

**Abschlussbericht zum Projekt „Testung potentiell antifibrotischer Medikamente in der Prävention fibrotischer Veränderungen der Aortenklappe der ApoE Knockout-Maus“**

Kurzbezeichnung „Antifibrotische Medikamente zur Prävention der Aortenklappenstenose.“

Gefördert durch die Roland Ernst Stiftung unter dem AZ: 04/14.

Projektverantwortliche: Prof. Dr. med. habil. Sems Malte Tugtekin, Dr. rer. medic. Anett Jannasch, Univ.-  
Prof. Dr. med. Klaus Matschke

Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Universitätsklinik Dresden, Medizinische Fakultät der TU Dresden

**Kurzfassung des Projektberichtes**

**Forschungsziel**

Im Projekt sollen Medikamente, die bereits zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen in anderen Organen zugelassen sind oder potentiell antifibrotische Eigenschaften besitzen, an Aortenklappen von pro-fibrotisch gefütterten APOE Knockout-Mäusen untersucht werden. Langfristiges Ziel ist der Einsatz dieser Medikamente am Patienten zur Prävention und Abschwächung der Progression einer fibrotischen Veränderung der Herzklappe.

**Ergebnisse des Projekts:**

Im geförderten Projekt wurden 3 Substanzen hinsichtlich antifibrotischer Eigenschaften in einem Mausmodell charakterisiert. Final stellen sich Effekte von Resveratrol und Losartan als effektstärkste Wirkstoffe dar. Die Ergebnisse werden für eine Publikation in „Fibrogenesis and Tissue Repair“ (IF 5,7) sowie „PLoS One“ (IF 3,5) eingereicht.

Während der Laufzeit des Projektes wurde eine Kooperation mit der AG Klinisches Sensing und Monitoring, dem Institut für Physiologie sowie mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der TU Dresden aufgebaut. Diese Kooperationen führten zur Einwerbung einer Doktorandenförderung im Rahmen des Else Kröner-Promotionskollegs zum Thema „Etablierung von kontaktlosen Messverfahren zur Charakterisierung der Aortenklappen in einem Mausmodell der Aortenklappenfibrose“. Im Rahmen der Kooperation mit der AG Klinisches Sensing und Monitoring wurde eine Publikation beim Journal „Biomedical Optics Express“ (IF 4,1) unter dem Titel „Ex vivo 4D visualization of aortic valve dynamics in a murine model with optical coherence tomography“ veröffentlicht (Biomed Opt Express. 2014 Nov 7;5(12):4201-12. doi: 10.1364).

## Langfassung des Projektberichtes

### Tierexperimentelle Vorarbeiten zu Fütterung und Organentnahme

In der beantragten Studie wurden in Tierversuchen Mäuse eingesetzt. Die Verwendung der benötigten Tiere wurde durch einen Tierversuchsantrag beim Regierungspräsidium Dresden beantragt und genehmigt.

Im durchgeführten Forschungsprojekt wurden Losartan, Resveratrol und Silibinin im Mausmodell hinsichtlich Ihrer Applikation, Verträglichkeit, Plasmaverfügbarkeit sowie Stabilität im verwendeten Spezialfutter getestet. Alle Substanzen wurden gut von den Versuchstieren toleriert.

### Analytische Endpunkte im Verlauf des tierexperimentellen Projektteils

Im verwendeten Modell der APOE Knockout Maus wurde die Ausbildung einer Aortenklappenfibrose durch eine Western Diet induziert. Alle Versuchsgruppen mit Ausnahme der Wildtyp Gruppe welche als Negativkontrolle diente, erhielten diese Fett- und Cholesterinreiche Diät. Im Versuchsansatz Prävention wurden 16 Wochen lang die Testsubstanzen gemeinsam mit dieser Spezialdiät verabreicht. Im Versuchsansatz Progressionsstopp wurden zunächst 16 Wochen lang nur Fettfutter gefüttert, und im Anschluss 16 Wochen lang die Testsubstanzen zusätzlich in diesem Fettfutter appliziert.

Wie zu erwarten, konnte in beiden Versuchsansätzen eine deutliche Gewichtszunahme bei allen Versuchsgruppen insbesondere bei den APOE Knockout Tieren welche Fettfutter (mit und ohne Zusatz von Substanzen) über den gesamten Zeitraum der Fütterung verzeichnet werden (Abbildung 1 und 2).

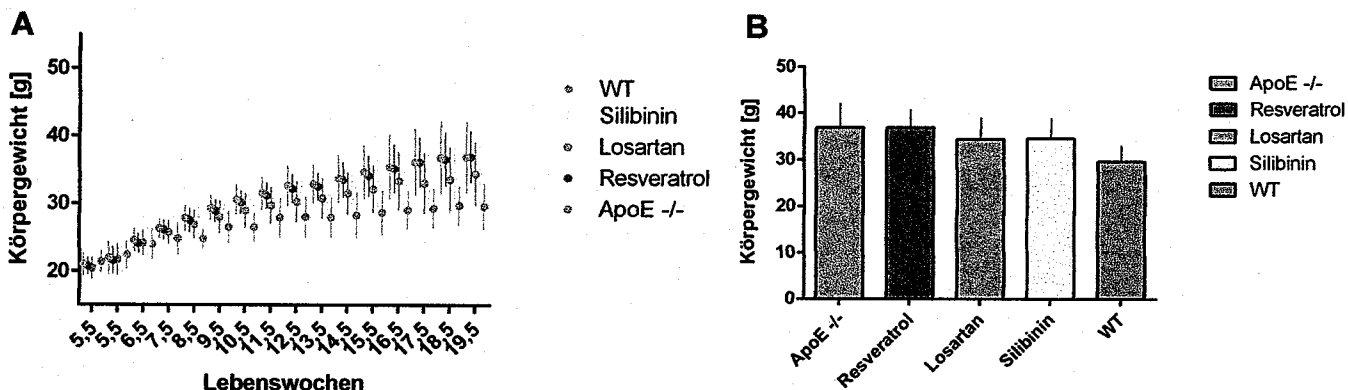


Abbildung 1: Körpergewichte der Versuchsgruppen innerhalb des Versuchsteils Prävention, A: Gewichtsentwicklung über den gesamten Fütterungszeitraum, B: Körpergewichte der einzelnen Versuchsgruppen zum Ende der Fütterung, dargestellt sind Mittelwerte und SD.

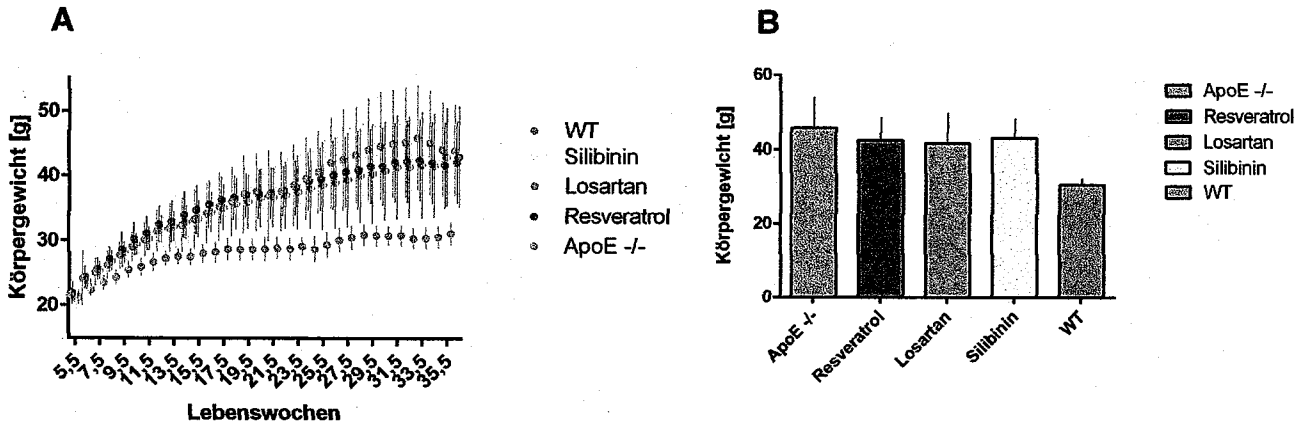


Abbildung 2 Körpergewichte der Versuchsgruppen innerhalb des Versuchsteils Progressionsstopp, A: Gewichtsentwicklung über den gesamten Fütterungszeitraum, B: Körpergewichte der einzelnen Versuchsgruppen zum Ende der Fütterung, dargestellt sind Mittelwerte und SD.

Durch die Kooperation mit dem Institut für Physiologie war es möglich eine weitere experimentelle Substanz mit in die Experimente einzuschließen. Das durch die Arbeitsgruppe um Dr. Martin patentierte Dipeptid IW ist ein ACE Hemmer aus hydrolysierten Milchproteinen welches äusserst potente Wirkungen auf das Gefäßsystem und das Renin- Angiotensionsystem hat. Unter anderem wird von uns auch eine Wirkung auf die Pathogenese der Aortenklappenfibrose postuliert. Mit Unterstützung der Arbeitsgruppe konnte somit eine weitere Versuchsgruppe parallel durchgeführt werden. Da mit Losartan auch ein AT1- Rezeptor Antagonist eingesetzt wurde, überprüften wir den Blutdruck der Tiere während der Fütterung. Mit Hilfe der sogenannten tail cuff Methode wurde der mittlere arterielle Blutdruck der Tiere zu Beginn, in der Mitte und zum Ende der jeweiligen Fütterungsperiode gemessen. Die verwendete Dosis an Losartan lag unter der in der Literatur Blutdrucksenkenden Dosis. Hintergrund dieser gewählten niedrigen Dosis war, antifibrotische Effekte von Losartan ohne systemische Veränderungen der Strömungsverhältnisse an den Aortenklappen zu untersuchen. In Abbildung 3 sind exemplarisch die Blutdruckwerte im Versuchsteil Prävention dargestellt. Es gab keine Einwirkungen der verwendeten Substanzen auf den systemischen Blutdruck der Versuchsgruppen.

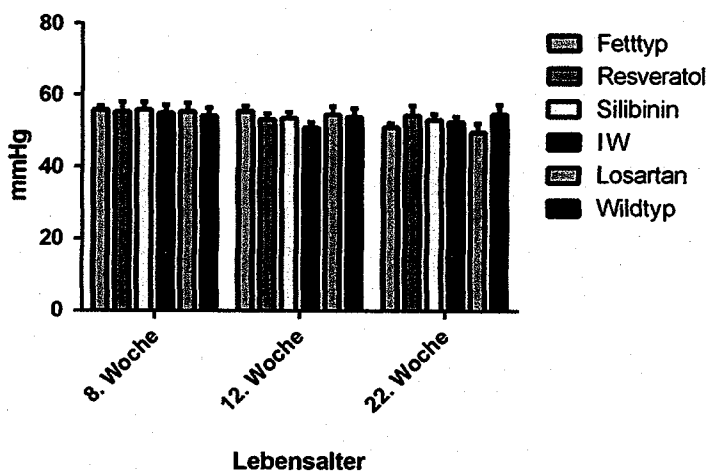


Abbildung 3: Entwicklung des systolischen Blutdrucks aller Versuchsgruppen im Versuchsteil Prävention. Dargestellt sind Mittelwerte und SD.

Des Weiteren wurde der Cholesterol- und Triglycerid Gehalt im Plasma der Versuchstiere während der Fütterung gemessen. Wie in Abbildung 4 dargestellt sind die Werte der mit Fettdiät gefütterten Tiere im Vergleich zu der Wildtyp Gruppe signifikant erhöht. Unterschiede durch die Substanzapplikation konnten nicht nachgewiesen werden.

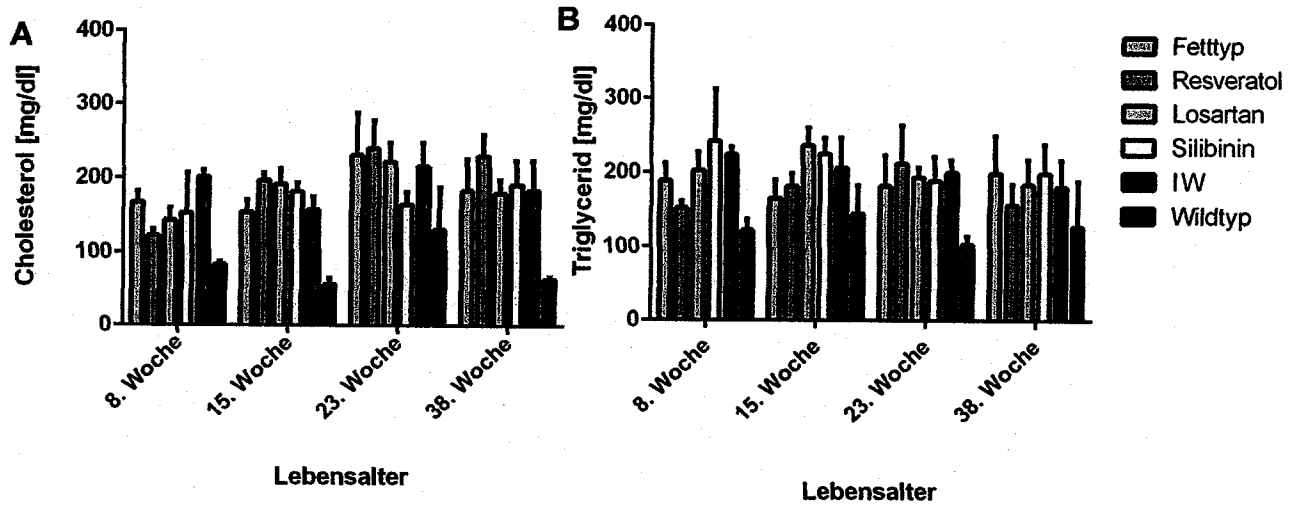


Abbildung 4: Blutfettwerte im Versuchsteil Progressionsstopp, A: Plasmacholesterol B: Plasmatriglycerid , dargestellt sind Mittelwerte und SD

Während des Projektes konnte eine weitere Kooperation zum Institut für Pharmakologie und Toxikologie aufgebaut werden, wodurch es möglich war ein hochauflösendes Kleintierechokardiographie Gerät zu nutzen. Somit war es möglich systolische Herzfunktionen der Versuchstiere über die Fütterungsperiode zu messen sowie die Öffnungsdistanzen der Aortenklappen in entsprechend hochauflösenden B-Mode Aufnahmen in der Längsachse (Abbildung 5) aufgenommen zu bestimmen.

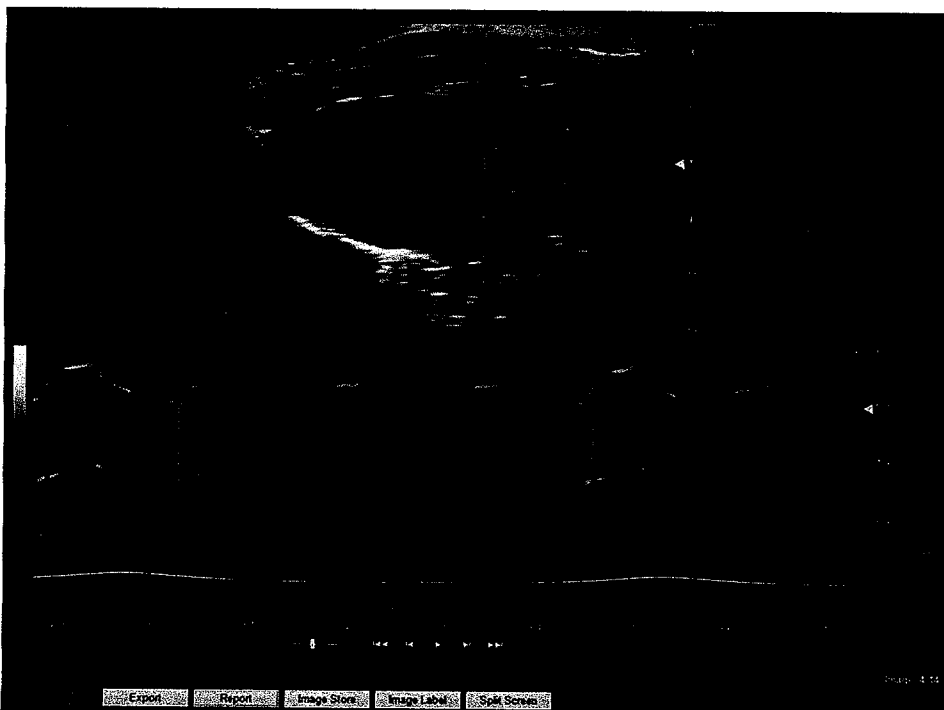


Abbildung 5: exemplarische B-Mode Aufnahme (oben) in welcher in Aortenklappenebene eine M-Mode Analyse (unten) durchgeführt werden kann, worin die Bewegung der Aortensegel bzw. Aortenklappenöffnungsdistanzen während der Herzaktion abgebildet und ausgemessen werden können

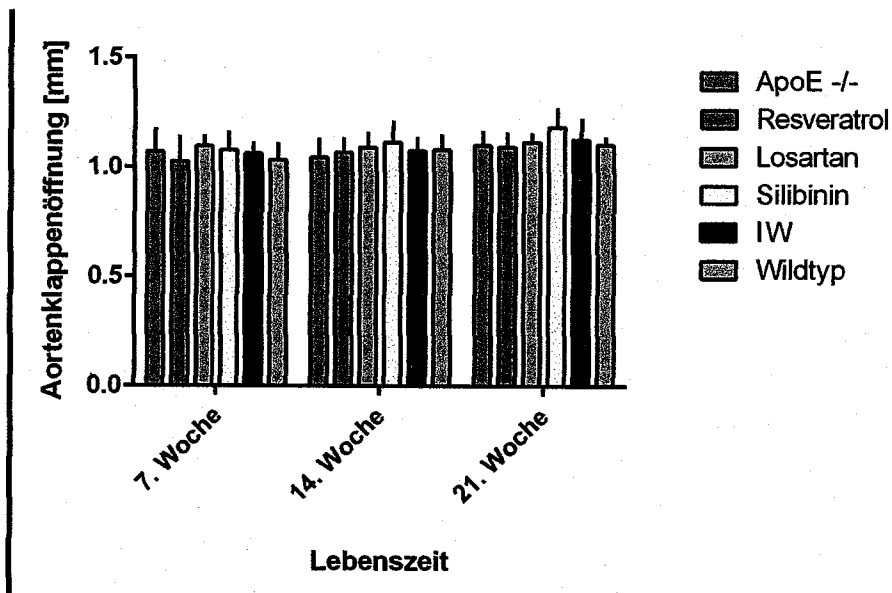


Abbildung 6: aus B-Mode Aufnahmen ermittelte Aortenklappenöffnung innerhalb des Versuchsteils Prävention, dargestellt sind Mittelwerte und SD

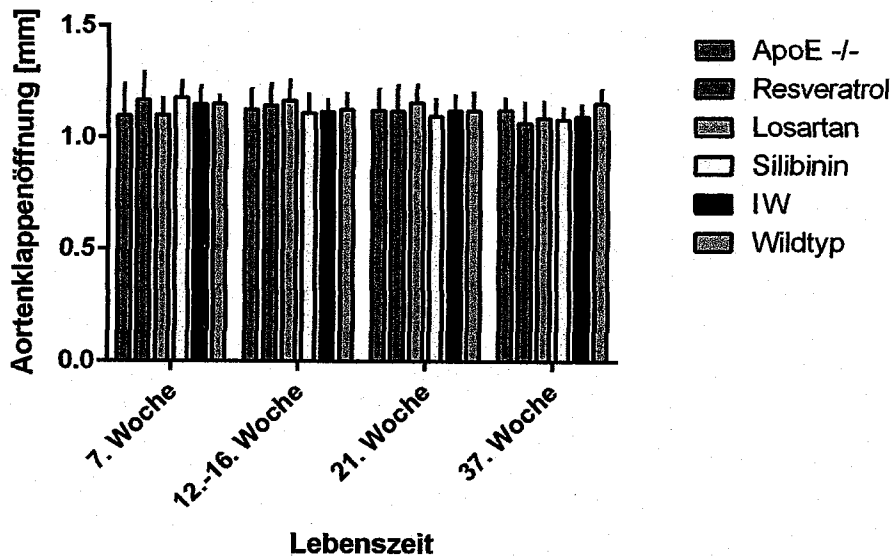


Abbildung 7: aus B-Mode Aufnahmen ermittelte Aortenklappenöffnung innerhalb des Versuchsteils Progressionsstopp, dargestellt sind Mittelwerte und SD

Systolische Parameter wie Ejektionsfraktion oder Cardiac output waren nicht unterschiedlich in den Versuchsgruppen. Die Losartan behandelten Tiere zeigten zum Teil eine signifikant höhere Öffnungsrate im Vergleich zur APOE Kontrollgruppe, was auf eine verbesserte Aortenklappenfunktion schließen lässt (Abbildung 7 und 8).

## Analytische Endpunkte zum Ende der Fütterungsperioden

Fibrotische Veränderungen der Aortenklappen gehen mit einer makroskopisch nachweisbaren Verdickung der Aortensegelgewebe einher. Im Zuge der in diesem Projekt aufgebauten Kooperation mit der AG Klinisches Sensing und Monitoring, konnte diese exakt mittels optischer Kohärenztomografie ermittelt werden. In Abbildung 8 sind die Abmessungen der einzelnen Aortensegelstrukturen (acc akoronare Tasche, lcc linkskoronare Tasche und rcc rechtskoronare Tasche) abgebildet.

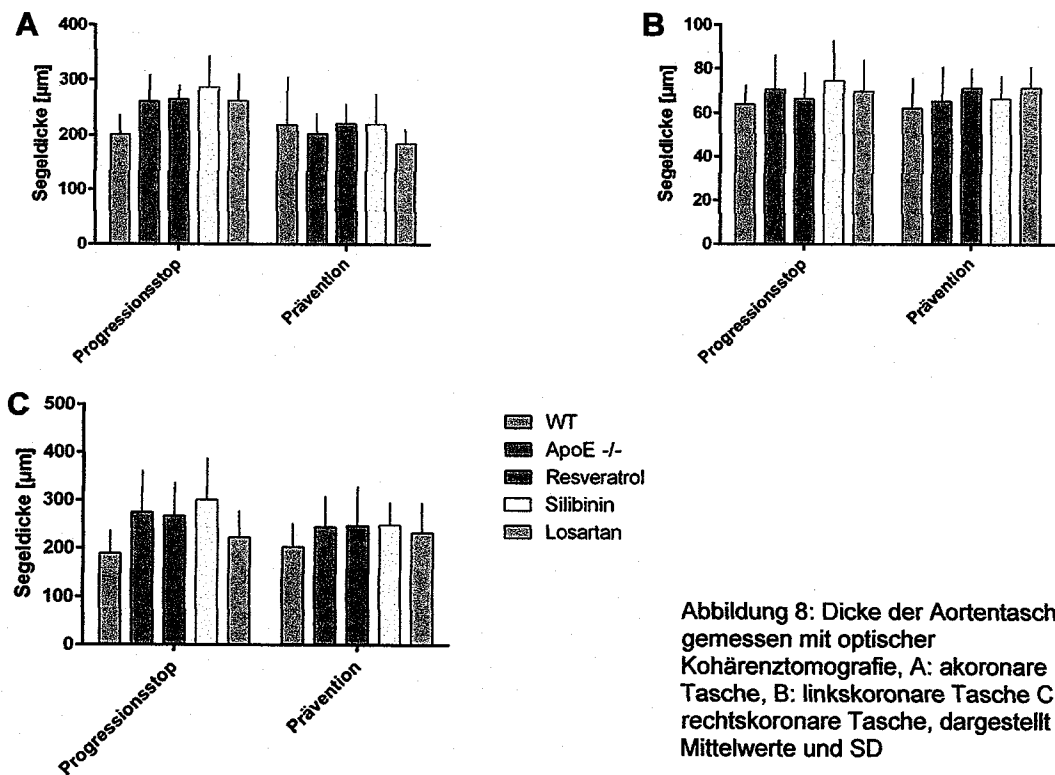


Abbildung 8: Dicke der Aortentaschen gemessen mit optischer Kohärenztomografie, A: akoronare Tasche, B: linkskoronare Tasche, C: rechtskoronare Tasche, dargestellt sind Mittelwerte und SD

Losartan zeigte eine im Versuchsteil Prävention eine signifikant niedrigere akoronare Taschendicke als die positiv Kontrolle der Tiere mit reiner Fettdiät. Ebenso konnte in der Resveratrolgruppe im Versuchsteil Progressionsstopp eine signifikant kleinere links- und rechtskoronare Taschendicke ermittelt werden.

Diese Daten konnten ebenso durch histologische Untersuchungen der Aortenklappen der Versuchstiere belegt werden. In Abbildung 9 sind exemplarisch die Paraffinschnitte von Aortenklappen aus dem Versuchsteil Progressionsstopp zu sehen. Im Vergleich zu der Fettyp Gruppe sind die Taschen in der Losartan und Reseveratrol Gruppe weniger dick.



Abbildung 9: Pentachrom Färbung von Aortenklappen im Versuchsteil Progressionsstopp; A: Wildtyp, B: Fettyp, C: Losartan, D: Resveratrol, E: Silibinin

### **Abschließende Analyse und Ausblick, Publikation, Abschlussbericht**

Die Daten wurden während der Projektlaufzeit kontinuierlich in Zwischenevaluierungen ausgewertet. So war es möglich, erste Ergebnisse bereits während der Projektlaufzeit dem Fachpublikum vorzustellen.

Dr. Jannasch präsentierte einen Vortrag im Rahmen der Fachtagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Leipzig sowie bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation und Hämorheologie in Villingen-Schwenningen. PD Dr. Waldow präsentierte die Ergebnisse im Rahmen des 6. Biennalen Kongresses der „Society for Heart Valve Disease“, Heart Valve Biology & Tissue Engineering Meeting“ in London in einem Poster und wurde mit einem Posterpreis ausgezeichnet. Prof. Tugtekin konnte das Projekt dieses Jahr ebenfalls auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Leipzig in einem Vortrag präsentieren.

Momentan sind noch experimentelle Arbeiten notwendig, um die Analyse der Fibrose Marker aus Aortentaschengewebe abzuschließen.

Parallel hierzu wurden bereits Arbeiten an zwei Manuskripten zur Publikation der Daten in internationalen Fachjournalen begonnen. Eine Einreichung des Manuskriptes zur Beurteilung durch externe Begutachter ist noch in diesem Jahr geplant.