrosurgery? How to Decide What is Best For You, *Society of Laparoendoscopic Surgeons* **1997**, *1*, 171–174.
- [140] G. Sankaranarayanan *et al.*, Common uses and cited complications of energy in surgery, *Surgical Endoscopy* **2013**, *27*, 3056–3072.
- [141] D. Zhu *et al.*, BMP-9 regulates the osteoblastic differentiation and calcification of vascular smooth muscle cells through an ALK1 mediated pathway, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2015**, *19*, 165–174.
- [142] N. X. Chen *et al.*, High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2006**, *21*, 3435–3442.
- [143] P. Ciceri *et al.*, Combined effects of ascorbic acid and phosphate on rat VSMC osteoblastic differentiation, *Nephrology Dialysis Transplantation* **2012**, *27*, 122–127.
- [144] M. Tölle *et al.*, Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney, *British Journal of Pharmacology* **2010**, *161*, 530–540.
- [145] L. F. Bonewald *et al.*, Von Kossa Staining Alone Is Not Sufficient to Confirm that Mineralization In Vitro Represents Bone Formation, *Calcified Tissue International* **2003**, *72*, 537–547.
- [146] O. Selinus, *Essentials of Medical Geology*, Springer, **2005**.
- [147] A. J. Chaplin, The histochemical demonstration of calcium with 8-hydroxyquinoline, *Histochemistry* **1976**, *46*, 269–271.
- [148] T. Walmsley, R. Fowler, Optimum use of 8-hydroxyquinoline in plasma calcium determinations., *Clinical Chemistry* **1981**, *27*, 1782.
- [149] K. Katsumata *et al.*, Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats, *Kidney International* **2003**, *64*, 441–450.

- [150] M. Tepel *et al.*, Diadenosine Polyphosphates' Action on Calcium and Vessel Contraction, *American Journal of Hypertension* **1997**, *10*, 1404–1410.
- [151] D. A. Tulis, Rat Carotid Artery Balloon Injury Model, *Methods in molecular medicine* **2007**, *139*, 1–30.
- [152] J. Kaspareit-Rittinghausen *et al.*, A new rat model for polycystic kidney disease of humans, *Transplantation proceedings* **1990**, *22*, 2582–2583.
- [153] J. Kaspareit-Rittinghausen *et al.*, Animal Model of Human Disease: Hereditary Polycystic Kidney Disease: Adult Polycystic Kidney Disease Associated with Renal Hypertension, Renal Osteodystrophy, and Uremic Enteritis in SPRD Rats, *American Journal of Pathology* **1991**, *139*, 693–696.
- [154] K. Kanemaru *et al.*, Calcification of Aortic Smooth Muscle Cells Isolated From Spontaneously Hypertensive Rats, *Journal of Pharmacological Sciences* **2008**, *106*, 280–286.



# Anhang

**Tabelle 10.1:** Anzahl an gestarteten Perfusionskammern.

		Kammern	Aorten
abgebrochen		5	11
beendet	fehlerhaft	5	15
	fehlerfrei	7	21
gesamt		17	47

**Tabelle 10.2:** Abgebrochene Perfusionskammern: IPA<sub>A1</sub> – IPA<sub>A5</sub>.

Kammer	Aorta	Laufdauer	Ursache für Abbruch
IPA <sub>A1</sub>	1	1 Tag	Technisches Problem mit dem Brutschrank
IPA <sub>A2</sub>	1	6 Tage	bakterielle Kontamination des Perfusionsmediums
	2		
IPA <sub>A3</sub>	1	5 Tage	bakterielle Kontamination des Perfusionsmediums
	2		
IPA <sub>A4</sub>	1	1 Tag	Verlust von Perfusionsmedium
	2		
IPA <sub>A5</sub>	1	1 Tag	Verlust von Perfusionsmedium
	2		
	3		
	4		
<b>5 St.</b>	<b>11 St.</b>		

**Tabelle 10.3:** Anzahl an Kontrollstücken in verschiedenen Medien.

	$K_0$	$K_T$	$K_{Kont}$	$K_{Kalz}$
$K_{prox}$	16	12	9	11
$K_{dist}$	16	12	9	11
gesamt	32 St.	24 St.	18 St.	22 St.

**Tabelle 10.4:** Beendete Kontrollkammern:  $IPA_{Kont1} - IPA_{Kont5}$ . Skala: + bis +++.

Allgemeines		Probleme			Auswertung	
Kammer	Aorta	Rost	Aorta verändert	Perfusion	möglich	
$IPA_{Kont1}$	1	+++	+++	?	-	
	2	+++	+++	?	-	
$IPA_{Kont2}$	1	++	++	✓	-	
	2	++	+	-	-	
$IPA_{Kont3}$	1	+	-	-	-	
	2	+	-	✓	-	
	3	+	-	-	-	
$IPA_{Kont4}$	1	-	-	✓	✓	
	2	-	-	-	-	
	3	-	-	✓	✓	
	4	-	-	✓	✓	
$IPA_{Kont5}$	1	-	-	✓	✓	
	2	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	
	4	-	-	✓	✓	
$IPA_{Kont6}$	1	-	-	✓	✓	
	2	-	-	✓	✓	
	3	-	-	✓	✓	
	4	-	-	✓	✓	
<b>6 St.</b>	<b>19 St.</b>				<b>9 St.</b>	

**Tabelle 10.5:** Beendete Kalzifizierungskammern:  $IPA_{\text{Kalz1}} - IPA_{\text{Kalz7}}$ . Skala: + bis +++.

Allgemeines		Probleme			Auswertung	
Kammer	Aorta	Rost	Aorta verändert?	Perfusion	möglich	
$IPA_{\text{Kalz1}}$	1	+	–	✓	–	
$IPA_{\text{Kalz2}}$	1	+	–	✓	–	
$IPA_{\text{Kalz3}}$	1	–	–	✓	✓	
	2	–	–	✓	✓	
	3	–	–	✓	✓	
	4	–	–	–	–	
$IPA_{\text{Kalz4}}$	1	–	–	✓	✓	
	2	–	–	✓	✓	
	3	–	–	✓	✓	
$IPA_{\text{Kalz5}}$	1	–	–	–	–	
	2	–	–	✓	✓	
	3	–	–	✓	✓	
	4	–	–	✓	✓	
$IPA_{\text{Kalz6}}$	1	–	–	✓	✓	
	2	–	–	✓	✓	
	3	–	–	–	–	
	4	–	–	✓	✓	
<b>6 St.</b>	<b>17 St.</b>				<b>12 St.</b>	



# Publikationen

- M. Schuchardt; **N. Siegel**; A. Reshetnik; M. Tölle; W. Zidek; M. van der Giet. „Isoliert-perfundierte Aorta: neues Modell zur Induktion der vasculären Kalzifizierung ex vivo“. (*6. Jahrestagung der DGfN*, 6.–9. September **2014**)
- M. Schuchardt; M. Tölle; **N. Siegel**; M. Babic, A. Reshetnik; W. Zidek; M. van der Giet. „Novel model to study vascular calcification ex vivo: The isolated-perfused aorta“. (*26th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection* der ESH, 10.–13. Juni **2016**)



# Danksagung

Herrn Prof. Dr. MARKUS VAN DER GIET danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgemeinschaft und die Bereitstellung des überaus interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. SALAH AMASHEH danke ich für die Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin und die unkomplizierte, angenehme Zusammenarbeit.

Bei Frau Dr. MIRJAM TÖLLE-SCHUCHARDT möchte ich mich für die Betreuung im Laboralltag bedanken, insbesondere für die lehrreichen Gespräche und die stets konstruktive Kritik.

Ein herzlicher Dank geht an die Technischen Angestellten der Arbeitsgruppe, NADINE NEITZEL für die geduldige Einarbeitung, BRIGITTE EGBERS für ihre fleißige Unterstützung und KATHARINA KUSCHFELDT.

Den aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen des Arbeitskreises, NICOLE AFFINASS, SARAH CHEBLI, ULRIKE BOSCH, CORNELIA HENKEL, JAQUELINE HERRMANN, HATUNA KALASCHJAN, JASMIN PRÜFER, NICOLE PRÜFER und MANDY STANSKE danke ich für die tolle Zusammenarbeit.

Ich danke allen weiteren Mitarbeitern, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, insbesondere unserer liebevollen Tierpflegerin und den Mitarbeiterinnen der Pathologie für die Bereitstellung ihrer Gerätschaften.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern ELKE und MICHAEL HOHL, auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte. Mein größter Dank gebührt meinem Mann DOMINIK für seine Liebe, sein Verständnis und seine Unterstützung in allen Lebenslagen.



# Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 08.07.2016

---

Nathalie Siegel