

Aus der Klinik für internistische Intensivmedizin und Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Vaskuläre Kalzifizierung – eine Diversifizierung der
experimentellen Methoden**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Milen Babic
aus Berlin

Datum der Promotion: 30.11.2023

**Meinen geliebten Eltern in tiefer Dankbarkeit für die Freiheit, auch in schwierigen
Zeiten, alle Wege beschreiten zu können**

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	6
Abstract	7
1. Einleitung	9
1.1. Systemische Vasculopathien	9
1.2. Vasculäre Alterung	9
1.3. Diagnostik und Therapie der mVK	12
1.4. Die Pathogenese des chronisch vasculären Inflammageings und der mVK	13
1.5. Zielsetzung	17
2. Material und Methodik	18
2.1. Publikation 1 und 2	20
2.2. Publikation 3	20
2.3. Publikation 4	21
2.4. Publikation 5	23
3. Ergebnisse	25
3.1. Publikation 1	25
3.2. Publikation 2	26
3.3. Publikation 3	28
3.4. Publikation 4	30
3.5. Publikation 5	32
4. Diskussion	34
4.1. Die Rolle von Zellstress für das (patho)physiologische vasculäre Altern	34
4.1. Die Fluoreszenzbasierte multiplex Methode zur Untersuchung des zeitlichen Zusammenhangs von mVK und Seneszenz	38
4.3. Die Rolle der Zell-Zell und Zell-EZM Interaktion für das (patho)physiologische vasculäre Altern und die Voraussetzungen für eine Modellimplementation.	39
4.4. Die isoliert perfundierte Rattenaorta als neues ex vivo Modell der mVK mit der Möglichkeit einer physiologischeren Endothel-Media-EZM Interaktion	41
5. Literaturverzeichnis	44
6. Eidesstattliche Versicherung	50
7. Anteilserklärung	51
8. Ausgewählte Publikationen	55
8.1. Publikation 1	56
8.2. Publikation 2	67
8.3. Publikation 3	90
8.4. Publikation 4	104
8.5. Publikation 5	111
9. Lebenslauf	123
10. Vollständige Publikationsliste	125
Danksagung	130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisch Darstellung der skizzierten Pathomechanismen der VK	16
Abbildung 2: Beiträge der einzelnen Publikationen zur Zielsetzung der Promotionsarbeit	17
Abbildung 3: Induktion der osteogenen Transdifferenzierung und mVK mit(+) / ohne(-) Azathioprinfütterung (Aza)	28
Abbildung 4: Merkmale vaskulären Alterns	29
Abbildung 5: Die Rolle des NLRP-3-Inflammasoms für die azathioprininduzierte mVK	30
Abbildung 6: Induktion der mVK und osteogenen Transdifferenzierung	31
Abbildung 7: Fusionsbilder der Fluoreszenzsignale nach Stimulation mit Uridin- Adenosintetraphosphat (Up4A, 100 µmol/ml) und Doxorubicin (500 nmol/ml) in primären glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten	33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der identifizierten Modelle und Induktoren der vaskulären Kalzifizierung sowie deren Limitationen	27
--	----

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Aa.	Arterien
Abb.	Abbildung
ALP	alkalische Phosphatase
ASC	<i>apoptosis-associated spec-like protein</i>
Aza	Azathioprin
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
CAM	Kalzifizierungsmedium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COM	Kontrollmedium
CT	Computertomographie
Doxorubicin	Dox
Dann	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
EZM	extrazelluläre Matrix
GAPD	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HRPT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1
IKK	Inhibitor der κ B Kinase
IPA	isoliert perfundierte Rattenaorta
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MGP	Matrix-Gla-Protein
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mVK	mediale vaskuläre Kalzifizierung
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NLPR3	<i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
OPN	Osteopontin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PWV	<i>pulse wave velocity</i> , Pulswellengeschwindigkeit
qPCR	<i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RUNX2/Cbfa1	<i>runt-related transcription-factor 2 / core-binding factor alpha</i>
SASP	<i>senescence associated secretory phenotype</i>
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte Betagalaktosidase
SM22 α	Smooth muscle protein 22 alpha
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF α	Tumor Nekrosefaktor alpha
Up4A	Uridin-Adenosin-Tetraphosphate
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion protein 1</i>
VK	vaskuläre Kalzifizierung
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i> , glatte Gefäßmuskelzelle
XO	Xanthinoxidase

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen tragen wesentlich zu Morbidität und Mortalität des Menschen bei und sind eine altersabhängige Erscheinung. Wesentliche Ursache sind die systemischen Vaskulopathien Atherosklerose und Arteriosklerose, die mit einer Kalzifizierung der Arterien einhergehen. Insbesondere die Kalzifizierung der *tunica media* ist histologisches Korrelat für sowohl das physiologische als auch pathologische, vorzeitige vaskuläre Altern. In den letzten Jahrzehnten sind einige Schlüsselmechanismen und Risikofaktoren identifiziert worden, deren genaues Zusammenspiel und einzelne Bedeutung noch nicht vollständig verstanden sind. Darüber hinaus existieren auch keine krankheitsübergreifenden therapeutischen Möglichkeiten, so dass das Ziel dieser Arbeit ist, zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie beizutragen und damit die Identifikation therapeutischer Ziele zu erleichtern. Im Rahmen zweier narrativer Reviews wurden die pathophysiologischen und methodischen Grundlagen der vaskulären Kalzifizierung in der Grundlagenwissenschaft erarbeitet und diese im Rahmen einer experimentellen Originalarbeit angewandt. Dabei wurden Ratten über 24 Wochen mit Azathioprin gefüttert und sein Einfluss auf die vaskuläre Kalzifizierung mittels Kalziumquantifizierung, *real-time* PCR und Alizarin-Rot Färbung untersucht. Für die nachgewiesene Azathioprin-induzierte Kalzifizierung konnte das NLRP-3 Inflammasom im Rahmen von *ex vivo* Versuchen mit NLRP-3 *knockout* Mäusen als kritischer Signalweg identifiziert und die Rolle von Zellstress für den vaskulären Alterungsprozess herausgearbeitet werden. Im Rahmen dieser Arbeiten ergaben sich bei den etablierten experimentellen Methoden eine eingeschränkte Beurteilbarkeit der örtlichen Kommunikation zwischen Endothel, glatten Gefäßmuskelzellen und der EZM sowie des zeitlichen Verlaufs zwischen Kalzifizierung und Gefäßalterung, so dass im Rahmen zweier weiterer experimenteller Originalarbeiten neue Methoden etabliert wurden: Das Modell der isoliert-perfundierten Rattenaorta, bei welchem explantierte Rattenaorten für 14 Tage extrakorporal mit Kontrollmedium bzw. einem Induktor der Kalzifizierung perfundiert werden, ermöglicht die Untersuchung der Kalzifizierungsprozesse in einem physiologischen, vaskulären Milieu. Zur besseren Untersuchbarkeit des zeitlichen Verlaufs von Kalzifizierung und Seneszenz wurden neue Protokolle zur Diversifizierung der Auswertungsmethoden mittels Immunhistochemie und RNA-in-situ-Hybridisierung etabliert, um die Expression von Markern der Seneszenz und

der Kalzifizierung parallel, aber Individualzell-basiert mittels Fluoreszenzmikroskopie zu messen. Mit dieser Disseration konnte die besondere Rolle von Zellstress für die Induktion der vaskulären Kalzifizierung am Beispiel von Azathioprin und ein zugehöriger Signalweg identifiziert werden und auf Basis der experimentellen Erfahrungen und Einsichten neue Modelle zur Untersuchung der vaskulären Kalzifizierung etabliert werden.

Abstract

Cardiovascular diseases contribute significantly to human morbidity and mortality and are an age-related phenomenon. The main causes are the systemic vasculopathies atherosclerosis and arteriosclerosis, which are associated with calcification of the arteries. In particular, calcification of the tunica media is a histological correlate of both physiological and pathological premature vascular aging. In recent decades, several key mechanisms and risk factors have been identified whose precise interplay and individual significance are not yet fully understood. In addition, cross-disease therapeutic options do not exist either, so the aim of this work is to contribute to a better understanding of the pathophysiology and thus facilitate the identification of therapeutic targets. In two narrative reviews, the pathophysiological and methodological basis of vascular calcification was elaborated and applied in the context of an original experimental work. In this work, rats were fed azathioprine for 24 weeks and its effect on vascular calcification was examined by calcium quantification, real-time PCR, and alizarin red staining. For the detected azathioprine-induced calcification, ex vivo experiments with NLRP-3 knockout mice identified the NLRP-3 inflammasome as a critical signaling pathway and elaborated the role of cell stress in the vascular aging process. In the course of this work, established methods revealed limited assessability of local communication between endothelium, vascular smooth muscle cells, and the extracellular matrix, as well as of the time course between calcification and vascular aging, so that new methods were established in the course of two additional original experimental studies: The isolated-perfused rat aorta model, in which explanted rat aortas are perfused extracorporeally with control medium or an inducer of calcification for 14 days, allows the study of calcification processes in a physiological, vascular milieu. To improve the ability to study the time course of calcification and senescence, new protocols were established to diversify the evaluation methods using immunohistochemistry and RNA in situ hybridization to measure the

expression of markers of senescence and calcification in a parallel but individual cell-based manner by fluorescence microscopy. This work identified the specific role of cell stress in the induction of vascular calcification by azathioprine and an associated signaling pathway and, based on experimental experience and insights, diversified the methodology for studying vascular calcification.

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit nicht nur die führende Todesursache und machten laut *World Health Organization* einen Anteil von 31 % im Jahr 2016 aus. In Anbetracht des Lebenszeitriskos von 46 % ab dem 30. Lebensjahr und dem verursachten Verlust von fast einem Viertel aller *disability adjusted life years* (verlorene gesunde Lebensjahre) in Europa wird auch ihre epidemiologische Bedeutung deutlich (1, 2). In der Vergangenheit sind zahlreiche Risikofaktoren identifiziert worden, von welchen einige beeinflussbar sind, wie beispielsweise Adipositas, Nikotinabusus, Dyslipidämien. Andere Risikofaktoren gelten als nicht beeinflussbar, wie die genetische Prädisposition und das Lebensalter. Auch chronische Krankheiten, wie eine chronische Niereninsuffizienz, eine arterielle Hypertonie oder ein Diabetes mellitus steigern das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Ursächlich für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität sind Erkrankungen vor allem der arteriellen Gefäße, die im Sinne einer systemischen Vaskulopathie die Funktionen vieler Organe beeinflussen.

1.1. Systemische Vaskulopathien

Bei den systemischen Vaskulopathien können die Atherosklerose und die Arteriosklerose als die beiden wichtigsten Entitäten unterschieden werden. Beide Entitäten können mit der Ausbildung vaskulärer Kalzifizierung (VK) einhergehen, welche bei der Arteriosklerose primär und bei der Atherosklerose sekundär entsteht. Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine Versteifung der Arterienwand, die infolge einer primären medialen vaskulären Kalzifizierung (mVK) entsteht. Diese tritt vor allem während der physiologischen Gefäßalterung auf und ist damit ein Alterungsphänomen (3). Die Atherosklerose hingegen kennzeichnet sich mechanistisch durch eine chronische Inflammation aufgrund einer pathologischen Lipidakkumulation, in deren Folge Plaques, welche sekundäre kalzifizieren können, vor allem in der *tunica intima* von Arterien entstehen (4). Während die Pathophysiologie dieser beiden Vaskulopathien prinzipiell unterschiedlich ist, bestehen aber auch gemeinsame Risikofaktoren, wie ein Diabetes mellitus oder die chronische Niereninsuffizienz, so dass bei den betroffenen Patienten auch eine Mischform beider vaskulärer Systemerkrankungen vorkommen kann.

1.2. Vaskuläre Alterung

Physiologische vaskuläre Alterung im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses

Altern ist der wichtigste kardiovaskuläre Risikofaktor. In den letzten Jahren setzte sich auf dem Feld der Alterungswissenschaften durch wachsende grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse die Hypothese durch, dass Altern Folge weniger Prozesse wie u.a. makromolekularen Schäden, veränderter Adaptation von Zellen an Stress, metabolischen Veränderungen und fehlerhafter Proteinsynthese ist, welche in der genannten chronischen Inflammation münden und umgekehrt durch Inflammation befeuert werden können (5). Während des physiologischen Alterungsprozesses entwickelt sich durch eine Überaktivität des angeborenen Immunsystems im Wesentlichen infolge dieser genannten Prozesse eine niedrig potente, aber chronisch anhaltende Inflammation (5). Den Zusammenhang zwischen dieser chronischen Inflammation und der vaskulären Alterung (*Ageing*) drückt der Begriff des „*Inflammageings*“ aus, dessen histologisches Korrelat die mVK darstellt. Gekennzeichnet ist das *Inflammageing* vor allem durch zelluläre Seneszenz, mitochondriale Dysfunktion und Aktivierung des Inflammasoms und Mechanismen infolge von DNA-Schäden, die das Überleben der Zelle kontrollieren (5).

Im Rahmen dieses (patho-)physiologischen *Inflammageings* kann es zu einem erheblichen Phänotypenwechsel vaskulärer Zellen kommen. Glatte Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) transdifferenzieren dabei von einem kontraktilen zu einem sekretorischen Phänotypen, welcher auch *senescence associated secretory phenotype* (SASP) genannt wird. Dieser SASP von VSMC kennzeichnet sich dabei neben der Expression von osteoblastischen Proteinen und inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β auch durch Seneszenzmarker wie p21 (6) und trägt wesentlich zur Verkalkung der *tunica media* bei (7). Die Folge ist eine Abnahme der vaskulären Compliance im arteriellen System und eine zunehmende Gefäßsteifigkeit, die mit einem Anstieg der Pulswellengeschwindigkeit (PWV) einhergeht. Bei guter vaskulärer Compliance, also einer physiologischen Elastizität des arteriellen Systems, wird die PWV abgemildert, so dass die retrograde Pulswelle, die im Wesentlichen durch Reflektion an arteriellen Bifurkationen entsteht, erst zu Beginn der Diastole in den Aortenbogen zurückläuft und damit den koronare Perfusionsdruck erhöht. Dadurch wird die kardiale Durchblutung und Sauerstoffversorgung optimiert. Mit abnehmender vaskulärer Compliance läuft die retrograde Pulswelle aufgrund der erhöhten PWV bereits in der Systole zurück; dadurch steigt der systolische Blutdruck, während der diastolische sich vermindert. Die Belastung des Myokards steigt dabei durch den erhöhten peripheren Widerstand, den ein erhöhter

systolischer Blutdruck zur Folge hat, und durch eine verminderte koronare Perfusion während der Diastole. Das zunehmende Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot spiegelt sich im Alter klinisch häufig in einer manifesten Herzinsuffizienz wider (8, 9). Diese (patho-)physiologische Alterung des vaskulären Systems ist eine sehr bedeutende Ursache für die hohe kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität im Alter (10).

Pathologische vaskuläre Alterung im Rahmen von Erkrankungen

Im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen kann diese vaskuläre Alterung durch ein chronisches, pathologisches *Inflammaging* vorzeitig einsetzen.

Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz und vor allem Dialysepatienten zeichnen sich durch ein höheres kardiovaskuläres Risiko gegenüber der Normalbevölkerung aus (11), für welche eine höhere Prävalenz der mVK als ursächlich angesehen wird (12). Tatsächlich zeigen die Arterien dialysepflichtige Kinder einen erhöhten oxidativen Schaden an der Desoxyribonukleinsäure (DNA) von VSMC und vorzeitige Seneszenz (6). Mit abnehmender Nierenfunktion kommt es multifaktoriell unter anderem durch eine konsekutive Zunahme von Urämietoxinen, oxidativem Stress, Veränderungen im Volumenhaushalt und seiner Regulation sowie der Immunogenität von beispielsweise Dialysemembranen zu einer anhaltenden Entzündungssituation (13); dieses erhöhte systemische Entzündungsniveau, das typisch für alte Menschen und Korrelat des *Inflammaging*s ist, tritt bereits in früheren Stadien der chronischen Niereninsuffizienz auf (14, 15). Damit gilt die chronische Niereninsuffizienz mittlerweile als Modellkrankheit für ein vorzeitiges vaskuläres Altern. Die resultierende mVK kann in dieser Patientengruppe zusätzlich auf besondere Risikofaktoren wie einen gestörten Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel zurückgeführt werden, der nicht nur zur Transdifferenzierung von VSMC zum sekretorischen, osteoblastischen Phänotypen, sondern *in vivo* auch zu Zeichen des vorzeitigen Alterns führen kann (16, 17). Beim Diabetes mellitus handelt es sich ebenfalls um einen Zustand mit chronisch-systemischer Inflammation, die zu vorzeitigen Alterungserscheinungen und einer erhöhten Last an mVK führt und unabhängig zum kardiovaskulären Risiko dieser Patienten beiträgt (18, 19). Konversionspunkt dieser grundverschiedenen Ursachen und Stressoren sind u.a. Schäden an DNA und Makromolekülen vaskulärer Zellen und die Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) und damit des angeborenen Immunsystems, über welche die chronische Inflammation entsteht (5). Für

vaskuläre Zellen konnte als kritischer PRR das NLRP-3 Inflammasom identifiziert werden (20).

Die mVK ist somit als Korrelat vaskulären Alters sowohl eine natürliche, altersabhängige Erscheinung als auch Folge einer metabolischen Dysregulation, beispielsweise im Sinne einer Urämie oder eines veränderten Kalziumphosphatstoffwechsels.

1.3. Diagnostik und Therapie der mVK

Die Detektion der mVK und damit des vaskulären Alters hat zum jetzigen Zeitpunkt in der klinischen Praxis keinen festen Stellenwert. Als Goldstandard zur Detektion der altersabhängigen Zunahme arterieller Steifheit gilt die Messung der PWV im Bereich der Aorta, welche den größten Anteil an der Gesamtcompliance des Gefäßsystems ausmacht (21). Die aortoiliakale Pulswellengeschwindigkeit wird dabei auf der Strecke zwischen Karotiden und der Femoralarterie ermittelt und an der Körperoberfläche abgeschätzt, so dass die Messung Ungenauigkeiten unterliegt. Im klinischen Alltag wird diese Messung aber beispielsweise von der *European Society of Hypertension* aufgrund des erhöhten Aufwands im Vergleich zur Ermittlung der übrigen kardiovaskulären Risikofaktoren nicht für die Routine empfohlen, obwohl der erhöhte prognostische Wert unbestritten ist (22). Darüber hinaus kann zur Visualisierung der Kalziumphosphatablagerungen aufgrund ihrer Dichte Röntgenstrahlung eingesetzt werden. Dabei macht die Dynamik der Gefäßwände *in vivo* die höhere Auflösung der Computertomographie (CT) für eine Quantifizierung notwendig. Während die Mehrschicht-CT im Rahmen von Studien durch Punktesysteme eine präzise Diagnostik der Kalzifizierung von Koronararterien erlaubt (23), stehen der klinischen Anwendung die Verfügbarkeit, die Kosten und Strahlenbelastung entgegen. Klare therapeutische Empfehlungen oder effektive Therapien für den vaskulären Alterungsprozess existieren nicht. Mit begrenztem Erfolg können Medikamente eingesetzt werden, die über unterschiedliche Mechanismen die Phosphat- und zum Teil Kalziumkonzentration im Blut senken können. Dazu gehören Phosphatbinder und Kalziummimetika, die durch eine reduzierte Freisetzung von Parathormon aus der Nebenschilddrüse die Freisetzung von Kalzium und Phosphat aus den Knochen hemmen und der mVK entgegenwirken können. Wenn auch ein besseres Verständnis der (Patho)physiologie des vaskulären Alterns zu einigen translationalen, experimentellen Ansätze geführt hat, fehlen krankheitsübergreifende kausale Therapiemöglichkeiten für die mVK (9).

1.4. Die Pathogenese des chronisch vaskulären *Inflammageings* und der mVK.

Bereits von Rudolph Virchow wurde die mVK als passiver, altersabhängiger Prozess, welcher durch die Ablagerung von Hydroxylapatit – der im Menschen überwiegend vorkommenden Form eines Kalziumphosphatminerals – gekennzeichnet sei, betrachtet und schon 1856 durch den Begriff der „Arteriosklerose“ eingeführt (24).

Etwa mit der letzten Jahrtausendwende wurde deutlich, dass es sich bei der mVK aber um einen aktiv regulierten Prozess unter Beteiligung von VSMC handelt, welcher Parallelen zur Osteogenese aufweist und im Falle der Arteriosklerose in der Ablagerung von Hydroxylapatit insbesondere entlang der elastischen Fasern der *tunica media* mündet (25). Die Pathogenese der Arteriosklerose ist multifaktoriell und wie an den Risikofaktoren einer vorzeitigen vaskulären Alterung deutlich wird, können verschiedenste Stoffwechselsituationen in dem klinischen Bild der mVK münden; die wichtigsten bislang identifizierten Mechanismen sollen im Verlauf skizziert werden.

Der Phänotypenwechsel der VSMC von einem kontraktilen hin zu einem osteogenen, sekretorischen Phänotypen spielt eine zentrale Rolle für die Induktion der mVK (26). Dieser Prozess wird auch „osteogene Transdifferenzierung“ genannt, für den vor allem das *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) über die Regulation der mesenchymalen Differenzierung der VSMC zu einem osteoblastischen Phänotypen von großer Bedeutung ist. Diese Transdifferenzierung verläuft über den hierfür wesentlichen Transkriptionsfaktor *runt-related transcription-factor 2 / core-binding factor alpha* (RunX2/cbfa1) (27). Bekannte Induktoren dieser Transdifferenzierung sind unter anderem Inflammation, oxidativer Stress und die endotheliale Dysfunktion, die durch wechselseitige Einflussnahme auch zur Aufrechterhaltung eines pathologischen, kalzifizierenden Milieus und des vaskulären Alterns beitragen: Eine inflammatorische Umgebung induziert die VK (28); dieser Zusammenhang schlägt sich klinisch beispielsweise im kardiovaskulären Risiko von Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis nieder, das mit demjenigen von Patienten mit einem Diabetes mellitus vergleichbar ist (29). Ein Großteil der Genexpression, die dem kalzifizierenden und dem inflammatorischen Endophänotypen zugeordnet wird, zeigt Überlappungen, was Ausdruck der wechselseitigen Beziehung von Inflammation und mVK ist (30). Auch oxidativer Stress ist ein bekannter Induktor von RunX2/cbfa1 (31). Beide Prozesse führen zu Schäden an der zellulären DNA und zu Dysfunktion von Mitochondrien, welche bei

chronischem Fortschreiten klassische Reize für eine zelluläre Seneszenz sind und somit zum Erreichen des SASP von VSMC führen können. Dieser trägt parakrin zu einem entzündlichen, kalzifizierenden Milieu bei und kann wiederum zur Seneszenz umgebender Zellen führen (32). Der zeitliche Verlauf und das gegenseitige Wechselspiel zwischen Zellstress durch beispielsweise Inflammation, Seneszenz und mVK ist dabei noch Gegenstand von Forschungsbemühungen. Jüngst konnte gezeigt werden, dass RunX2/cbfa1 neben seiner oben beschriebenen Rolle für den kalzifizierenden Phänotypen auch Teil der Zellantwort auf DNA-Schäden ist und damit die enge Beziehung zwischen dem Altern, Seneszenz und mVK deutlich macht (33).

Inflammation und oxidativer Stress werden physiologisch durch das Endothel im vaskulären Milieu beeinflusst. Wesentlich ist neben der Barrierefunktion für die vaskuläre Integrität die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), das nicht nur ein potenter endogener Vasodilatator ist, sondern durch die Hemmung der Leukozytenmigration teilweise anti-inflammatorische und auch anti-oxidative Kapazitäten aufweist (34, 35). Eine Dysfunktion des Endothels wird als Charakteristikum vaskulären Alterns angesehen (36) und das Endothel kann Quelle von Progenitorzellen sein, die vergleichbar den VSMC Ursprung einer osteogenen Transdifferenzierung sein können (37). Neben VSMC und endothelialen Progenitorzellen existieren auch zirkulierende Osteoprogenitorzellen mesenchymalen und hämatopoietischen Ursprungs, die Beteiligte eines vergleichbaren Prozesses sein können (38).

Eine gestörte Kalzium-/Phosphathomöostase im Sinne eines erhöhten Löslichkeitsprodukts zur Ausfällung von Kalziumphosphatverbindungen wurde ursprünglich als alleinige Ursache der VK, im Sinne eines passiven Vorganges angenommen. Die Störung dieser Homöostase ist nach heutigem Kenntnisstand zwar kritisch – daher bedienen sich die meisten Modelle der VK einer erhöhten Zufuhr von Kalzium und Phosphat als Induktor – aber ohne aktiv regulierte Prozesse nicht ausreichend erklärt. Es ist beispielsweise bekannt, dass erhöhte Phosphat-Plasmakonzentrationen die osteoblastische Transdifferenzierung anregen können; dabei spielen aktive, pleiotrope Effekte wie die direkte Induktion von BMP-2 durch Phosphat und die Schaffung eines kalzifizierenden Milieus durch Inflammation und oxidativen Stress eine Rolle (17). Die Ausfällung von Hydroxilapatit – und damit die ektote Kalzifizierung – kann durch eine Reihe von Prozessen erleichtert werden: Apoptose von VSMC führt u.a. zur Freisetzung von Kalzium und freier DNA in Form von apoptotischen Körperchen, welche eine Kalziumphosphatablagerung erleichtern. Es konnte gezeigt

werden, dass eine Hemmung der Apoptose zu einer Reduktion der mVK *in vitro* führte (39). Bevor es zur Apoptose kommt kann Zellstress – beispielsweise in Form einer Hyperkalzämie oder chronischen Inflammation – in VSMC oder Makrophagen zur Freisetzung von Matrixvesikeln führen. Diese beinhalten Kalziumphosphat, organische Chelatoren für diese Salze, aber auch Inhibitoren der Kalzifizierung (40). In Abhängigkeit des Mikromilieus sowie des Expressionsprofils der Zelle, der die Matrixvesikel entstammen, können diese eine ektope Kalzifizierung als Kalzifizierungsherde erleichtern und sogar zur osteogenen Transdifferenzierung von VSMC beitragen (41).

Eine schadhafte ektope Kalzifizierung kann durch potente, physiologische Inhibitoren der Kalzifizierung verhindert werden. Bedeutende Inhibitoren sind beispielsweise das aus der Leber stammende, zirkulierende Fetuin A oder das aus VSMC entstammende, gewebständige Matrix-Gla-Protein (MGP). Beide Proteine können Kalzium- und Phosphationen binden, so dass diese nicht mehr der Mineralisierung zur Verfügung stehen, aber auch aktiv in die Signalketten der VK eingreifen (42, 43). Die Komplexität der Regulation der VK zeigt, dass das MGP in Abhängigkeit der chemischen Nebengruppen auch einen paradoxen förderlichen Effekt auf die mVK haben kann (43). Bei Menschen wurde allerdings eine Assoziation zwischen Mangel dieser Inhibitoren und dem Ausmaß der VK gezeigt (44, 45).

Elastinfragmente der extrazellulären Matrix (EZM) sind wichtige Orte der Kalziumphosphatablagerung. Während der EZM lange Zeit nur eine passive Rolle im Rahmen der Mineralisierung zugesprochen wurde, ist in den letzten Jahren deren Bedeutung für die Regulation parakriner Signale und für die assoziierte Beeinflussung des Expressionsprofils umliegender Zellen nachgewiesen worden. Zum Einen führt ein gesteigerter Umbau der EZM durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) zu einer erleichterten Kalzifizierung entlang der entstehenden Elastinfragmente und zum Anderen nimmt man für eine Reihe von Bestandteilen der EZM eine Assoziation zur VK an (46). Beispielsweise ist der Phänotyp von mesenchymalen Stammzellen abhängig von der Beschaffenheit und Rigidität der EZM (47), so dass hier eine osteoblastische Transdifferenzierung mitbeeinflusst werden könnte.

Abb. 1 fasst die skizzierten Pathomechanismen und das hohe Maß an Interaktion zusammen.

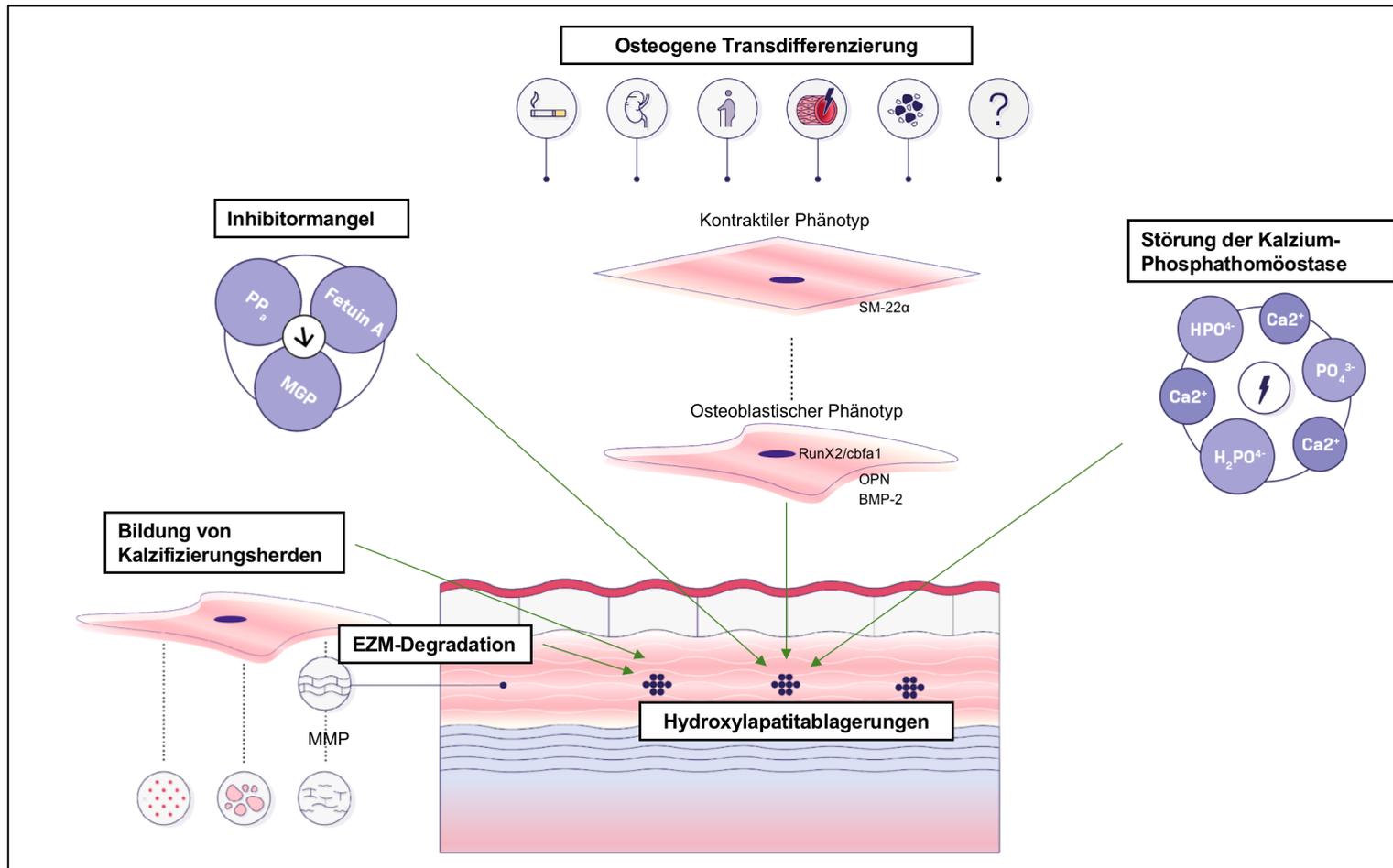


Abbildung 1: Schematisch Darstellung der skizzierten Pathomechanismen der VK.

Die Abbildung dient dem Überblick und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. SM-22a: *smooth muscle protein 22 alpha*, OPN: Osteopontin, BMP-2: *Bone morphogenetic protein 2*, MMP: Matrix-Metalloproteinase

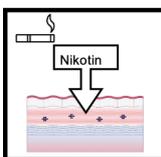
Legende:

- 
Oxidativer Stress
- 
Urämie
- 
Alter
- 
Endotheliale Dysfunktion
- 
Inflammation
- 
unbekannte Faktoren
- 
Elastin
- 
Elastinfragmente
- 
Apoptotische Körperchen
- 
Matrixvesikel

1.5. Zielsetzung

Die mVK ist eine multifaktorielle Erkrankung mit einer enormen klinischen Relevanz, deren sehr komplexe Pathogenese (s. Abb. 1) aktuell nicht ausreichend verstanden ist. Eine krankheitsübergreifende kausale Therapieoptionen existiert nicht (9). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses zentraler Signaltransduktionswege innerhalb der Pathophysiologie der mVK, um Schlüsselprozesse mit einer therapeutischen Eignung zu identifizieren. Die Herausforderung dabei liegt darin, den hochkomplexen, interregulierten Prozess der mVK möglichst effizient und handhabbar in experimentellen Modellen darzustellen. Wie diese Arbeit im weiteren Verlauf zeigen wird, sind die etablierten experimentellen Modelle sehr artifizielle Systeme und bilden Teile der bekannten Pathophysiologie nur unzureichend ab. Ziel dieser Arbeit war es, diesem Problem mit der Etablierung neuer Methoden zu begegnen und die Beziehung zwischen Seneszenz und mVK dabei in den Vordergrund zu rücken; dazu habe ich im Rahmen meiner kumulativen Publikationspromotion folgende Schritte unternommen (s. Abb. 2):

1. Erarbeitung und Anwendung wissenschaftlicher Grundlagen der mVK:



Publikation 1: In times of tobacco-free nicotine consumption: the influence of nicotine on vascular calcification

Narratives Review, Erstautorenschaft

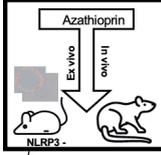
- Erarbeitung des pathophysiologischen Hintergrunds der mVK am Beispiel des tabakfreien Nikotinkonsums
- Identifikation von endothelialer Dysfunktion, oxidativen Stresses und Inflammation als wesentliche Prozesse in der Pathogenese der mVK



Publikation 2: Research models for studying vascular calcification

Narratives Review, Mitautorenschaft

- Erarbeitung des methodischen Hintergrunds der mVK
- Identifikation der Vorteile und Einschränkungen gemeinhin verwandter experimenteller Modelle der mVK

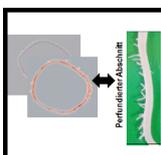


Publikation 3: Long-term treatment of azathioprine in rats induces vessel mineralization

Experimentelle Originalarbeit, Mitautorenschaft

- Anwendung der etablierten und erarbeiteten Methoden ex und in vivo
- Nachweis einer Induktion der mVK durch Langzeitexposition mit Azathioprin in vivo
- Identifizierung des NLRP-3 Inflammasoms als möglichen Konversionspunkt von oxidativem Stress und Inflammation in der Pathogenese der mVK und Erklärungsansatz, wie verschiedene Induktoren über ähnliche Prozesse zur mVK führen.

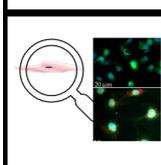
2. Etablierung neuer Methoden für die Detektion pathophysiologisch bedeutender Signalwege in der mVK:



Publikation 4: A novel long-term ex vivo model for studying vascular calcification pathogenesis: The rat isolated-perfused aorta

Experimentelle Originalarbeit, Mitautorenschaft

- Etablierung eines neuen ex vivo Modells zur Langzeitperfusion von Arterien in einem physiologischeren Ansatz
- Ergänzung herkömmlicher Modelle um erhaltene Gefäßarchitektur und Kommunikation verschiedener Zelltypen
- Verbesserung des Tierwohls durch Implementation des „reduce“ und „refine“ Gedankens



Publikation 5: A novel protocol for detection of senescence and calcification markers by fluorescence microscopy

Experimentelle Originalarbeit, geteilte Erstautorenschaft

- Protokolletablierung für eine Fluoreszenz-basierte Multiplex-Methode zur gleichzeitigen Detektion von Seneszenz- und Kalkifizierungssignalen in einer Einzelzelle
- Ermöglichung der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs zwischen Seneszenz und Phänotypentransformation

Abbildung 2: Beiträge der einzelnen Publikationen zur Zielsetzung der Promotionsarbeit

2. Material und Methodik:

Folgendes Material und Methoden wurden wiederkehrend im Rahmen der Publikationen 3, 4 und 5 angewandt und werden daher gebündelt dargestellt:

Tiere

Die dargestellten Versuche entsprachen der europäischen Direktive 2010/63/EU für Tierversuche und wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt. Verwendet wurden männliche Wistar Ratten, welche bei Janvier (Le Genest-Saint-Isle) erworben wurden. Die Tiere wurden, wenn nicht anders dargestellt, mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital in einer Dosierung von 400 mg/kg Körpergewicht geopfert. Gehalten wurden sie in Gruppen von 4-6 Tieren mit einem 12-stündigen Tag-/Nacht-Rhythmus bei 22 °C Raumtemperatur und Wasser sowie Futter (Ssniff©) nach Belieben.

Zellkultur

Für die Zellkultur wurden primäre VSMC nach Explantation der Rattenaorten und Befreiung derselben von ihrer Adventitia entsprechend einer etablierten Methode gewonnen (48). Diese Zellen wurden in Kontrollmedium (COM) kultiviert und in Zellpassage 4 jeweils für die Experimente verwendet. Die Kultivierung fand unter kontrollierten Bedingungen bei 37 °C, 5% Kohlenstoffdioxid und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank statt.

Zellkulturmedium

Als COM wurde für alle Versuche Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom AG) mit 1 g/L Glukose, ergänzt um 10% fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom AG), Penicillin (100 U/mL, Biochrom AG) und Streptomycin (0.1 mg/mL, Biochrom AG) verwendet. Zur Verwendung als Kalzifizierungsmedium (CAM) wurde dieser Lösung 5 mmol/l Natriumhydrogenphosphat und 0.284 mmol/l Ascorbinsäure zugesetzt

Histologie und Mikroskopie

Die Aortenringe wurde für 24 Stunden in 4%-Formalinlösung fixiert und anschließend dehydriert sowie in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden in 4 µm Serienschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Aorten wurden mit Haematoxylin/Eosin

und Alizarin Rot bzw. von Kossa gefärbt und die Salze bzw. Färbelösungen von Carl Roth (Karlsruhe, Germany) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) erworben. Aufnahme und Analyse der gefärbten Aortenschnitte und Zellen erfolgte mittels AxioVert 200M System und Zen Software von Zeiss (Jena, Deutschland).

Kalziumgehalt

Die Aortenringe wurden mittels 0,6 molarer Salzsäurelösung dekalzifiziert und der Kalziumgehalt anschließend mittels des kolorimetrischen Kalzium C Assays von ScienCell (Berlin, Deutschland) in Dubletten entsprechend des Herstellerprotokolls ermittelt. Dieser wurde anschließend auf das Trockengewicht der Proben bezogen.

Real-time-PCR:

Mittels Trizol™ wurde die RNA der kryokonservierten Aortenringe entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. RNA-Menge und -Reinheit wurden mittels optischer Dichte Messung im NanoDrop-Photometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) bestimmt. Anschließend erfolgte die reverse Transkription der RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) mittels *high-capacity cDNA reverse-transcription kit* (Thermo Fisher Scientific). Die *messenger* Ribonukleinsäuren (mRNA) Expression wurde dann mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR) unter Verwendung des CFX-Systems mit einem SybrGreen kit (Bio-Rad, München, Deutschland) untersucht. Die Oligonukleotidsequenzen und Hersteller der Primer können Publikation 3 und 4 jeweils S. 3 entnommen werden. Die Quantifizierung der Gene erfolgte bezogen auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPD) als *housekeeping*-Gen.

Statistik

Die statistischen Analyse der dargestellten Arbeiten erfolgte mittels GraphPad Prism Software (Version 5 und 6). Alle hier dargestellten Ergebnisse wurden nach statistischer Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test zwischen den stimulierten Proben und den Kontrollproben gewonnen. Als statistisch signifikant angenommen wurde ein p-Wert von < 0,05.

2.1. Publikation 1 und 2

Narrative Reviews zur Erarbeitung des pathophysiologischen Hintergrunds der mVK anhand einer möglichen Induktion durch Nikotin (Publikation 1) und des methodischen Hintergrunds der mVK (Publikation 2)

Medline und PubMed wurden nach Originalarbeiten in deutscher oder englischer Sprache mit Publikation bis Dezember 2018 (Publikation 1) bzw. bis Februar 2020 (Publikation 2) mit folgenden Strategien durchsucht. Die identifizierten Originalarbeiten wurden hinsichtlich ihrer Relevanz für die Fragestellungen untersucht und deren Literaturverzeichnis in Hinblick auf weitere, durch die Suche bei PubMed und EMBASE nicht identifizierte Arbeiten betrachtet.

Publikation 1: *Nicotine AND vascular calcification; Nicotine AND osteoblastic transdifferentiation; Nicotine AND inflammation; Nicotine AND reactive oxygen species; Nicotine AND endothelial dysfunction; Nicotine AND extracellular matrix degradation*

Auf Basis der identifizierten Einflüsse von Nikotin auf die vaskuläre Integrität und das vaskuläre Mikromilieu wurde ein Pathomechanismus erarbeitet und vorgeschlagen, über welchen Nikotin zu einer mVK von Arterien führen könnte.

Publikation 2: *Vascular Calcification AND models; Vascular Calcification AND in vitro; Vascular Calcification AND ex vivo; Vascular Calcification AND in vivo*

Die identifizierten Modelle wurden zusammengefasst und in Hinblick auf ihre Stärken und Schwächen und die gesamte experimentelle Landschaft hinsichtlich sich ergebender experimenteller Lücken betrachtet.

2.2. Publikation 3

Nachweis einer Induktion der mVK durch Azathioprin *in vivo* und Identifizierung eines Signalwegs unter Verwendung etablierter Methoden

Tierversuche

29 männliche Wistar-Ratten wurden im Alter von 14 Wochen zufällig in zwei Gruppen eingeteilt; von diesen erhielten 16 Ratten Azathioprin (Aza) in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht über das Trinkwasser für 24 Wochen. Die 13 Tiere der Kontrollgruppe erhielten keine Zusätze. Die Menge des Gesamtverbrauchs je Käfig

wurde täglich gemessen und die Gewichtsentwicklung der Tiere kontrolliert. Nach 24 Wochen wurden die Tiere geopfert, heparinisierendes Blut und Aortenringe für die Kryokonservierung und Formalinfixierung gewonnen.

Jeweils sechs NLPR3^{+/+} und NLPR3^{-/-} Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 wurden der oben dargestellten Präparation entsprechend geopfert und heparinisierendes Blut gewonnen.

Ex vivo Methode – Inkubation

Die Ringe der *aortae thoracales* von NLPR3^{+/+} und NLPR3^{-/-} Mäuse wurden mit CAM bzw. CAM und 0,1 mmol/l Aza für 14 Tage unter kontrollierter Atmosphäre inkubiert.

Messung der Blutparameter

Durch einen Trockenchemie-Analysator (Dri-Chem, Fuji) wurde die Konzentration von alkalischer Phosphatase (ALP), Kalzium und inorganischem Phosphat gemessen. Parthormon, Serum Amyloid A 8-oxo-2-deoxyguanosin, Fetuin-A, Caspase 1 und MGP wurden mittels ELISA gemessen. Die Hersteller der Kits können Publikation 4, Seite 3 entnommen werden.

Die allgemeine Methodologie hinsichtlich histologischer Methoden und Mikroskopie, Kalziumgehalt und real-time PCR entspricht den eingangs beschriebenen Grundlagen:

Die stimulierten Aortenringe wurden mit der von-Kossa-Färbung behandelt.

Der Kalziumgehalt der Aortenringe wurde mittels Calcium C Assay gemessen.

Mittels real-time PCR wurde die Expression der Kalzifizierungsmarker Osteopontin (OPN), ALP und *cbfa1*, des kontraktiven Markers SM22-a, der Enzyme Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HRPT1) und Xanthinoxidase (XO), der Antioxidantien Superoxiddismutase-1/2/3, des Surrogatparameters oxidativen Stresses 8-oxo-2-deoxyguanosin und der Entzündungsmarker Interleukin(IL)-1 β , -6 und des NLRP3-Inflammasoms bestehend aus *apoptosis-associated spec-like protein* (ASC), Caspase 1 und NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3).

2.3. Publikation 4

Etablierung und *proof of concept* eines neuen ex vivo Langzeitmodells zur Perfusion arterieller Gefäße – die isoliert perfundierte Rattenaorta (IPA)

Explantation der Aortae thoracales

Nach intraperitonealer Anästhesie mittels Pentobarbital in einer nicht-letalen Dosierung von 200 mg/kg Körpergewicht und Erreichen einer angemessenen Narkosetiefe, wurde das Abdomen eröffnet und das Retroperitoneum durch Mobilisierung des Intestinums freigelegt. Die abdominale Aorta wurde mechanisch vom umgebenden Fettgewebe befreit. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und die Aorta thoracalis freigelegt, welche distal nach den Abgängen der Aa. renales und kranial nah der Aortenklappe geschnitten wurde. Dann wurde das umgebende Bindegewebe dieses Aortenabschnitts mit der Vorgabe, keinen mechanischen Stress auszulösen, mittels Pinzetten gefasst und unter Einhalten eines großzügigen Sicherheitsabstandes aus der umliegenden Gewebseinbettung befreit. Besonders geachtet wurde auf eine ausreichende Länge aller arteriellen Abgänge. Die nun vollständig mobilisierte Aorta wurde in eine phosphatgepufferte Salzlösung überführt und anschließend unter Zuhilfenahme eines Mikroskops mikrochirurgisch vom peripheren Fettgewebe befreit, ohne die arteriellen Abgänge zu verletzen. Letztere wurden schließlich mithilfe einer bipolaren, elektrokauterisierenden Pinzette (KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland) distal verodet, um eine Perfusion des aortalen Hauptstammes ohne Verluste des Perfusionsmediums über die arteriellen Abgänge zu ermöglichen. Zum Einbau in den Perfusionskreislauf verwendet wurde der Abschnitt distal der linken A. subclavia und kranial der A. coeliaca. Der übrige kraniale und distale Anteil der präparierten Aorta wurden als Kontrollstücke zum Zeitpunkt „Null“ sowie zum Vergleich des neu-etablierten Modells mit der herkömmlichen ex vivo Methode als Aortenringe inkubiert.

Ex vivo Perfusionskreislauf

Die Perfusion erfolgte in einer eigens dafür konstruierten Edelstahlkammer (Publikation 4, Abb. 1). Die explantierten und vorbereiteten Aorten wurden unter sterilen Kautelen und Verwendung von entweder sterilem Einwegmaterial oder autoklaviertem Material kranial und distal jeweils auf einen Venenverweilkatheter der Größe 14-16 Gauge atraumatisch aufgezogen und mittels Fadenschlingung und Einzelknopfnahnt befestigt und anschließend in den Perfusionskreislauf eingespannt. Die Perfusionskammer wurde mit einer Pufferlösung befüllt, welche die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus nachahmt (Zusammensetzung siehe Publikation 2, S.2).

Die Perfusion erfolgte konstant, angetrieben durch eine peristaltische Pumpe mit gleichbleibendem Perfusionsdruck und -frequenz mit COM und CAM für die Dauer von 14 Tagen unter kontrollierter Atmosphäre in einem Brutschrank. Der Gasaustausch erfolgte über ein steriles Filtersystem. Das Perfusionsmedium wurde an den Tagen 4, 7, 10 und 12 gewechselt.

Ex vivo Methode - Inkubation

Die Aortenringe kranial der linken A. subclavia und distal der A. coeliaca wurden unter Verwendung von COM und CAM ohne Perfusion der etablierten ex vivo Methode nach inkubiert.

Aufarbeitung nach Perfusion/Inkubation

Am Ende der 14-tägigen Perfusion bzw. Inkubation wurde die Kammer auf Anzeichen einer Kontamination hin untersucht und die perfundierten Aorten aufgeteilt in einen distalen und proximalen Teil in Aortenringe geschnitten. Jeder Abschnitt wurde gedrittelt und jeweils ein Drittel kryokonserviert, dekalzifiziert und in Paraffin eingebettet.

Die kryokonservierten Aortenringe wurden entsprechend der Beschreibung zur *Real-time* PCR hinsichtlich der Expression von BMP-2 und SM22a gemessen.

Die dekalzifizierten Aortenringe wurden entsprechend der Beschreibung zum Kalziumgehalt auf ihre Kalziumkonzentration im Gewebe hin untersucht und die in Paraffin eingebetteten Aortenringe wie in den histologischen Methoden beschrieben aufgearbeitet.

2.4. Publikation 5

Etablierung eines neuen Protokolls für die parallele Detektion zellulärer Seneszenz und Kalzifizierung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Konzeptionalisierung

Etablierte Methoden zur Detektion von VK und Seneszenz wurden in Tabelle 1 des ergänzenden Materials hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile zusammengefasst (s. Publikation 5, Tabelle S1). Während die qPCR nicht ohne Weiteres Informationen auf Einzelzellbasis bieten kann und die *single cell* PCR zu Lasten von Effizienz, Erlernbarkeit und notwendigem Materialeinsatz geht, fiel die Wahl in Anbetracht ihrer Resilienz

gegenüber externen Fehlerquellen, der Möglichkeit zur Ko-Visualisierung und Multiplexen auf die RNA in situ Hybridisierung und Immunhistochemie.

Mit dem Ziel einer parallelen experimentellen Umgebung zur Bestimmung kalzifizierender und seneszenten Marker auf Einzelzellbasis wurden neue Protokolle für diese beiden bekannten Verfahren etabliert, so dass Ersteres zur Bestimmung der Genexpression von OPN, p21 und Seneszenz-assoziierte Heterochromatin Foci (SAHF) und Letzteres zur Anfärbung von Seneszenz-assoziiierter Betagalaktosidase (SA- β -Gal) parallel eingesetzt werden konnten.

Zellgewinnung und Stimulation

Primäre VSMC wurden wie oben beschrieben in Passage 4 in IBIDI 8 Well μ -Träger (Ibidi GmbH) für die SA- β -GAL Färbung und in 8 Well LabTec Träger für die in situ Hybridisierung zur Betrachtung von OPN, p21 und SAHF ausgesät. Diese Zellen wurden 24 Stunden bis zu einer Konfluenz von 70-80% und unter Entzug von fetalem Kälberserum für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 100 μ mol/l Uridin-Adenosintetraphosphat (Up4A) für 48 Stunden bzw. mit 500 nmol/l Doxorubicin (Dox) zur Seneszenzinduktion für 72 Stunden.

Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Immunfluoreszenz

Material und Hersteller der verwandten Lösungen können Publikation 5, Tabelle 3 entnommen werden. Die experimentellen Schritte der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und immunhistochemischen Aufarbeitung können der Publikation 5, S. 6f entnommen werden. Eine Gegenfärbung erfolgte mittels Hoechst-Färbung der Zellkerne.

Fluoreszenzdetektion und Signalquantifizierung

Die genutzten Filter und Wellenlängen können Publikation 5, Tabelle 1 entnommen werden. Die Bildaufnahme erfolgte mittels 40x F-Fluar Objektiv nach Verwendung von Imersol™ Öl und mittels Zen-Software (Zeiss, Zen 2 blue edition). Analysiert wurden drei unabhängige Experimente mit Duplikaten für jede Stimulation. Zur Analyse wurden je fünf Aufnahmen gemacht und das Signal mittels Pixelsummenintensität quantifiziert.

3. Ergebnisse

3.1. Publikation 1

Mit der Literaturrecherche für diese Publikation habe ich mir die pathophysiologische Grundlage der mVK am Beispiel des Stressors Nikotin erarbeitet. Erarbeitet werden sollte, welche Pathomechanismen eine besondere Rolle bei Exposition zum epidemiologisch relevanten Nikotin spielen.

Es lag keine Studie vor, die *a priori* einen direkten Effekt von Nikotin auf die Entstehung der mVK untersucht hatte. Jedoch konnten Arbeiten identifiziert werden, bei denen ein Einfluss von Nikotin auf Teilprozesse der in Abb. 1 dargestellten Pathomechanismen der mVK festgestellt wurde:

Phänotypenwechsel der VSMC / osteogene Transdifferenzierung

Nikotin kann in der Vaskulatur durch Zellstress infolge von Inflammation, oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion ein Milieu schaffen, das geeignet für die Induktion der osteogenen Transdifferenzierung und Seneszenz von VSMC ist und damit den wesentlichen Prozess der mVK fördern (49).

Ein inflammatorisches Milieu entsteht dabei primär durch die Aktivierung des zentralen pro-inflammatorischen Mediators *nuclear factor kB* (NFkB) infolge einer nikotininduzierten Phosphorylierung des Inhibitors der kB Kinase (IKK) und der kB Kinase selbst (50), gezeigt für humane VSMC *in vitro*. In humanen Endothelzellen konnte *in vitro* sogar ein dosisabhängiger Einfluss von Nikotin auf die NFkB-Expression gezeigt werden (51). Darüber hinaus konnte die Induktion von *downstream* Effektoren wie IL-6 und *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) gezeigt werden, die dieses Milieu durch die Diapedese von Immunzellen aufrecht erhalten (52, 53).

Sekundär wird das inflammatorische Milieu durch reaktive Sauerstoffspezies und den daraus resultierenden Zellstress aufrecht erhalten, indem Nikotin die anti-oxidativen Kapazitäten in der Gefäßwand – gezeigt für Ratten *in vivo* – reduziert (54). Zudem fördert Nikotin die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies direkt durch Aktivitätssteigerung einer NADPH-Oxidase (NOX) (55). Nicht nur Inflammation und oxidativer Stress sind bekannte Induktoren der mVK und Zeichen vaskulären Alterns, sondern auch die endotheliale Dysfunktion. Diese ist gekennzeichnet durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO, deren synthetisierendes Enzym (endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase, eNOS) *in vitro* und *in vivo* durch Nikotin gehemmt werden kann (56, 57). In dieser mittelbaren Folge

konnte eine gesteigerte Expression osteogener Marker bei Mäusen *in vivo* gezeigt werden (58).

Förderung einer ektopen Kalzifizierung durch extrazelluläre Matrixdegradation

Nikotin kann zudem direkt den Abbau der EZM der Vaskulatur befördern, deren Abbauprodukte als Mineralisierungsherde dienen können. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte eine Induktion der zentralen degradierenden Enzyme MMP-2 und -9 gezeigt, deren Aktivität die mVK befördert (59, 60) (61-63).

Als wesentliche Mechanismen der mVK-Induktion, an denen Nikotin als beispielhafter Stressor beteiligt sein kann, sind Inflammation, oxidativer Stress, endotheliale Dysfunktion und Degradation der EZM in dieser Publikation identifiziert worden.

Eine Zusammenfassung der möglichen Einflüsse von Nikotin auf die Pathogenese der VK können Publikation 1, Abb. 1-3 entnommen werden.

3.2. Publikation 2

Die Literaturrecherche ergab eine hohe Diversität angewandter Modelle und Induktoren der VK, wobei den größten Anteil *in vitro* Versuche mit VSMC und *ex vivo* Versuche mit Aortenringen ausmachen (64). Während Erstere durch hohe Wachstumsraten und den Einfluss der künstlichen Kulturmgebung zu hoher genomischer Variabilität der Zellen führen, wird bei *ex vivo* Modellen der Vorteil des Gewebeverbundes durch eine unphysiologische extraluminale Stimulation von Seiten der *tunica adventitia* ohne Erhalt der endothelialen Barrierefunktion relativiert. Keines dieser Modelle ermöglicht die spezifische Untersuchung des Endotheleinflusses und der EZM auf die mVK unter physiologischen Bedingungen. Für die Induktion der mVK *in vivo* ist aufgrund der intrinsischen Resilienz von Nagetieren ein massiver, teils wochenlanger Eingriff in den Stoffwechsel der Tiere mit dem resultierenden Leid notwendig. Eine Übersicht der Methodik und ihrer Limitationen ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Experimentelle Modelle und Induktoren der vaskulären Kalzifizierung sowie deren Limitationen zusammengefasst nach (64)

Experimentelle Umgebung	Modell	Induktion vaskulärer Kalzifizierung	Limitationen
<u>In vitro</u>	Monokultivierung vaskulärer Zellen, vorrangig VSMC und Endothelzellen humanen und nagetierischen Ursprungs (Details s. Publikation 2, Tabelle 1)	Kalzifizierendes Zellkulturmedium mit vergleichbaren Ingredientien schwankender Konzentration (Details s. Publikation 2, Tabelle 2)	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Gewebsarchitektur • Interzelluläre Kommunikation verschiedener Zelltypen und mit der extrazellulären Matrix • Hayflickgrenze und Implikationen für Langzeitversuche
	Ko-Kultivierung obengenannter vaskulärer Zellen		<ul style="list-style-type: none"> • Komplexität, Reproduzierbarkeit, Kosten • Unklares Expressionsprofil
<u>Ex vivo</u>	Inkubation von arteriellen Ringen verschiedener Gefäßbetten in der Zellkultur - in der Regel Ratten- und Mausearten	Kalzifizierendes Zellkulturmedium mit vergleichbaren Ingredientien schwankender Konzentration (Details s. Publikation 2, Tabelle 2)	<ul style="list-style-type: none"> • Unphysiologische, extraluminale Stimulation • Rolle des Endothels und der EZM
<u>In vivo</u>	Zucht und Haltung von Ratten und Mäusen mit spezifischem Genom (Details s. Publikation 2, Tabelle 3)	<p>Erreichen einer urämischen Stoffwechselsituation mittels Induktion einer Niereninsuffizienz durch</p> <ol style="list-style-type: none"> a) alimentäre Adenin- oder Streptozotocinzufuhr (Ratten) b) operative Maßnahmen (Ratten) <p>Alimentäre Beeinträchtigung des Kalziumphosphatstoffwechsels</p> <p>Knockout regulierender Gene des Kalziumphosphatmetabolismus, des Pyrophosphatstoffwechsels, der osteogenen Signalkaskade (Details s. Publikation 2, Tabelle 3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Protrahiertes Tierleid • Kosten, Effektivität • Erschwerte Vergleichbarkeit zu <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> Studien aufgrund unterschiedlicher Induktionsmethoden

3.3. Publikation 3:

Aza ist ein etabliertes Medikament, dessen Einsatz ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko zur Folge hat; grundlagenwissenschaftlich wird es als potenter Induktor oxidativen Stresses eingesetzt, welcher in der Literatur als einer der Schlüsselreize für die Induktion der mVK identifiziert wurde (s. Abb. 1 sowie Publikation 1). Darüber hinaus konnte für 6-Mercaptopurin – dem wesentlichen Stoffwechselprodukt von Aza – eine Promotion der mVK *in vitro* gezeigt werden (65). Für Aza liegen keine *in vivo* Daten diesbezüglich vor. Mit dieser Arbeit wurde untersucht, ob Aza *in vivo* eine mVK induzieren kann und welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen.

Azathioprin führt zu vaskulärer Kalzifizierung *in vivo*, es kommt zu einem Phänotypenwechsel der VSMC

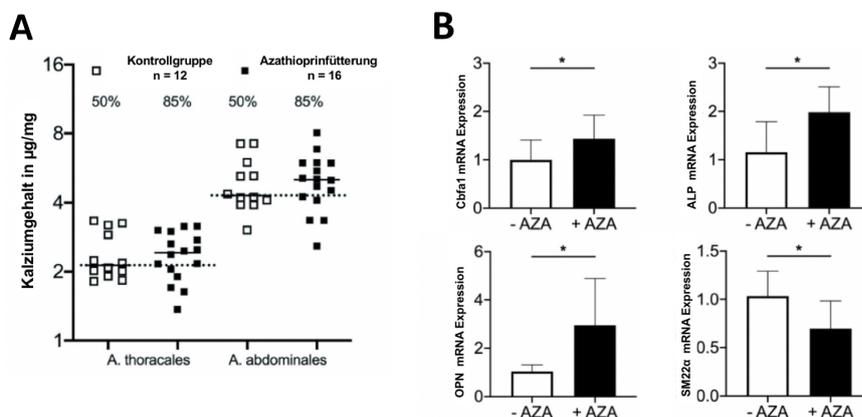


Abbildung 3: Induktion der osteogenen Transdifferenzierung und mVK mit(+)/ ohne(-) Azathioprinfütterung (Aza) (66). **A)** Kalziumquantifizierung des aortalen Gewebes der Ratten. Jeder Punkt entspricht einem Versuchstier, wobei die gepunktete Linie dem medianen Kalziumgehalt der Kontrollgruppe entspricht. Die Anzahl der Tiere, deren Kalziumgehalt oberhalb dieses Medians lag, ist in Prozent angegeben. **B)** Genexpression im aortalen Gewebe der Ratten. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. * p < 0,05 nach Mann-Whitney-U Test.

Azathioprin induziert oxidativen Stress und Inflammation als Charakteristika des *Inflamming*s, nicht aber die Seneszenzmarker p16, p21 und p53

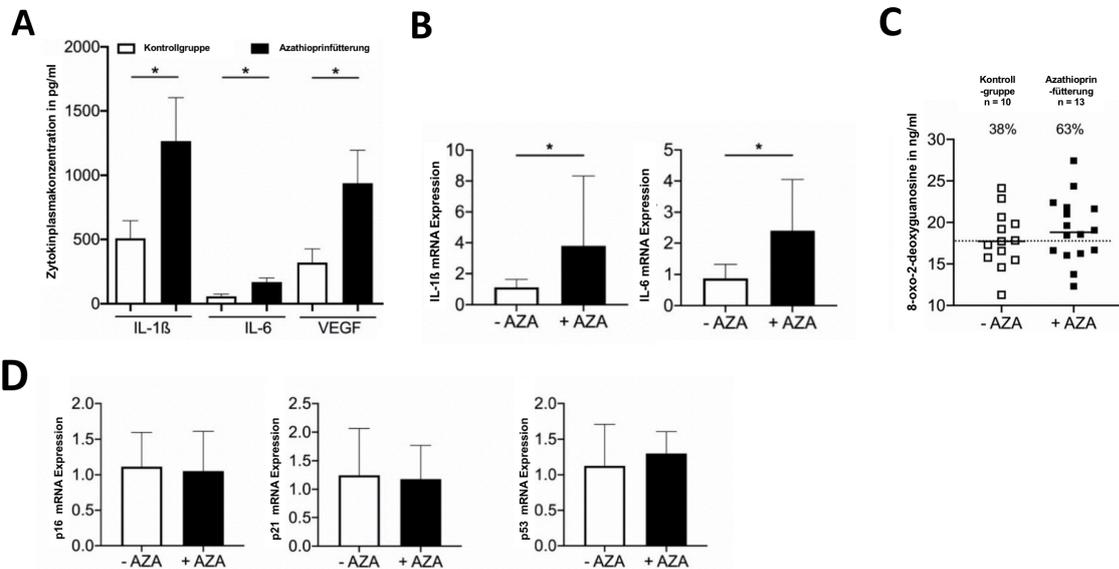


Abbildung 4: Merkmale vaskulären Alterns (66). **A)** Systemische Inflammation. Plasmakonzentrationen inflammatorischer Zytokine. **B)** Lokale Inflammation. mRNA Expression im aortalen Gewebe der Ratten. **C)** Oxidativer Stress. Plasmakonzentrationen eines Surrogatparameters für oxidativen Stress. Jeder Punkt entspricht einem Versuchstier, wobei die gepunktete Linie der medianen Plasmakonzentration der Kontrollgruppe entspricht. Die Anzahl der Tiere, deren Konzentrationen oberhalb des Medians lagen, sind in Prozent angegeben. **D)** Seneszenz. mRNA Expression von Zellzyklusproteinen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$ nach Mann-Whitney-U Test.

Zur Klärung der Herkunft der reaktiven Sauerstoffspezies bestimmten wir die mRNA-Expression der Enzyme Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HRPT1) und XO, welche Aza verstoffwechseln, wobei der Weg über die XO zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt. Die mRNA Expression von XO war gegenüber der von HRPT1 signifikant erhöht (Publikation 3, Abb. 2C).

Die Expression einiger gemessener Zytokine war nicht signifikant verändert; eine Übersicht aller bestimmten Zytokine bietet Abb. 3 der Publikation 3. Sowohl die Plasmakonzentrationen als auch die Expression von IL-1 β und IL-6 war nach Aza-Stimulation signifikant erhöht (s. Abb. 4A und B). Da in vaskulären Zellen das NLRP-3 Inflammasom wesentlich für die Synthese von IL-1 β ist und seine Beteiligung an der mVK

bekannt ist, untersuchten wir, ob die hier beschriebenen Effekte durch das NLRP-3 Inflammasom vermittelt werden.

Azathioprin induziert das NLRP3-Inflammasom; dieses ist für den kalzifizierenden Effekt von Azathioprin kritisch

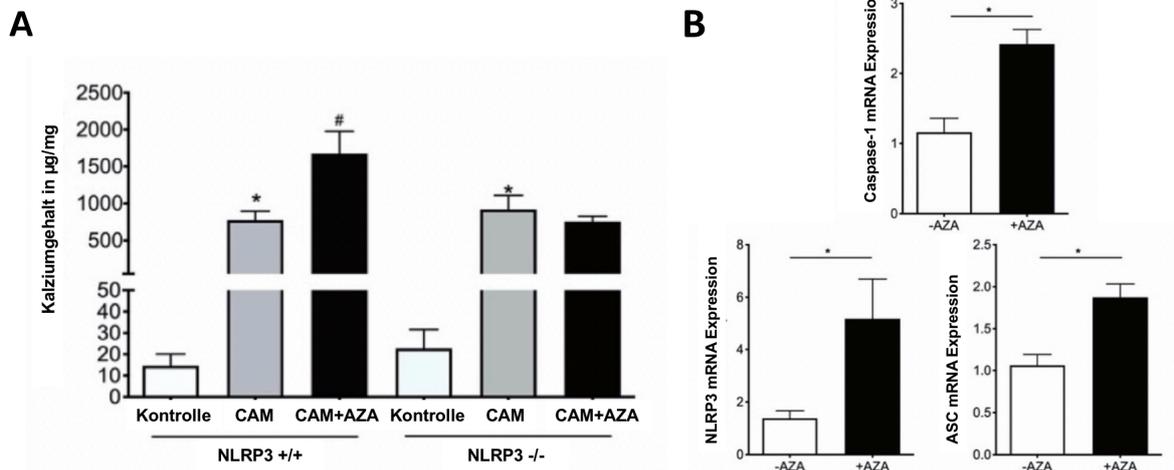


Abbildung 5: Die Rolle des NLRP-3-Inflammasoms für die azathioprininduzierte mVK (66).

A) Kalziumgehalt des aortalen Gewebes von NLRP3-*knockout*- im Vergleich zu Wildtypmäusen nach ex vivo Inkubation über 14 Tage mit kalzifizierendem Medium mit/ohne Azathioprin. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu CAM. **B)** mRNA Expression der Bestandteile des NLRP-3-Inflammasoms im aortalen Gewebe der Ratten mit (+)/ohne (-) Azathioprinfütterung. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$ nach Mann-Whitney-U Test.

Die Ko-Stimulation mit Aza führt zu einer erhöhten Kalzifizierungslast im aortalen Gewebe; dieser Effekt ist in NLRP-3 *knockout* Mäusen nicht nachweisbar (s. Abb. 5). Zudem kommt es nach Aza-Stimulation zu einer erhöhten Expression der Proteine, die am NLRP-3 Inflammasom beteiligt sind.

3.4. Publikation 4

Mit dieser Arbeit sollte ein neues *ex vivo* Modell etabliert werden, dessen Konzept *a priori* die Untersuchung des Endothel-Einflusses und der EZM in einem physiologischeren Kontext untersuchbar macht. Wie in den Reviews (Publikation 1 und 2) herausgearbeitet werden konnte, handelt es sich bei diesen um wichtige Einflussfaktoren in der Pathogenese der mVK, welche nicht ausreichend in etablierten experimentellen Modellen

abgebildet sind. Im Rahmen des *proof of concept* sollte im Vergleich zur etablierten *ex vivo* Inkubation gezeigt werden, dass unser Perfusionsmodell ebenfalls geeignet ist, eine robuste mVK in Rattenaorten und den Phänotypenwechsel von VSMC zu induzieren, während eine physiologische luminale Stimulation erfolgt und die Gewebsarchitektur erhalten bleibt.

Proof of concept – Vergleich zur etablierten *ex vivo* Inkubation von Aortenringen

Weder hatten Handhabung und Präparation einen Einfluss auf den Kalziumgehalt der Rattenaorten noch führte die 14-tägige Perfusion bzw. Inkubation mit COM zu einem signifikanten Unterschied im Kalziumgehalt der Aorten (Publikation 4, Abb. 2a).

Die Hämatoxylin/Eosin Färbung ergab eine strukturelle Integrität der betrachteten Aortenringe ohne mikroskopischen Anhalt für Nekrosen (Publikation 4, Abb. 4).

Induktion der mVK und osteogenen Transdifferenzierung im neuen Modell der isoliert perfundierten Rattenaorta

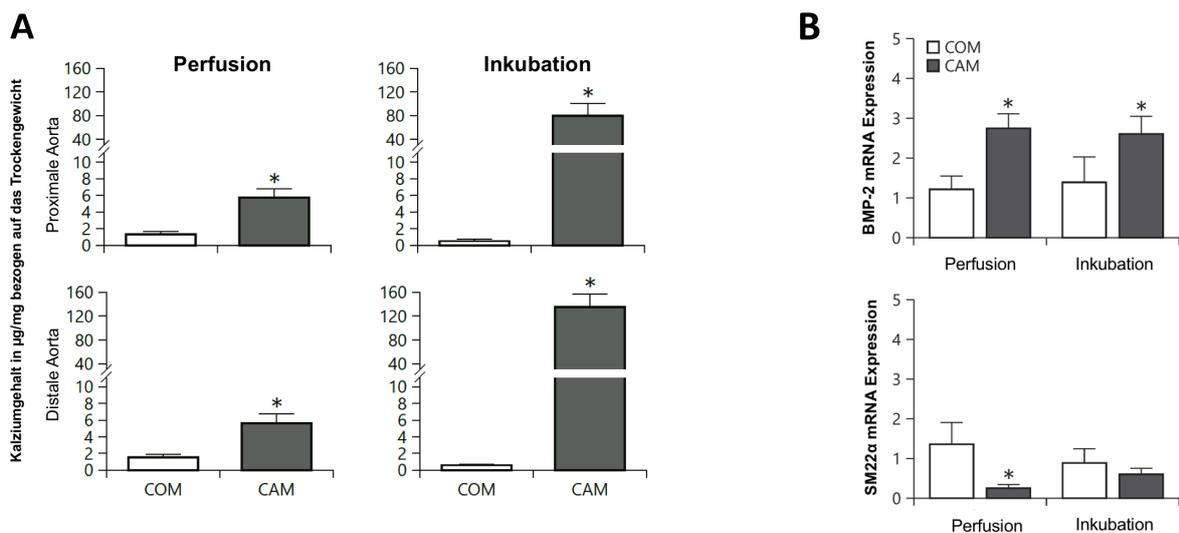


Abbildung 6: Induktion der mVK und osteogenen Transdifferenzierung (67). Weiße Säule = COM, graue Säule = CAM. **A)** Vergleich des Kalziumgehalts nach Perfusion bzw. Inkubation mit COM und CAM. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 15$. * $p < 0,05$. **B)** mRNA Expression im aortalen Gewebe nach Perfusion bzw. Inkubation mit COM und CAM. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \leq 5$. * $p < 0,05$ nach Mann-Whitney-U Test.

Im etablierten Modell der Inkubation der Aortenringe mit CAM ergab sich ein 90-135-fach erhöhter Kalziumgehalt bezogen auf das Trockengewicht im Vergleich zur Inkubation mit COM. Im neuen Modell der Perfusion mit CAM war der Kalziumgehalt bezogen auf das

Trockengewicht im Vergleich zur Perfusion mit COM etwa 5-fach für den proximalen und etwa 6-fach für den distalen Teil der Aorta erhöht (s. Abb. 6). Die Alizarin-Rot Färbung ergab für Perfusion und Inkubation mit CAM Calciumphosphatablagerungen entlang der *tunica media* und ihren elastischen Fasern, wobei nach Inkubation auch randständige Ablagerungen zum Übergang der *tunica adventitia* auftraten (repräsentativ in Publikation 4, Abb. 4 zu sehen).

3.5. Publikation 5

Die Rationale für diese Arbeit lag darin, die komplexen, teilweise überlappenden Signalwege intrazellulär auf Einzelzellbasis untersuchbar zu machen; dabei liegt die methodische Schwierigkeit auch darin, Seneszenz und DNA-Schäden experimentell sicher nachzuweisen, da hier mehrere Marker betrachtet werden müssen. Um den Zusammenhang zur mVK zu untersuchen, müssen außerdem Kalzifizierungsmarker evaluiert werden, so dass ein hoher Zell-/Gewebeinsatz notwendig ist. Dieses gilt insbesondere in Anbetracht der Vielzahl an experimentell verwandten Induktoren der mVK, deren *downstream* Signalwege nur teilweise bekannt sind. Durch eine elaboriertere Evaluation mehrerer Marker über die gemeinhin angewandte Messung der Kalziumlast oder Expression einzelner Proteine hinaus aus dem gleichen experimentellen Ansatz, könnte diesem Problem begegnet werden. Mit dieser Arbeit sollte daher ein neues Protokoll zur parallelen Darstellung von Seneszenzmarkern (SA- β -Gal, SAHF, p21) und dem Kalzifizierungsmarker OPN mittels Immunfluoreszenz bzw. RNA-in-situ-Hybridisierung mit dem Ziel des *multiplexings* etabliert werden.

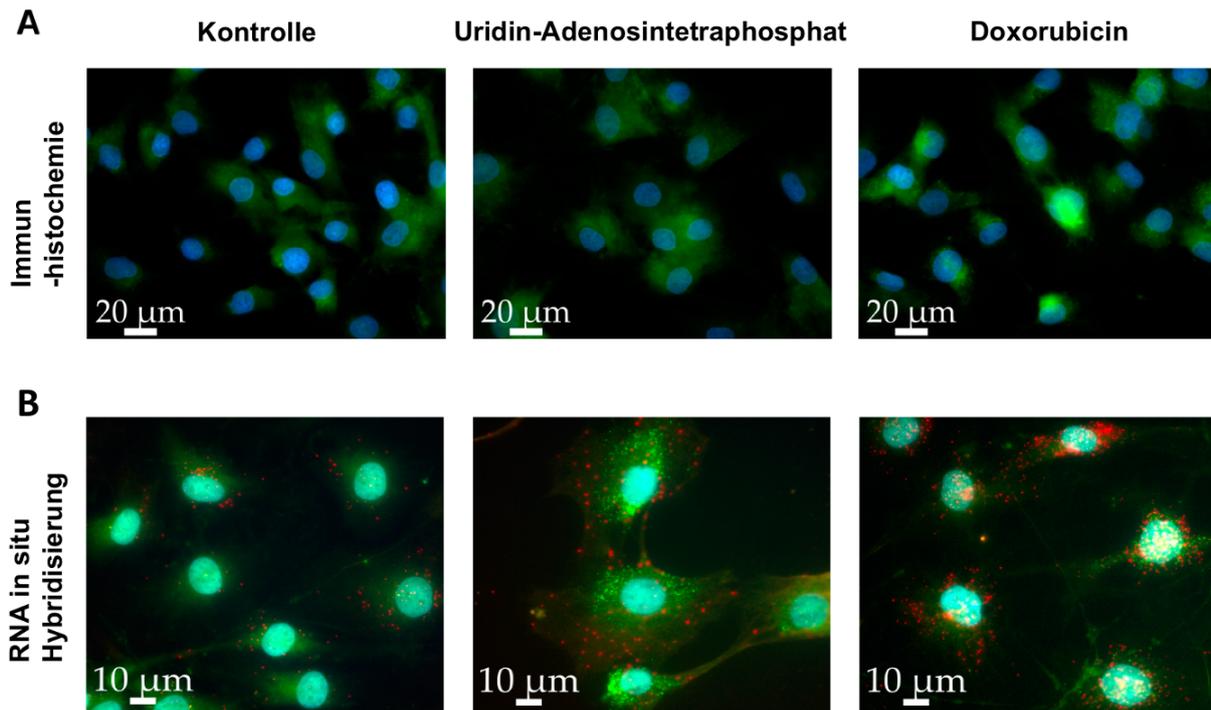


Abbildung 7: Fusionsbilder der Fluoreszenzsignale nach Stimulation mit Uridin-Adenosintetraphosphat (Up4A, 100 µmol/ml) und Doxorubicin (500 nmol/ml) in primären glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten (68). Gezeigt sind repräsentative Bilder dreier unabhängiger Versuche. **A)** Fluoreszenzsignal von SA-β-Gal (grün) im Kontrast der Zellkerne (blau) nach 72 stündiger Stimulation mit Up4A und Doxorubicin. **B)** Fluoreszenzsignal von OPN (grün), SAHF (orange), p21 (rot) nach 48 stündiger Stimulation mit Up4A und Doxorubicin.

Mit dem Ziel einer robusten Induktion von Seneszenz- und Kalzifizierungsmarkern, die für die Etablierung dieser Methode notwendig war, stimulierten wir die Zellen mit Dox, welches ein breit angewandter Induktor der Seneszenz ist (69), und mit Up4a als bekanntem Induktor der mVK. Während die genauen Signalwege nach Up4a Stimulation nicht bekannt sind, ist ein Teil von der OPN- Expression abhängig (70) dem Marker, der hier vordergründig dargestellt werden sollte.

Die Stimulation mit Dox induzierte sowohl ein erhöhtes Fluoreszenzsignal von SA-β-Gal (Publikation 5, Abb. 2) als auch eine signifikant erhöhte mRNA Expression von p21 (Publikation 5, Abb. 4). Die Stimulation mit Up4A hingegen führte zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal und mRNA Expression von OPN, nicht aber von SA-β-Gal, p21 und SAHF (Publikation 5, Abb. 3). Das Pixelsummensignal zeigte interindividuelle Unterschiede in der Markerexpression der Zellen des gleichen Ansatzes und der gleichen Stimulation insbesondere für OPN. Aufgrund von Signalüberschneidungen war die

automatisierte Quantifizierung mit der hier verwandten technischen Ausstattung und damit eine statistische Auswertung für OPN und SAHF nicht belastbar möglich.

Abb. 7 zeigt ein Fusionsbild der Fluoreszenzsignale der untersuchten Marker; mit dem neu etablierten Protokoll ist die parallele Evaluation dieser Marker auf Einzel-Zell-Basis möglich.

4. Diskussion

4.1. Die Rolle von Zellstress für das (patho)physiologische vaskuläre Altern

Wesentlich für den vaskulären Alterungsprozess und ihr histologisches Korrelat – die mVK – ist die Änderung des Expressionsprofils von VSMC zu einem seneszenten, osteoblastischen Phänotyp. Im Rahmen von Publikation 1 wurde deutlich, dass vor allem Inflammation, oxidativer Stress und eine endotheliale Dysfunktion hierzu geeignet sind und Nikotin über die Schaffung von Zellstress und konsekutivem DNA-Schaden im vaskulären Milieu mechanistisch Einfluss auf die Entstehung der mVK nehmen und damit zu einem vorzeitigen Altern des vaskulären Systems beitragen könnte (49). Hierbei handelt es sich um allgemeine Prozesse, die keineswegs spezifisch für die mVK oder einen Nikotineinfluss sind; deutlich wird dieser Zusammenhang auch in der Anzahl der Modelle und Induktoren, die in Publikation 2 herausgearbeitet wurde (64). Verschiedene Substanzen wie beispielsweise Aza und Dox, aber auch Diabetes mellitus und der Alterungsprozess selbst, führen über ähnliche Prozesse (u.a. Inflammation, oxidativer Stress) zum gleichen Ergebnis: der Ablagerung von Hydroxylapatit in der *tunica media*. Während Teile der Signalwege unterschiedlicher Stressoren untersucht sind, ist „der“ Schlüsselmechanismus mit Eignung für eine pharmakologische Intervention bislang nicht identifiziert und Teilprozesse unzureichend verstanden.

Ein grundlagenwissenschaftlich bekannter Induktor von Zellstress durch reaktive Sauerstoffspezies ist Aza; für den wesentlichen Metaboliten 6-Mercaptopurin konnte unsere Arbeitsgruppe *in vitro* und *ex vivo* eine Induktion der mVK zeigen, wobei die genauen Pathomechanismen nicht bekannt sind (65). Im Rahmen von Publikation 3 sollte dieser Effekt *in vivo* im Rahmen eines Langzeitmodells – korrespondierend zur jahrelangen Genese der mVK – und mögliche Signalwege untersucht werden.

Wir konnten zeigen, dass Aza in diesem Modell zu einem Phänotypenwechsel der VSMC mit signifikant gesteigerter Expression osteoblastischer Marker (cbfa1, ALP, OPN) und

reduzierter Expression des kontraktilen Markers SM22 α führt (s. Abb. 3B). Während bei Betrachtung des Kalziumgehalts in den Aorten der gefütterten Tiere die Tendenz zu erhöhter Kalzifizierung deutlich wird, bestand jedoch bei dieser Anzahl an Versuchstieren und der bewusst niedrig gewählten Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht Aza keine statistische Signifikanz hinsichtlich der Kalzifizierungslast. In Abhängigkeit der Fragestellung werden teilweise 6-fach höhere Dosierungen eingesetzt, welche jedoch mit Gewichtsverlust, Entwicklungsverzögerung und Tierleid einhergehen. Im Sinne des grundsätzlichen Ziels aller hier dargestellten Arbeiten, nämlich der Implementierung des *reduce and refine* Gedankens für alle Tierexperimente wurde dieses Vorgehen gewählt und führte zu einer statistischen Signifikanz bei Betrachtung der Expressionsprofile (s. Abb. 3B). Zur weiteren mechanistischen Aufklärung untersuchten wir Teile der bekannten Schlüsselprozesse der mVK (s. Abb. 1); Hinweise für eine gestörte Kalzium-Phosphat-Homöostase oder einen Inhibitormangel der ektopten Kalzifizierung konnten nicht festgestellt werden (66).

Wie in der genannten Vorarbeit gezeigt werden konnte, führt die Stimulation mit 6-Mercaptopurin *in vitro* zu erhöhtem oxidativen Stress; diesen Effekt konnten wir als Trend für die Muttersubstanz Aza *in vivo* zeigen (s. Publikation 3, Abb. 2 sowie Abb. 4 C der Dissertation). Aza wird in der Aorta enzymatisch durch die HRPT1 und durch die XO verstoffwechselt (s. Publikation 3, Abb. 2). Bekannt ist zudem, dass eine erhöhte Aktivität der XO die osteoblastische Transdifferenzierung von VSMC induzieren kann und dieser Effekt mutmaßlich über reaktive Sauerstoffspezies vermittelt wird (65, 71). Tatsächlich kann aus dem signifikant erhöhten Expressionsprofil der XO und dem reduzierten Expressionsprofil von HRPT1 in Publikation 3 gefolgert werden, dass die Verstoffwechslung über XO bevorzugt wird und daher die erhöhte oxidative Last resultiert.

Wie in der Einleitung beschrieben, sind eine chronische Inflammation und Expression verschiedener Zytokine Charakteristikum des Gefäßalterungsprozesses und der mVK; wir bestimmten daher die Plasmakonzentration von 23 Zytokinen. Signifikant gesteigert waren die Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und VEGF (s. Abb. 4A), wobei IL-1 β und IL-6 auch signifikant vermehrt im aortalen Gewebe exprimiert worden sind (s. Abb. 4B). Die in der Interventionsgruppe festgestellten, gesteigerten systemischen und lokalen Konzentration von IL-6 und IL-1 β sind bekannte Charakteristika eines alternden Organismus und des *Inflamming*s der Vaskulatur (72, 73). Die Hemmung von IL-6 führt

in vitro sogar zu einer verminderten Expression kalzifizierender Marker von VSMC (74). Der Umstand, dass nicht alle gemessenen inflammatorischen Zytokine in erhöhten Konzentrationen vorlagen, spiegelt die Komplexität der Immunantwort wider.

Aus der Literatur ist bekannt, dass in der Pathogenese der mVK das NLRP-3 Inflammasom frühzeitig aktiviert wird; dieses könnte als PRR das „Bindeglied“ zwischen unspezifischen Stressoren und einer Signalkaskade, die im *Inflamming* und letztlich in der mVK mündet, darstellen. Da in vaskulären Zellen das hier prominente Zytokin IL-1 β wesentlich durch dieses Inflammasom aktiviert wird, betrachteten wir seine Aktivität. Tatsächlich war die lokale Expression der NLRP-3 Inflammasom-Bestandteile in der Interventionsgruppe signifikant gesteigert (s. Abb. 5B). Zur Verifizierung der Rolle des NLRP-3 Inflammasoms in der Aza abhängigen Induktion der mVK verglichen wir die aortale Kalzifizierungslast zwischen Wildtyp und NLRP-3 *knockout* Mäusen (s. Abb. 5A). Lediglich in den Wildtyp-Mäusen erbrachte die Kostimulation mit Aza eine erhöhte Kalzifizierungslast.

Die hier identifizierte Abhängigkeit der azathioprininduzierten mVK vom NLRP-3 Inflammasom und dem oxidativen Stress als möglichem Vermittler dieses Effekts korrespondiert mit Daten aus der Literatur. So nimmt bei Inhibition der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung *in vitro* die Kalzifizierung von VSMC ab (75). Es ist zudem bekannt, dass die Aktivität des Inflammasoms den SASP von VSMC durch Induktion zentraler inflammatorischer Proteine regulieren kann (32) und sich daraus eine wesentliche Rolle beim *Inflamming* ergibt. Möglicherweise bildet es die Schnittmenge zwischen Veränderungen des Redoxsystems, Inflammation, der Transdifferenzierung vaskulärer Zellen und ihrer Seneszenz. Daraus könnte auch die bekannte Beteiligung bei altersabhängigen Erkrankungen resultieren (76). Auf Basis dieser Ergebnisse und der Literatur ist es auch als Konversionspunkt verschiedener Stressoren, die über unterschiedliche Mechanismen letztlich in der mVK münden, denkbar.

So konnten zuletzt Wu et al. zeigen, dass auch Nikotin bei vaskulären Zellen zu einer Pyroptose – also einem inflammatorischen, programmierten Zelltod – führt, welcher vom NLRP3-Inflammasom abhängig ist (77). Zahlreiche Hinweise deuten darauf, dass die Aktivierung dieses Inflammasoms unter anderem durch die Folgen oxidativen Stresses geschieht (78) und somit auch bei Nikotinexposition – parallel zum Aza - aktiviert werden könnte.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind die genauen Mechanismen der NLRP-3 Inflammasom-Aktivierung und die Rolle seiner einzelnen Bestandteile Diskussionsgegenstand (79). Dieser PRR ist Gegenstand extensiver Forschungsbemühungen der letzten Jahre, die zur Identifikation einzelner Aktivierungsmechanismen beigetragen haben. Dabei bleibt gerade der Stellenwert von oxidativem Stress als Induktor dieses PRR und seiner Folgen für die Zellhomöostase unklar (80).

Für eine pharmakologische Intervention stehen sogar klinisch eingesetzte Substanzen wie Canakinumab und Anakinra zur Verfügung, die als IL-1 β Inhibitoren *downstream* des NLRP-3 Inflammasoms wirken. Primäre Indikation stellen dabei in der Regel Krankheiten des rheumatischen Formenkreises dar, bei denen u.A. eine Dysregulation dieses Inflammasoms zugrunde liegen kann. Mittlerweile ist der Zusammenhang von chronischer Inflammation und kardiovaskulären Erkrankungen gut bekannt, so dass Canakinumab vor diesem Hintergrund auch hinsichtlich seines kardiovaskulären Benefits in einer groß angelegten Studie (CANTOS-Studie) bei Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt untersucht wurde. Hier waren jedoch Atherosklerose und ihre Folgen wie thrombembolische Ereignisse Schwerpunkt der Studie, nicht die mVK. Die Autoren konnten zeigen, dass es zu einer Reduktion der systemischen Inflammation und signifikanten Risikoreduktion der klassischen, primären kardiovaskulären Endpunkte kam, die Gesamtmortalität im Vergleich zum Placebo jedoch im Durchschnitt nicht reduziert werden konnte (80). Letzteres könnte an einer erhöhten Gefahr für schwere Infektionen liegen. Für andere anti-inflammatorische Medikamente wie Methotrexat beispielsweise konnte diese Risikoreduktion nicht nachgewiesen werden (81). Diese Intervention reduzierte jedoch auch nicht die Konzentrationen von IL-1 β bzw. IL-6, so dass hier ein weiterer Hinweis für die kritische Rolle dieser Zytokine für das kardiovaskuläre Risiko erkennbar ist.

Durch Publikation 3 konnte der besondere Stellenwert von oxidativem Stress als Induktor der mVK herausgearbeitet und das NLRP-3 Inflammasom als möglicher Konversionspunkt identifiziert werden, welcher durch die Produktion von IL-1 β die chronisch schwelende Inflammation, die dem *Inflammaging* so eigen ist, unterhalten kann und eine Schlüsselrolle für das vaskuläre Altern spielen könnte.

4.2. Die Fluoreszenzbasierte multiplex Methode zur Untersuchung des zeitlichen Zusammenhangs von mVK und Seneszenz

Interessanterweise war die mRNA Expression der Zellzyklusproteine p16, p21 und p53 infolge der Azathioprinfütterung nicht gesteigert, obwohl diese neben pro-inflammatorischen Zytokinen und kalzifizierenden Proteinen klassische Charakteristika des SASP und Seneszenz sind. Auf der einen Seite kann darin eine Teilbegründung für das geringere Ausmaß der Kalzifizierung *in vivo* nach Azathioprinfütterung im Vergleich zu den *in vitro* Daten liegen. Auf der anderen Seite wirft diese Feststellung die Frage auf, welcher zeitliche Zusammenhang zwischen der Seneszenz von VSMC und der Kalzifizierung besteht, da beide Prozesse im Rahmen des SASP gemeinsam betrachtet werden. Dabei ist bekannt, dass das Ausmaß der Seneszenz innerhalb eines Zellverbands individuell von Zelle zu Zelle unterschiedlich ausgeprägt sein kann (82) und für die verlässliche Detektion mehr als ein Marker der Seneszenz notwendig sein kann. Bislang besteht zudem Unklarheit darüber, ob mVK und Seneszenz vaskuläre Zellen im Sinne einer Lawine - beispielsweise nach Erreichen eines kritischen Milieus - gemeinsam betrifft oder ob diese im Sinne eines Schneeballs durch parakrine Signale betroffener Zellen nacheinander entstehen.

Diese Rationale liegt der Arbeit an Publikation 5 zugrunde, in welcher wir ein neues Protokoll zur parallelen Darstellung seneszenten und osteoblastischer Marker auf Einzelzellbasis etablierten.

Dieses ist für die Seneszenz-assoziierten Marker p21, SAHF und SA- β -Gal und für den Kalzifizierungsmarker OPN in VSMC gelungen (s. Abb. 7). Durch die Einzelzell-basierte Betrachtung konnte gezeigt werden, dass besonders die Expression des Kalzifizierungsmarkers OPN interindividuell zwischen den Zellen des gleichen Ansatzes unterschiedlich war und das Ausmaß der induzierten Seneszenz bzw. Kalzifizierung abhängig vom verwandten Induktor ist (68).

Während nach Dox-Stimulation vor allem die Seneszenz-assoziierten Marker SA- β -Gal und p21 gesteigert exprimiert wurden, führte die Up4a Stimulation zu einer tendenziell gesteigerten OPN Expression. Diese Ergebnisse unterstützen zum Einen die Feststellung, dass unterschiedliche Stressoren zum gleichen Ergebnis – der mVK oder vaskulärem Altern – führen, dabei aber unterschiedliche Signalwege auf einen noch nicht bekannten Schlüsselprozess konvergieren. Zum Anderen adressiert diese Methode den Verlust von Informationen auf Einzelzellbasis, welche für die Klärung der zeitlichen

Abläufe zwischen Zellstress durch Inflammation und reaktiven Sauerstoffspezies, Seneszenz und mVK kritisch erscheinen, insbesondere seitdem bekannt ist und hier auch gezeigt werden konnte, dass sich diese Prozesse ähnliche Signalkaskaden teilen (30).

Das neue Protokoll der fluoreszenzbasierten *multiplex* Methode erweitert dabei die experimentelle Landschaft der mVK um die Möglichkeit, trotz eines reduzierten Materialeinsatzes die phänotypische Ausprägung einzelner vaskulärer Zellen von kontraktile zu Seneszenz-assoziiert bzw. osteoblastär auf Einzelzellbasis zu untersuchen und den zeitlichen Ablauf oben genannter Prozesse genauer zu betrachten.

4.3. Die Rolle der Zell-Zell und Zell-EZM Interaktion für das (patho)physiologische vaskuläre Altern und die Voraussetzungen für eine Modellimplementation

Neben der Bedeutung von Zellstress für die Transdifferenzierung von VSMC und der Notwendigkeit der Klärung zeitlicher Abläufe lieferten die vorgestellten Arbeiten auch Hinweise auf eine wesentliche Rolle der Wechselwirkung von Endothel, VSMC und EZM in der Pathogenese der mVK sowie für das Problem, dass diesbezüglich im Rahmen von Publikation 2 eine „experimentelle Lücke“ in der Methodik identifiziert werden konnte (64). Diesem sollte mit der Etablierung der IPA in Publikation 4 Rechnung getragen werden.

Wie eingangs erwähnt, gehört die endotheliale Dysfunktion zu den Kennzeichen vaskulären Alterns und VSMC stehen physiologisch in Abhängigkeit von parakrinen Signalen und der Barrierefunktion des Endothels, welche kritisch für die Entwicklung und Aufrechterhaltung vaskulärer Funktionen sind; darüber hinaus ist bekannt, dass das Expressionsprofil von VSMC und Endothelzellen bei unabhängiger Kultur im Vergleich zur Ko-Kultivierung variiert (83). Dieses legt nahe, dass eine pathophysiologische Aufklärung vaskulären Alterns auch im Kontext einer erhaltenen Gefäßarchitektur untersucht werden sollte. Zell-Monokulturen bieten nicht die Möglichkeit, den Einfluss des Endothels auf VSMC zu untersuchen, für welches in den letzten Jahren eine Schlüsselrolle angenommen wird (84). Aber auch Fragmente der EZM wie Elastin können Kalzifizierungs-„Nester“ darstellen und eine erhöhte Aktivität der EZM-degradierenden Enzyme MMP-2 und -9 führt zu einer gesteigerten Kalzifizierungslast, wie im Rahmen von Publikation 1 herausgearbeitet wurde.

Dennoch findet die Ko-Kultivierung als *in vitro* Modell für die VK nicht die breite Anwendung, die man annehmen würde. Dieser Umstand begründet sich im Wesentlichen durch die unterschiedlichen Wachstumsraten von Endothelzellen und VSMC sowie der Notwendigkeit einer räumlichen Trennung der Zelltypen, um das Überwachsen durch den schneller proliferierenden Zelltypen zu verhindern. Daher kennzeichnen sich die aus der Literatur bekannten Ko-Kultur Modelle durch die Verwendung von Membranen oder Gelmatrix, die eine räumliche Nähe der ko-kultivierten Zelltypen nur auf wenige Mikrometer zulassen (85). *Ex vivo* Versuche mit Aortenringen begegnen diesem Problem, lassen aber einen direkten Einfluss der betrachteten Substanzen auf die *tunica media* und *adventitia* aufgrund der extraluminale Stimulation zu.

Auch praktische experimentelle Hürden wie Verletzungen des Endothels beim Schneiden der Aorta in Ringe und fehlende Scherkräfte, die wesentlich für die NO-Produktion des Endothels und damit für die Regulation des vaskulären Milieus sind (86), limitieren die Endothelfunktion und damit die Aussagekraft des *ex vivo* Inkubations-Ansatzes.

In vivo Modelle hingegen ermöglichen die komplexen Interaktionen eines lebendigen Stoffwechsels mit erhaltener Barrierefunktion des Endothels und Inhibitoren. Im Rahmen von Publikation 3 wurde ein geringerer kalzifizierender Effekt von Aza *in vivo* im Vergleich zu publizierten *in vitro* Daten gezeigt (66), was beispielhaft für die eingeschränkte Übertragbarkeit von *in vitro* und *ex vivo* Daten auf die Situation im lebendigen Organismus steht. Auch die bereits lange 24-wöchige Versuchsdauer bildet nicht den jahrelangen Einsatz von Aza bei Patienten adäquat ab. Trotz der bereits beschriebenen reduzierten Dosierung von Aza, die eingesetzt wurde, ist die Versuchsdauer in Hinblick auf das Tierleid durch das Auftreten von Tumoren und anderen altersabhängigen Erkrankungen begrenzt (87). Auch die mVK als Alterungserscheinung ist folglich unzureichend in kurzen experimentellen Ansätzen untersuchbar, so dass die IPA einem Langzeitmodell entsprechen sollte.

Die niedrigere Kalzifizierungslast *in vivo* gibt letztlich auch die intrinsische Resilienz von Nagetieren gegenüber der mVK wieder. Folglich kann man aus der Methodologie der mVK aus diesen Gründen insbesondere für *in vivo* Versuche von einem erhöhten Stress und Tierleid ausgehen. Die Bedeutung angemessener, weitestgehend natürlicher Bedingungen für die Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen, für deren geringere Variabilität und damit für die Versuchszahl zum Erreichen signifikanter Ergebnisse ist dabei seit Jahrzehnten bekannt (88). Daher sollte die Etablierung neuer Modelle immer

unter den Gesichtspunkten *replace*, *reduce* und *refine* nach Russell und Burch erfolgen; das ist hinsichtlich der in Publikation 5 vorgestellten Methode durch das Multiplexen von kalzifizierenden und seneszenten Markern, welches zu einer geringeren Zahl an Tieren führt, die zur Primärzellisolierung nötig sind, gelungen (68) und sollte auch in der IPA umgesetzt werden.

4.4. Die isoliert perfundierte Rattenaorta als neues ex vivo Modell der mVK mit der Möglichkeit einer physiologischeren Endothel-Media-EZM Interaktion

Der Umstand, dass die Methodik der mVK wenig Möglichkeiten zur Untersuchung ihrer Pathogenese in einem annähernd physiologischen, vaskulären Milieu bietet und *in vivo* Experimente eines enormen Eingriffs in den physiologischen Stoffwechsel der Tiere bedürfen, führte zur Etablierung der in Publikation 4 vorgestellten Methode der IPA. Dieses Modell erlaubt auf der einen Seite Versuche im vaskulären Umfeld und damit die Interaktion zwischen Endothel, VSMC und EZM und auf der anderen Seite bildet es eine Brücke zwischen dem etablierten *ex vivo* Modell und den *in vivo* Versuchen aufgrund der größeren Nähe zu physiologischen Prozessen bei Erhaltung eines effizienten, handhabbaren experimentellen Vorgehens und der Möglichkeit zur Langzeitperfusion (67). Die neu etablierte, atraumatische Präparationsmethode hatte keinen Einfluss auf den Kalziumgehalt (Publikation 4, Abb. 2a) und die strukturelle Integrität des Gewebes (Publikation 4, Abb. 4). Nach 14-tägiger Versuchszeit ergab sich nach Stimulation mit kalzifizierendem Medium eine erhöhte Kalzifizierungslast, welche histologisch in der *tunica media* lokalisiert werden konnte, und eine signifikant erhöhte Expression des osteogenen Markers. Damit ist auch im neuen Modell die Induktion der mVK und seines Schlüsselprozesses, der osteogenen Transdifferenzierung, gelungen. Die Bedeutung der unphysiologischen, extraluminalen Stimulation wurde in der reduzierten Kalzifizierung nach Perfusion von Aorten der IPA im Vergleich zur Inkubation deutlich (67). Während die Expressionsprofile zwischen beiden Ansätzen relativ vergleichbar waren, war die Kalzifizierungslast nach Inkubation etwa 5-6-fach im Vergleich zum neuen Perfusionsmodell erhöht (s. Abb. 6). Ursächlich anzunehmen ist, dass Kalzifizierungsnester, die durch die unphysiologische extraluminale Stimulation im Inkubationsansatz z.B. auch in der *tunica adventitia* entstehen, selbst einen Kalzifizierungsreiz darstellen.

In der Literatur sind *ex vivo* Perfusionskonzepte von arteriellen Gefäßabschnitten beschrieben, welche aber gezielt für kürzere Studien Anwendung finden. Wang et al. etablierten ein Modell der Perfusion von Apolipoprotein E defizienten Mausarten, mit dem Ziel, während des Perfusionsprozesses Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop durchführen zu können (89). Dabei wurde die Mousaorta in einem elastischen Polymer fixiert und über 24 Stunden perfundiert. Für dieses Modell stand die Untersuchung der Atherosklerose, also der intimalen Plaquebildung, im Vordergrund, so dass der Einfluss der EZM auf das Proliferationsverhalten der vaskulären Zellen eine geringere Rolle als bei einem Modell für die mVK spielte. Darüber hinaus ist ein wesentliches Ziel der IPA, eine Langzeitperfusion unter sterilen Bedingungen über 14 Tage zu ermöglichen. Dieses trägt dem Umstand Rechnung, dass die VK ein altersabhängig fortschreitender Prozess ist und sich über Jahre entwickelt. Dieses wird aktuell in keinem Modell abgebildet und auch die Perfusion über 14 Tage kann dieses nicht vollständig kompensieren. Ein weiteres beschriebenes Perfusionsmodell (90) rückt zwar unter Verwendung von humanen Gefäßen aus Nabelschnüren die Endothelrolle in den Vordergrund, betrachtet diese aber während einer einstündigen *ex vivo* Perfusion (90); dennoch kann der Einsatz humaner Gefäße aus Nabelschnüren für zukünftige Versuche mit der IPA geeignet sein, um eine größere Nähe zu humanen Prozessen zu ermöglichen.

In Hinblick auf den Anspruch eines möglichst physiologischen Modells weist die IPA einige konzeptionelle Einschränkungen auf: Der Perfusionskreislauf wurde durch eine peristaltische Pumpe aufrecht erhalten, welche einen definierten, konstanten Perfusionsdruck sowie -frequenz bot. Dieses unterscheidet sich vom physiologischen, pulsatilen Blutfluss, bietet aber definierte Scherkräfte für das Endothel. Die Endothelfunktion wurde im Rahmen des *proof of concepts* durch den Nachweis einer unveränderten Kalzifizierungslast im Vergleich zur *ex vivo* Inkubation und durch die histologische Integrität des Gewebes gezeigt – beides sind Folgen mechanischer Traumata des Endothels. Zeichen der Nekrose wurden mikroskopisch ausgeschlossen, aber es erfolgte kein funktioneller Viabilitätsnachweis des Endothels beispielsweise mittels *small vessel Myograph*. Die Methode bietet aber ein solides Fundament dafür, die mVK im lokalen Kontext des vaskulären Milieus zu untersuchen und das Endothel sowie die EZM in den Vordergrund eines experimentellen Ansatzes zu rücken, gleichzeitig aber

durch Implementation des *reduce* und *refine* Gedankens einen Beitrag zur Verbesserung tierexperimenteller Umstände zu leisten.

Mit den Arbeiten zu dieser Dissertation wurde zunächst der wissenschaftliche Stand zur Pathogenese und die grundlagenwissenschaftliche Methodik der mVK erarbeitet. In der Vielzahl der experimentellen Modelle wurde zum Einen deutlich, dass diese nur Teile der komplexen Pathophysiologie abbilden können, und zum Anderen, dass insbesondere Informationen auf Einzelzellbasis, die unabdingbar für die Aufschlüsselung des zeitlichen Verlaufs von mVK zu Seneszenz und vaskulärer Alterung erscheinen, überwiegend verloren gehen. Diesen identifizierten „Lücken“ in der Grundlagenforschung der mVK wurde durch die Etablierung der IPA (Publikation 4) und durch die Protokolletablierung der fluoreszenzbasierten, parallelen Auswertung von kalzifizierenden und seneszenten Markern auf Einzelzellbasis (Publikation 5) begegnet und die experimentelle Landschaft um diese beiden Schwerpunkte diversifiziert. Die letztgenannte Methode wurde im Verlauf weiterentwickelt (91), so dass die Auswertung der Kalzifizierungslast, anders als bei der weit verbreiteten kalorimetrischen Methode, einzellzellbasiert auch im Gewebe möglich ist. Beide Modelle folgen dabei dem 3-R-Prinzip nach Russel und Burch, hier charakterisiert durch reduziertes Tierleid und effektiven Materialeinsatz.

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl an Stressoren zum (patho-)physiologischen Gefäßaltern beitragen und im histologischen Korrelat der mVK münden, ohne dass ein Konversionspunkt nachgewiesen ist. In Publikation 3 konnte für Aza als Modellinduktor oxidativen Stresses das NLRP-3 Inflammasom unter systemischen Bedingungen als ein möglicher Konversionspunkt für die Wechselwirkung von Zellstress und *Inflammageing* identifiziert werden. Es bleibt zu hoffen, dass eine detaillierte Aufschlüsselung der NLRP-3-Inflammasom-Signalkaskade im Kontext der mVK und ihrer Risikofaktoren zur Entwicklung einer effektiven therapeutischen Intervention beitragen kann, die das *Inflammaging* gezielt adressiert, ohne die kritische physiologische Funktion dieses PRR zu beeinträchtigen. Hierfür stehen bereits einige Substanzen zur Verfügung, die in klinischen Interventionsstudien bezüglich des Einflusses auf die mVK und damit auf das *Inflammaging* betrachtet werden sollten.

5. Literaturverzeichnis

1. Rapsomaniki E, Timmis A, George J, Pujades-Rodriguez M, Shah AD, Denaxas S, White IR, Caulfield MJ, Deanfield JE, Smeeth L, Williams B, Hingorani A, Hemingway H. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1.25 million people. *Lancet*. 2014;383(9932):1899-911.
2. Timmis A, Townsend N, Gale CP, Torbica A, Lettino M, Petersen SE, Mossialos EA, Maggioni AP, Kazakiewicz D, May HT, De Smedt D, Flather M, Zuhlke L, Beltrame JF, Huculeci R, Tavazzi L, Hindricks G, Bax J, Casadei B, Achenbach S, Wright L, Vardas P, European Society of C. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J*. 2020;41(1):12-85.
3. McClelland RL, Chung H, Detrano R, Post W, Kronmal RA. Distribution of coronary artery calcium by race, gender, and age: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation*. 2006;113(1):30-7.
4. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
5. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(10):576-90.
6. Sanchis P, Ho CY, Liu Y, Beltran LE, Ahmad S, Jacob AP, Furmanik M, Laycock J, Long DA, Shroff R, Shanahan CM. Arterial "inflammaging" drives vascular calcification in children on dialysis. *Kidney Int*. 2019;95(4):958-72.
7. Nakano-Kurimoto R, Ikeda K, Uraoka M, Nakagawa Y, Yutaka K, Koide M, Takahashi T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M, Matsubara H. Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(5):H1673-84.
8. Jaminon A, Reesink K, Kroon A, Schurgers L. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification-Related Processes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22).
9. Tolle M, Reshetnik A, Schuchardt M, Hohne M, van der Giet M. Arteriosclerosis and vascular calcification: causes, clinical assessment and therapy. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(9):976-85.
10. Keelan PC, Bielak LF, Ashai K, Jamjoum LS, Denktas AE, Rumberger JA, Sheedy IP, Peyser PA, Schwartz RS. Long-term prognostic value of coronary calcification detected by electron-beam computed tomography in patients undergoing coronary angiography. *Circulation*. 2001;104(4):412-7.
11. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 2007;116(1):85-97.
12. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14(6):525-31.
13. Kooman JP, Kotanko P, Schols AM, Shiels PG, Stenvinkel P. Chronic kidney disease and premature ageing. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(12):732-42.
14. Goldstein SL, Currier H, Watters L, Hempe JM, Sheth RD, Silverstein D. Acute and chronic inflammation in pediatric patients receiving hemodialysis. *J Pediatr*. 2003;143(5):653-7.
15. Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, Shah VO, Balakrishnan VS, Guzman NJ, Girndt M, Periera BG, Feldman HI, Kusek JW, Joffe MM, Raj DS, Investigators CS. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(12):1938-46.

16. Ohnishi M, Razzaque MS. Dietary and genetic evidence for phosphate toxicity accelerating mammalian aging. *FASEB J.* 2010;24(9):3562-71.
17. Voelkl J, Lang F, Eckardt KU, Amann K, Kuro OM, Pasch A, Pieske B, Alesutan I. Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(11):2077-91.
18. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis GA, Vogiatzi G, Papaioannou S, Devereux S, Tousoulis D. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol.* 2019;14(1):50-9.
19. Hirschl M, Francesconi M, Hirschl MM. [Moенckeberg media sclerosis: clinical aspects in diabetic patients]. *Vasa.* 1991;20(3):216-21.
20. Herrmann J, Xia M, Gummi MR, Greco A, Schacke A, van der Giet M, Tölle M, Schuchardt M. Stressor-Induced "Inflammaging" of Vascular Smooth Muscle Cells via Nlrp3-Mediated Pro-inflammatory Auto-Loop. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:752305.
21. Covic A, Siritopol D. Pulse wave velocity ratio: the new "gold standard" for measuring arterial stiffness. *Hypertension.* 2015;65(2):289-90.
22. Ben-Shlomo Y, Spears M, Boustred C, May M, Anderson SG, Benjamin EJ, Boutouyrie P, Cameron J, Chen CH, Cruickshank JK, Hwang SJ, Lakatta EG, Laurent S, Maldonado J, Mitchell GF, Najjar SS, Newman AB, Ohishi M, Pannier B, Pereira T, Vasani RS, Shokawa T, Sutton-Tyrell K, Verbeke F, Wang KL, Webb DJ, Willum Hansen T, Zoungas S, McEnery CM, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(7):636-46.
23. Mohan J, Bhatti K, Tawney A, Zeltser R. *Coronary Artery Calcification Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30085579>].
24. Virchow R. Der ateromatose prozess der arterien. *Wien Med Wochenschr.* 1856;6:825-7.
25. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation.* 1999;100(21):2168-76.
26. Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, Frutkin A, Dichek D, Giachelli CM. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res.* 2009;104(6):733-41.
27. Phimpilai M, Zhao Z, Boules H, Roca H, Franceschi RT. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res.* 2006;21(4):637-46.
28. Kurozumi A, Nakano K, Yamagata K, Okada Y, Nakayamada S, Tanaka Y. IL-6 and sIL-6R induces STAT3-dependent differentiation of human VSMCs into osteoblast-like cells through JMJD2B-mediated histone demethylation of RUNX2. *Bone.* 2019;124:53-61.
29. Stamatelopoulos KS, Kitas GD, Papamichael CM, Chrysoshoou E, Kyrkou K, Georgiopoulos G, Protogerou A, Panoulas VF, Sandoo A, Tentolouris N, Mavrikakis M, Sfrikakis PP. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis versus diabetes: a comparative study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(10):1702-8.
30. Song JS, Wang RS, Leopold JA, Loscalzo J. Network determinants of cardiovascular calcification and repositioned drug treatments. *FASEB J.* 2020;34(8):11087-100.

31. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM, Chen Y. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*. 2008;283(22):15319-27.
32. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, Carroll T, Capper D, Pritchard C, Inman GJ, Longerich T, Sansom OJ, Benitah SA, Zender L, Gil J. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):978-90.
33. Cobb AM, Yusoff S, Hayward R, Ahmad S, Sun M, Verhulst A, D'Haese PC, Shanahan CM. Runx2 (Runt-Related Transcription Factor 2) Links the DNA Damage Response to Osteogenic Reprogramming and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(4):1339-57.
34. Hossain M, Qadri SM, Liu L. Inhibition of nitric oxide synthesis enhances leukocyte rolling and adhesion in human microvasculature. *J Inflamm (Lond)*. 2012;9(1):28.
35. Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, Vitek M, Feelisch M, Grisham MB. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3(2):203-13.
36. Ungvari Z, Tarantini S, Kiss T, Wren JD, Giles CB, Griffin CT, Murfee WL, Pacher P, Csiszar A. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):555-65.
37. Yao Y, Jumabay M, Ly A, Radparvar M, Cubberly MR, Bostrom KI. A role for the endothelium in vascular calcification. *Circ Res*. 2013;113(5):495-504.
38. Albiero M, Avogaro A, Fadini GP. Circulating cellular players in vascular calcification. *Curr Pharm Des*. 2014;20(37):5889-96.
39. Li Y, Sun W, Saaoud F, Wang Y, Wang Q, Hodge J, Hui Y, Yin S, Lessner SM, Kong X, Fan D. MiR155 modulates vascular calcification by regulating Akt-FOXO3a signalling and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*. 2021;25(1):535-48.
40. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. 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. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(11):2857-67.
41. Chen NX, O'Neill KD, Moe SM. Matrix vesicles induce calcification of recipient vascular smooth muscle cells through multiple signaling pathways. *Kidney Int*. 2018;93(2):343-54.
42. Suzuki M, Shimokawa H, Takagi Y, Sasaki S. Calcium-binding properties of fetuin in fetal bovine serum. *J Exp Zool*. 1994;270(6):501-7.
43. Bjorklund G, Svanberg E, Dadar M, Card DJ, Chirumbolo S, Harrington DJ, Aaseth J. The Role of Matrix Gla Protein (MGP) in Vascular Calcification. *Curr Med Chem*. 2020;27(10):1647-60.
44. Jaminon AMG, Dai L, Qureshi AR, Evenepoel P, Ripsweiden J, Soderberg M, Witasp A, Olauson H, Schurgers LJ, Stenvinkel P. Matrix Gla protein is an independent predictor of both intimal and medial vascular calcification in chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2020;10(1):6586.
45. Schoppet M, Rauner M, Benner J, Chapurlat R, Hofbauer LC, Szulc P. Serum fetuin-A levels and abdominal aortic calcification in healthy men - The STRAMBO study. *Bone*. 2015;79:196-202.
46. Ngai D, Lino M, Bendeck MP. Cell-Matrix Interactions and Matricrine Signaling in the Pathogenesis of Vascular Calcification. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:174.

47. Yip CY, Chen JH, Zhao R, Simmons CA. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(6):936-42.
48. Schuchardt M, Tolle M, Prufer J, Prufer N, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances in vitro vascular calcification. *Kidney Int.* 2012;81(3):256-65.
49. Babic M, Schuchardt M, Tolle M, van der Giet M. In times of tobacco-free nicotine consumption: The influence of nicotine on vascular calcification. *Eur J Clin Invest.* 2019;49(4):e13077.
50. Wang Z, Wu W, Tang M, Zhou Y, Wang L, Xu W, Qiao Z. NF-kappaB pathway mediates vascular smooth muscle response to nicotine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(2):375-83.
51. Liu X, Wang CN, Qiu CY, Song W, Wang LF, Liu B. Adipocytes promote nicotine-induced injury of endothelial cells via the NF-kappaB pathway. *Exp Cell Res.* 2017;359(1):251-6.
52. Wang Y, Zhang F, Yang W, Xue S. Nicotine induces pro-inflammatory response in aortic vascular smooth muscle cells through a NFkappaB/osteopontin amplification loop-dependent pathway. *Inflammation.* 2012;35(1):342-9.
53. Yin HS, Li YJ, Jiang ZA, Liu SY, Guo BY, Wang T. Nicotine-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in mouse cardiac vascular endothelial cell via p38 MAPK signaling pathway. *Anal Quant Cytopathol Histopathol.* 2014;36(5):258-62.
54. Ashakumary L, Vijayammal PL. Effect of nicotine on antioxidant defence mechanisms in rats fed a high-fat diet. *Pharmacology.* 1996;52(3):153-8.
55. Xiao D, Huang X, Yang S, Zhang L. Antenatal nicotine induces heightened oxidative stress and vascular dysfunction in rat offspring. *Br J Pharmacol.* 2011;164(5):1400-9.
56. Jiang DJ, Jia SJ, Yan J, Zhou Z, Yuan Q, Li YJ. Involvement of DDAH/ADMA/NOS pathway in nicotine-induced endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(2):683-93.
57. Kuhlmann CRW, Trümper JRFC, Tillmanns H, Alexander Schaefer C, Erdogan A. Nicotine inhibits large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and the NO/-cGMP signaling pathway in cultured human endothelial cells. *Scandinavian Cardiovascular Journal.* 2009;39(6):348-52.
58. Alesutan I, Feger M, Tuffaha R, Castor T, Musculus K, Buehling SS, Heine CL, Kuro OM, Pieske B, Schmidt K, Tomaschitz A, Maerz W, Pilz S, Meinitzer A, Voelkl J, Lang F. Augmentation of phosphate-induced osteo-/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovasc Res.* 2016;110(3):408-18.
59. Wagenhauser MU, Schellinger IN, Yoshino T, Toyama K, Kayama Y, Deng A, Guenther SP, Petzold A, Mulorz J, Mulorz P, Hasenfuss G, Ibing W, Elvers M, Schuster A, Ramasubramanian AK, Adam M, Schelzig H, Spin JM, Raaz U, Tsao PS. Chronic Nicotine Exposure Induces Murine Aortic Remodeling and Stiffness Segmentation-Implications for Abdominal Aortic Aneurysm Susceptibility. *Front Physiol.* 2018;9:1459.
60. Hashimoto K, Zaima N, Sekiguchi H, Kugo H, Miyamoto C, Hoshino K, Kawasaki N, Sutoh K, Usumi K, Moriyama T. Dietary DNA Attenuates the Degradation of Elastin Fibers in the Aortic Wall in Nicotine-Administrated Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2018;64(4):271-6.
61. Carty CS, Soloway PD, Kayastha S, Bauer J, Marsan B, Ricotta JJ, Dryjski M. Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 1996;24(6):927-34; discussion 34-5.
62. Jacob-Ferreira AL, Palei AC, Cau SB, Moreno H, Jr., Martinez ML, Izidoro-Toledo TC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Evidence for the involvement of matrix metalloproteinases in the cardiovascular effects produced by nicotine. *Eur J Pharmacol.* 2010;627(1-3):216-22.

63. Gu Z, Fonseca V, Hai CM. Nicotinic acetylcholine receptor mediates nicotine-induced actin cytoskeletal remodeling and extracellular matrix degradation by vascular smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol*. 2013;58(1-2):87-97.
64. Herrmann J, Babic M, Tolle M, van der Giet M, Schuchardt M. Research Models for Studying Vascular Calcification. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6).
65. Prufer J, Schuchardt M, Tolle M, Prufer N, Hohne M, Zidek W, van der Giet M. Harmful effects of the azathioprine metabolite 6-mercaptopurine in vascular cells: induction of mineralization. *PLoS One*. 2014;9(7):e101709.
66. Schuchardt M, Herrmann J, Henkel C, Babic M, van der Giet M, Tolle M. Long-Term Treatment of Azathioprine in Rats Induces Vessel Mineralization. *Biomedicines*. 2021;9(3).
67. Schuchardt M, Siegel NV, Babic M, Reshetnik A, Lutzenberg R, Zidek W, van der Giet M, Tolle M. A Novel Long-Term ex vivo Model for Studying Vascular Calcification Pathogenesis: The Rat Isolated-Perfused Aorta. *J Vasc Res*. 2020;57(1):46-52.
68. Herrmann J, Babic M, Tolle M, Eckardt KU, van der Giet M, Schuchardt M. A Novel Protocol for Detection of Senescence and Calcification Markers by Fluorescence Microscopy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10).
69. Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, Rossi F, Berrino L, Naviglio S, Urbanek K. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1521020.
70. Wiedon A, Tölle M, Bastine J, Schuchardt M, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. Uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) is a strong inducer of smooth muscle cell migration via activation of the P2Y2 receptor and cross-communication to the PDGF receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417(3):1035-40.
71. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(4):509-19.
72. Han L, Zhang Y, Zhang M, Guo L, Wang J, Zeng F, Xu D, Yin Z, Xu Y, Wang D, Zhou H. Interleukin-1beta-Induced Senescence Promotes Osteoblastic Transition of Vascular Smooth Muscle Cells. *Kidney Blood Press Res*. 2020;45(2):314-30.
73. Song Y, Shen H, Schenten D, Shan P, Lee PJ, Goldstein DR. Aging enhances the basal production of IL-6 and CCL2 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(1):103-9.
74. Callegari A, Coons ML, Ricks JL, Rosenfeld ME, Scatena M. Increased calcification in osteoprotegerin-deficient smooth muscle cells: Dependence on receptor activator of NF-kappaB ligand and interleukin 6. *J Vasc Res*. 2014;51(2):118-31.
75. Wen C, Yang X, Yan Z, Zhao M, Yue X, Cheng X, Zheng Z, Guan K, Dou J, Xu T, Zhang Y, Song T, Wei C, Zhong H. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int J Cardiol*. 2013;168(3):2242-7.
76. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol*. 2018;9:586.
77. Wu X, Zhang H, Qi W, Zhang Y, Li J, Li Z, Lin Y, Bai X, Liu X, Chen X, Yang H, Xu C, Zhang Y, Yang B. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):171.
78. Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(1):28-33.

79. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* 2019;10(2):128.
80. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13).
81. Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, MacFadyen JG, Solomon DH, Zaharris E, Mam V, Hasan A, Rosenberg Y, Iturriaga E, Gupta M, Tsigoulis M, Verma S, Clearfield M, Libby P, Goldhaber SZ, Seagle R, Ofori C, Saklayen M, Butman S, Singh N, Le May M, Bertrand O, Johnston J, Paynter NP, Glynn RJ. Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *N Engl J Med.* 2019;380(8):752-62.
82. Tuttle CSL, Waaijer MEC, Slee-Valentijn MS, Stijnen T, Westendorp R, Maier AB. Cellular senescence and chronological age in various human tissues: A systematic review and meta-analysis. *Aging Cell.* 2020;19(2):e13083.
83. Heydarkhan-Hagvall S, Helenius G, Johansson BR, Li JY, Mattsson E, Risberg B. Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors. *J Cell Biochem.* 2003;89(6):1250-9.
84. Munzel T, Hahad O, Kuntic M, Keaney JF, Deanfield JE, Daiber A. Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes. *Eur Heart J.* 2020;41(41):4057-70.
85. Truskey GA. Endothelial Cell Vascular Smooth Muscle Cell Co-Culture Assay For High Throughput Screening Assays For Discovery of Anti-Angiogenesis Agents and Other Therapeutic Molecules. *Int J High Throughput Screen.* 2010;2010(1):171-81.
86. Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Effects of pulsatile shear stress on signaling mechanisms controlling nitric oxide production, endothelial nitric oxide synthase phosphorylation, and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Endothelium.* 2005;12(1-2):21-39.
87. Otto GM, Franklin CL, Clifford CB. Biology and Diseases of Rats. In: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT, editors. *Laboratory Animal Medicine.* Boston: Academic Press; 2015. p. 151-207.
88. Poole T. Happy animals make good science. *Lab Anim.* 1997;31(2):116-24.
89. Wang X, Wolf MP, Keel RB, Lehner R, Hunziker PR. Polydimethylsiloxane embedded mouse aorta ex vivo perfusion model: proof-of-concept study focusing on atherosclerosis. *J Biomed Opt.* 2012;17(7):076006.
90. Lysy T, Bracaglia LG, Qin L, Albert C, Pober JS, Tellides G, Saltzman WM, Tietjen GT. Ex vivo isolated human vessel perfusion system for the design and assessment of nanomedicines targeted to the endothelium. *Bioeng Transl Med.* 2020;5(2):e10154.
91. Greco A, Herrmann J, Babic M, Gummi MR, van der Giet M, Tölle M, Schuchardt M. Molecular Imaging and Quantification of Smooth Muscle Cell and Aortic Tissue Calcification In Vitro and Ex Vivo with a Fluorescent Hydroxyapatite-Specific Probe. *Biomedicines.* 2022;10(9).

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Milen, Babic versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die vaskuläre Kalzifizierung – eine Diversifizierung der experimentellen Methoden“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7. Anteilserklärung

Herr Milen Babic hat im Zeitraum von Oktober 2015 bis April 2021 an dem Charité Centrum 13 für Nephrologie und internistische Intensivmedizin, Campus Benjamin Franklin, seine Doktorarbeit angefertigt. Zu Beginn hat er im Rahmen eines Freisemesters (Wintersemester 2015/2016) tierexperimentelle, molekular- und zellbiologische, sowie proteinchemische Methoden erlernt und im Anschluss während seines weiteren Studiums im Rahmen verschiedener Projekte in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Arbeit von Herrn Babic ist Teil von 2 Reviewartikeln (1x Erstautor, 1x Co-Autor) und 3 Originalarbeiten (1x geteilter Erstautor, 2x Co-Autor), wobei der Beitrag von Herrn Babic an den einzelnen Arbeiten im Folgenden zu jeder Publikation angegeben ist:

Publikation 1:

Milen Babic, Mirjam Schuchardt, Markus Tölle, Markus van der Giet

In times of tobacco-free nicotine consumption: The influence of nicotine on vascular calcification *European Journal of clinical investigation* – Februar 2019

Eigenleistung:

Die Literatur zum Review Artikel wurde von Herrn Babic recherchiert, sortiert und auf ihre Relevanz analysiert. Einzelne Referenzen wurden durch die weiteren Autoren ergänzt. Die strukturelle Gliederung des Artikels entstand als gemeinsamer Entwicklungsprozess aller Autoren zu dem Herr Babic maßgeblich beigetragen hat. Alle Punkte wurden inhaltlich von Herrn Babic für ein „First Draft“ ausformuliert und in Zusammenarbeit mit allen Autoren angepasst. Die Tabellen und Abbildungen wurden maßgeblich von Herrn Babic erstellt und nach den in den Diskussionen der Autoren entstandenen Punkte umgearbeitet. Herr Babic hat die Überarbeitungen und das „Proof-Read“ nach Reviewprozess gemeinsam mit allen Autoren durchgeführt.

Publikation 2:

Jaqueline Herrmann, Milen Babic, Markus Tölle, Markus van der Giet, Mirjam Schuchardt

Research models for studying vascular calcification *International Journal of molecular sciences* – März 2020

Eigenleistung:

Die Literaturrecherche von Herrn Babic zum Reviewartikel ist Basis des Punktes „Ex vivo“ und Teil des Punktes „In vivo“. Die Abschnitte 3., 4.1 und 4.2. wurden maßgeblich durch Herrn Babic verfasst. Bei den anderen Teilen vom Abschnitt 4 hat er mitgewirkt. Herr Babic hat die Überarbeitungen und das „Proof-Read“ nach Reviewprozess gemeinsam mit allen Autoren durchgeführt.

Publikation 3:

Mirjam Schuchardt, Cornelia Henkel, Milen Babic, Markus Tölle, Markus van der Giet, Jaqueline Herrmann

Long-Term Treatment of Azathioprine in Rats Induces Vessel Mineralization

Biomedicines – März 2021

Eigenleistung:

Herr Babic hat die tierexperimentellen Arbeiten der *ex vivo* Stimulation von Aortenringen der NLRP3 knockout Mäuse und ihrer Kontrollen durchgeführt und ausgewertet, aus der die Abbildung 5 (Abb. 5 der Diss.) entstanden ist. Die Abbildung 2D (Abb. 4C der Diss.), 5D und Tabelle 2 beruhen auf Daten, die Herr Babic mittels proteinchemischer Methoden gewonnen hat. In die sehr aufwendigen histologischen Untersuchungen von verschiedenen Aortenabschnitten und der Nieren war Herr Babic eingebunden. Ein Teil der Bilder sind Grundlage für Abbildung 1B. Die Punkte 2.1, 2.2., 2.3., 2.5. im Material-/Methodenteil der Publikation wurden von Herrn Babic verfasst und überarbeitet. Herr Babic hat die Überarbeitungen und das „Proof-Read“ nach Reviewprozess gemeinsam mit allen Autoren durchgeführt.

Publikation 4:

Mirjam Schuchardt, Nathalie Vanessa Siegel, Milen Babic, Alexander Reshetnik, Ronald Lützenberg, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle

A novel long-term ex vivo Model for studying vascular calcification pathogenesis

Journal of vascular research – November 2019

Eigenleistung:

Nachdem das erste Konzept des Modells in der Arbeitsgruppe entwickelt wurde, war Herr Babic an der Weiterentwicklung und Optimierung der Methode beteiligt und verantwortete dabei einen Großteil der tierexperimentellen Arbeit. Herr Babic arbeitete einen Teil der

Proben außerdem mittels Calcium C Test, den beschriebenen histologischen Methoden und Mikroskopie auf und wertete die Ergebnisse aus. Diese Daten sind Teil der Abbildungen 2 (Abb. 6A der Diss.) und 4 der Publikation. Die Unterpunkte im Material-/Methodenteil „Materials“, „Animals“ und „Experimental Settings“ der Publikation hat Herr Babic verfasst und überarbeitet. Herr Babic hat die Überarbeitungen und das „Proof-Read“ nach Reviewprozess gemeinsam mit allen Autoren durchgeführt.

Publikation 5:

Jaqueline Herrmann* und Milen Babic*, Markus Tölle, Kai-Uwe Eckardt, Markus van der Giet, Mirjam Schuchardt

A novel protocol for detection of senescence and calcification markers by Fluorescence Microscopy *International Journal of molecular sciences* – Mai 2020

*geteilte Erstautorenschaft

Eigenleistung:

An der Konzeption des Technical Note und der Literaturrecherche war Herr Babic maßgeblich beteiligt. Das Ziel war es, mit einem möglichst geringen Zellverbrauch im Sinne von 3R an primären glatten Gefäßmuskelzellen, die nur ein wenig Passagen für die Experimente eingesetzt werden können, möglichst viele Parameter immunhistochemisch in den Zellen nachweisen zu können. Hierfür waren eine Reihe von Etablierungs- und Optimierungsarbeiten notwendig, in die Herr Babic maßgeblich eingebunden war. Die Methode der *in situ* RNA Hybridisierung wurde auf Basis dieser Etablierungs- und Optimierungsschritte neu in der Arbeitsgruppe etabliert. Hier haben die Erstautoren zunächst verschiedene Marker getestet, von denen nur ein Teil in die Publikation eingeflossen ist. Die Parameter der verschiedenen Protokollschritte wurden an das Ziel des „Multiplex“ pro Probe angepasst. Die experimentellen Arbeiten setzen sich aus der Zellstimulation, Mikroskopie und quantitativer Auswertung der mikroskopischen Bilder zusammen. Für die quantitative Auswertung wurden verschiedene Auswertungsstrategien getestet. Beide Erstautoren haben hier maßgeblich an der publizierten Protokolletablierung für das Technical Note beigetragen, was sich in ihrer geteilten Autorenposition widerspiegelt.

Die tierexperimentellen Arbeiten zur Isolation primärer glatter Gefäßmuskelzellen für sämtliche Versuche wurden von Herrn Babic durchgeführt. Des Weiteren führte er die Versuche für die Abbildungen 1 (Abb. 7A der Diss.) und 2 durch.

An der Erstellung, Überarbeitung des gesamten Manuskriptes und des Supplements war Herr Babic zentral eingebunden. Insbesondere der erste Teil der „Introduction“ sowie die Abschnitte 2.1, 3.1 und 3.2 wurden im „First Draft“ von Herrn Babic verfasst. Herr Babic hat die Überarbeitungen und das „Proof-Read“ nach Reviewprozess gemeinsam mit allen Autoren durchgeführt.

Unterschrift des Doktoranden

8. Ausgewählte Publikationen

Publikation 1:

DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13077>

Publikation 2:

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21062204>

Publikation 3:

DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030327>

Publikation 4:

DOI: <https://doi.org/10.1159/000503785>

Publikation 5:

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21103475>

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Vollständige Publikationsliste

2023

Journalbeiträge

Zhou, J., Gummi, M.R., Greco, A., Babic, M., Herrmann, J., Kandil, F.I., van der Giet, M., Toelle, M., Schuchardt, M.: **Biomechanical properties of the aortic wall: Changes during vascular calcification**

Biomedicines 2023; 14;11(1):211 Impact factor: 5,612

Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36672718/>

DOI: 10.3390/biomedicines11010211

2022

Journalbeiträge

Greco, A., Herrmann, J., Babic, M., Gummi, M.R., van der Giet, M., Toelle, M., Schuchardt, M.: **Molecular Imaging and Quantification of Smooth Muscle Cell and Aortic Tissue Calcification In Vitro and Ex Vivo with a Fluorescent Hydroxyapatite-Specific Probe**

Biomedicines 2022; 10(9), 2271 Impact factor: 5,612

Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36140372/>

DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092271>

Toelle, M., Henkel, C., Herrmann, J., Daniel, C., Babic, M., Xia, M., Schulz, A.M., Amann, K., van der Giet, M., Schuchardt, M.: **Uremic mouse model to study vascular calcification and “inflamm-ageing”**

Journal of molecular medicine 100, pages 1321–1330 (2022), Impact factor: 5,606

Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35916902/>

DOI: 10.1007/s00109-022-02234-y

Babic, M., van der Giet, M.: **PET-CT Diagnostik in der Nephrologie für nicht-onkologische Indikationen**

Dialyse aktuell_2022;2022; 26(02): 81-84.

DOI: 10.1055/a-1719-6344

Babic, M., van der Giet, M.: **Tipps und Tricks für die leitliniengerechte Bluthochdrucktherapie**

MMW Fortschritte der Medizin 2022 Nov;164(20):50-53

DOI: 10.1007/s15006-022-2054-x.

Babic, M., van der Giet, M.: **Die Hochdrucksprechstunde – Blutdruckentgleisung nach bariatrischer Operation**

CardioVasc. 2022/06;1618-3851

URL: <https://www.springermedizin.de/hydrochlorothiazid/amlodipin/blutdruckentgleisung-nach-bariatrischer-operation/23830704>

DOI: <https://doi.org/10.1007/s15027-022-2935-z>

Babic, M., van der Giet, M.: **Arzneimittelinteraktion bei anti-Hypertensiva**

CardioVasc. 2022/01;1618-3851

URL: <https://www.springermedizin.de/de/arterielle-hypertonie/akutes-nierenversagen/arzneimittelinteraktionen-bei-antihypertensiva/20157234>

DOI: <https://doi.org/10.1007/s15027-021-3623-0>

Kongressbeiträge

Babic, M., M., Tölle, M., Schuchardt, M., Eckardt, K.U., van der Giet, M. **Der Nutzen von PET-CT und immunmodulatorischer Therapie bei steroidrefraktärer IgG4-assoziiierter Nephritis und retroperitonealer Fibrose**
Deutsche Gesellschaft für Nephrologie e.V. (DGfN), Kongress.2022. Posterbeitrag.
07.10.2022.

2021

Journalbeiträge

Schuchardt, M., Henkel, C., Babic, M., Toelle, M., van der Giet, M. Herrmann, J.:
Long-term treatment of azathioprine in rats induces vessel mineralization
Biomedicines. **2021**;9(3), 327 Impact factor: 6,081

Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33806932/>

DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030327>

Babic, M., van der Giet, M.: **Hyperurikämie und Bluthochdruck.**

CardioVasc. 2021;2021; 21:39-40.

URL: <https://www.springermedizin.de/arterielle-hypertonie/hyperurikaemie-und-bluthochdruck/18858766>

DOI: <https://doi.org/10.1007/s15027-020-3450-8>

Babic, M., van der Giet, M.: **Blutdrucksenkende pleiotrope Effekte
antidiabetischer Medikamente**

Dialyse aktuell. 2021;2021; 25(09): 356-362.

DOI: [10.1055/a-1557-3924](https://doi.org/10.1055/a-1557-3924)

2020

Journalbeiträge

Schuchardt, M., Siegel, N.V., Babic, M., Reshetnik, A., Lützenberg, R., Zidek, W., van der Giet, M., Tölle, M.: **A Novel Long-Term ex vivo Model for Studying Vascular Calcification Pathogenesis: The Rat Isolated-Perfused Aorta.**

J Vasc Res. 2020;57(1):46-52. Impact factor: 1,725

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31722349?dopt=Citation>

DOI: [10.1159/000503785](https://doi.org/10.1159/000503785)

Babic, M., Herrmann, J., Tölle, M., Eckardt, K.U., van der Giet, M., Schuchardt, M.: **A Novel Protocol for Detection of Senescence and Calcification Markers by Fluorescence Microscopy.**

Int J Mol Sci. 2020;21(10). Impact factor: 5,923

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32423114?dopt=Citation>

DOI: [10.3390/ijms21103475](https://doi.org/10.3390/ijms21103475)

PMC: [PMC7278918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32423114/)

Herrmann, J., Babic, M., Tölle, M., van der Giet, M., Schuchardt, M.: **Research Models for Studying Vascular Calcification.**

Int J Mol Sci. 2020;21(6). Impact factor: 5,923

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32210002?dopt=Citation>

DOI: [10.3390/ijms21062204](https://doi.org/10.3390/ijms21062204)

PMC: [PMC7139511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7139511/)

Babic, M.: Suche nach betroffenen Hochdruckpatienten: Die maskierte Hypertonie - eine diagnostische Herausforderung.

CardioVasc. 2020;20:31-3.

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s15027-019-0012-z>

DOI: [10.1007/s15027-019-0012-z](https://doi.org/10.1007/s15027-019-0012-z)

Kongressbeiträge

Babic, M., Lindquist, R., M., Tölle, M., Schuchardt, M., Eckardt, K.U., Furth, C., van der Giet, M. Ein neues Regime zur Diagnostik und Therapie der chron. Periaortitis - eine Fallserie

Deutsche Gesellschaft für Nephrologie e.V. (DGfN), Kogress.2020. Posterbeitrag. 03.10.2020.

2019

Journalbeiträge

Babic, M., van der Giet, M.: Die künstliche Niere - Eine Bestandsaufnahme.

Dialyse aktuell. 2019;23(06):258-63.

URL: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/a-0902-6623>

DOI: [10.1055/a-0902-6623](https://doi.org/10.1055/a-0902-6623)

Babic, M., Schuchardt, M., Tölle, M., van der Giet, M.: In times of tobacco-free nicotine consumption: The influence of nicotine on vascular calcification.

Eur J Clin Invest. 2019;49(4):e13077. Impact factor: 3,481 (2019)

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30721530?dopt=Citation>

DOI: [10.1111/eci.13077](https://doi.org/10.1111/eci.13077)

Kongressbeiträge

Babic, M., Siegel, N., Toelle, M., Reshetnik, A., Toelle-Schuchardt, M., van der Giet, M.: **Ein neues Modell zur Untersuchung vaskulärer Veränderungen - die isoliert perfundierte Rattenaorta (IPA).**

Deutsche Gesellschaft für Nephrologie e.V. (DGfN), Kongress.2019.

Posterbeitrag. 12.10.2019.

Babic, M., Ye, X., M., Tölle, M., Schuchardt, M., Eckardt, K.U., van der Giet, M., **In Zeiten tabakfreien Nikotinkonsums: Der Einfluss von Nikotin auf die vaskuläre Kalzifizierung der Media**

Deutsche Hochdruckliga e.V. (DHL), Kongress.2019. Posterbeitrag. 21.11.2019.

2016

Kongressbeiträge

Toelle-Schuchardt, M., Siegel, N., Babic, M., Toelle, M., Zidek, W., van der Giet, M.: **Novel experimental model to study vascular calcification ex vivo: the isolated-perfused aorta.**

European Society of Hypertension (ESH), Kongress.2016. Posterbeitrag.

11.06.2016.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Prof. h.c. Dr. med. Markus van der Giet für das entgegengebrachte Vertrauen, die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens in der *Renal and vascular research group* und die stete Unterstützung auf meinem Weg zum Wissenschaftler und Arzt bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Mirjam Schuchardt und Herrn PD Dr. med. Markus Tölle für ihre exzellente Betreuung dieser Arbeit. Eure unerschöpfliche Motivation, methodische Anleitung, die kritischen Diskussionen und eure außergewöhnliche Hilfsbereitschaft haben nicht nur diese Promotionsarbeit ermöglicht, sondern auch Maßstäbe für meine persönliche Entwicklung gesetzt.

Jaqueline Herrmann möchte ich herzlich für die freundschaftliche, kollegiale Zusammenarbeit und Unterstützung danken.

Der gesamten *Renal and vascular research group* gebührt mein Dank für die produktive und freundschaftliche Arbeitsumgebung. Insbesondere Frau Katharina Kuschfeldt und Frau Brigitte Egbers möchte ich für die methodische Einarbeitung danken.

Meinen lieben Eltern und meinem Bruder danke ich für ihre Liebe und immerwährende Unterstützung. Allen meinen Freunden und Katharina gilt mein Dank für ihr Verständnis und die Liebe, die sie mir entgegenbringen.