

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie

**Überprüfung eines experimentellen Modells zur Induktion einer  
Aortenklappenstenose in der Maus**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Mohamad Amer Nashtar  
aus Hama (Syrien)

2024

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/82665

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20241211-103502-1

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. K.M. Steinmetz

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. F. Steinhagen

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2024

## **Veröffentlichungen**

Teile dieser Dissertation wurden im August 2022 in „A critical review of wire injury induced aortic valve stenosis in mice” im Journal of Molecular and Cellular Cardiology publiziert.

Radecke, T., **Nashtar, M.A.**, Korste, S., Hendgen-Cotta, U.B., Rassaf, T., Rammos, C., Gunzer, M., and Steinmetz, M. (2022). A critical review of wire injury induced aortic valve stenosis in mice. *J Mol Cell Cardiol* 169, 71-73.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	7
1.1 Aortenklappenstenose .....	7
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	7
1.1.2 Pathophysiologie .....	9
1.1.3 Klinischer Verlauf und Prognose .....	13
1.1.4 Diagnostik und Therapie .....	14
1.1.5 Aortenklappenstenose im Mausmodell .....	16
<b>2 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN</b> .....	19
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	20
3.1 Operative Schädigung der Aortenklappe im Mausmodell.....	20
3.1.1 Versuchstiere .....	20
3.1.2 Versuchsaufbau .....	20
3.1.3 Materialien .....	23
3.1.4 Lösungsherstellung.....	24
3.1.5 Operation .....	24
3.1.6 Organentnahme .....	26
3.2 Echokardiografie.....	28
3.3 Lichtblattnmikroskopie .....	30
3.4 Histologie.....	35
3.4.1 Masson-Trichrom-Färbung .....	36

3.4.2	Immunhistochemie .....	39
3.5	Durchflusszytometrie .....	42
3.6	Zytokinanalyse .....	45
3.7	Statistische und graphische Auswertung .....	47
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>49</b>
4.1	Veränderungen in der Frühphase nach Schädigung der Aortenklappe.....	49
4.1.1	Akute echokardiografische Veränderungen des Herzens.....	49
4.1.2	Akute zelluläre und humorale Immunantwort .....	50
4.2	Veränderungen in der Spätphase nach Schädigung der Aortenklappe .....	55
4.2.1	Echokardiographische und histologische Veränderungen der Aortenklappe 4 Monate nach Sham-OP oder Drahtschädigung im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren .....	55
4.2.2	Chronische echokardiografische Veränderungen des Herzens bei Mäusen mit (AVS) und ohne (no AVS) schädigungsinduzierte Aortenklappenstenose sowie unbehandelten Kontrollmäusen (Kontrolle) .....	56
4.2.3	Veränderungen der Gewebestruktur der Aortenklappe.....	59
4.2.4	Chronische zelluläre und humorale Immunantwort .....	64
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>69</b>
5.1	Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Gesamtkontext.....	69
5.1.1	Gewebeveränderungen durch die Drahtschädigung.....	70
5.1.2	Steigerung der inflammatorischen Aktivität durch das Gewebetrauma....	71
5.2	Limitationen des Modells und Kritikpunkte .....	72
5.3	Ausblick .....	74

<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>75</b>
<b>7 SUMMARY.....</b>	<b>76</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>77</b>
<b>9 ANHANG .....</b>	<b>87</b>
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	87
9.2 Tabellenverzeichnis .....	88
9.3 Abkürzungsverzeichnis.....	88
<b>10 DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>89</b>
<b>11 LEBENSLAUF .....</b>	<b>90</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Aortenklappenstenose**

Die Aortenklappenstenose (aortic valve stenosis; AVS) ist die häufigste Herzklappenerkrankung in der westlichen Welt (Nkomo et al., 2006; Osnabrugge et al., 2013). Trotz der rasanten Entwicklung der operativen und auch interventionellen Behandlungsmöglichkeiten in den letzten Jahren, geht die symptomatische AVS nach wie vor mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Die kalzifizierte AVS ist gekennzeichnet durch eine fortschreitende fibrokalzifizierende Umgestaltung und Verdickung der Aortenklappentaschen. Die zugrunde liegende Pathophysiologie ist bislang immer noch unvollständig verstanden, umfasst aber - ähnlich zur vaskulären Atherosklerose - endotheliale Dysfunktion, Immunzellinfiltration sowie myofibroblastische und osteoblastische Differenzierung der Zellen mit daraus resultierender Versteifung und Verkalkung (Goody et al., 2020).

Durch eine relevante mittel- bis hochgradige AVS entsteht eine erhöhte Belastung der linken Herzkammer mit eingangs Hypertrophie, im Verlauf aber Dekompensation, Funktionsverlust und zunehmender Herzinsuffizienz. Die Prognose der symptomatischen AVS ist aufgrund des tödlichen Verlaufs für beinahe die Hälfte der Patienten innerhalb von 2-3 Jahren ab Entstehung ernster klinischer Beschwerden sehr schlecht (Vahanian et al., 2022). Bis heute gibt es keine konservativen therapeutischen Optionen, die die zunehmende Verkalkung der Aortenklappe verhindern oder gar zurückbilden können. Die symptomatische Aortenklappenstenose kann nur operativ durch einen kardiochirurgischen Aortenklappenersatz oder interventionell mittels perkutanem Aortenklappenersatz, dem sog. Transkatheter-Aortenklappenersatz (transcatheter aortic valve replacement/implantation, TAVR bzw. TAVI), therapiert werden (Vahanian et al., 2022).

### **1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie**

Zurzeit stellt die AVS in Europa und Nordamerika den häufigsten behandlungsbedürftigen Klappenfehler (61 % aller valvulär bedingten Todesfälle) und die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung nach koronarer Herzkrankheit und Hypertonie dar (Aluru et al., 2022; Rana, 2022). Jenseits des 70. Lebensjahres nimmt die Prävalenz der senilen AVS deutlich zu, sodass in dieser Altersklasse 3-5 % der

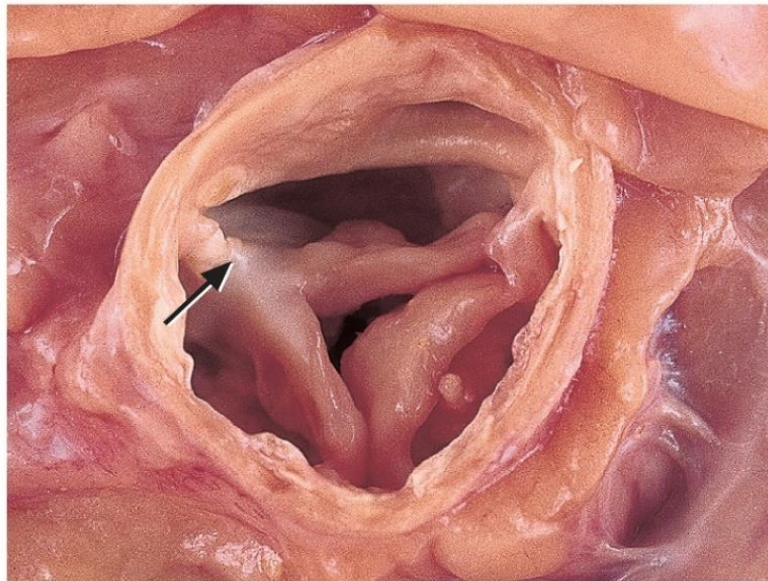
Bevölkerung davon betroffen sind (Aluru et al., 2022; Iung and Vahanian, 2014; Osnabrugge et al., 2013; Yadgir et al., 2020) . Es haben 9,8 % der über 80-Jährigen eine AVS (Aluru et al., 2022; Eweborn et al., 2013). Es wird erwartet, dass sich die Zahl der Personen mit einer behandlungsbedürftigen AVS bis 2050 sogar verdoppeln wird (Osnabrugge et al., 2013). Unter 60 Jahren tritt dieser Herzklappenfehler eher selten auf; in diesem Fall handelt es sich meistens um eine kongenitale bikuspidale Aortenklappenstenose, die deutlich früher zu klinischen Beschwerden führt. Dabei handelt es sich um eine angeborene, wahrscheinlich genetisch bedingte Anomalie der Aortenklappe (mit einer Prävalenz von 0,5-0,8 % (Coffey et al., 2016)), bei der lediglich zwei statt der physiologischen drei Klappentaschen angelegt sind. Bei der bikuspidalen Klappe tritt die symptomatische Stenose aufgrund des beschleunigten Verkalkungsprozesses und der erhöhten mechanischen Belastung durchschnittlich 20 Jahre früher (im Alter von 50-70 Lj.) (Michelena et al., 2008; Siu and Silversides, 2010) als bei trikuspidalen Klappen mit der senilen kalzifizierten Form (im Alter von 70-90 Lj.) auf (Herold, 2023, S. 172; Nightingale and Horowitz, 2005; Osnabrugge et al., 2013). Die kalzifizierte AVS ist bei Personen über 70 Jahren mit ca. 50 % die häufigste Ätiologie (Shu et al., 2023).

Vor den 1950er Jahren war rheumatisches Fieber für einen großen Teil der erworbenen Herzklappenfehler verantwortlich. Autoimmunprozesse führen hierbei zu einer Verdickung der Taschenklappen, Verklebung der Kommissuren und später auch zu Kalzifizierungen. Häufig tritt eine mehr oder weniger ausgeprägte Insuffizienz auf, begleitet von zusätzlichen postrheumatischen Veränderungen (Carapetis et al., 2016; Schuler, 2017, S. 278). Durch die erfolgreiche Prävention der Streptokokken-Tonsillitis und durch die verbesserten hygienischen Standards konnte in den Industriestaaten eine Elimination neuer Fälle von akutem rheumatischem Fieber in hohem Maße erreicht werden; in vielen Entwicklungsländern bleibt rheumatisches Fieber jedoch endemisch und stellt nach wie vor ein erhebliches gesundheitliches Problem und eine der wichtigsten Ursachen von Aortenklappenstenose dar (Nkoke et al., 2021; Schuler, 2017, S. 287).

In Deutschland geht die Aortenklappenstenose im Wesentlichen auf einen aktiv-degenerativen Prozess zurück, der durch die Schädigung des Klappendothels, Lipidablagerungen in den Taschenklappen mit Inflammation und Fibrose



gekennzeichnet ist, was schließlich zur Verdickung und Kalzifizierung der Klappensegel führt (Dweck et al., 2012; O'Brien et al., 1996; Rajamannan et al., 2011; Rajamannan et al., 2003). Dieser Prozess findet sich nicht nur an normal strukturierten trikuspiden Klappen, sondern auch bei bikuspiden Klappen (O'Brien, 2006; Schuler, 2017, S. 287).



**Abbildung 1:** Aortenklappenstenose einer trikuspiden Aortenklappe.

Bei diesem Präparat ist die extreme Verengung der Öffnung durch miteinander verwachsene Taschen einer trikuspiden Aortenklappe deutlich sichtbar (Aumüller et al., 2020, S. 593).

### **1.1.2 Pathophysiologie**

Die Pathophysiologie der erworbenen Aortenklappenstenose ist zum aktuellen Zeitpunkt immer noch nicht aufgeklärt. Diese Tatsache geht darauf zurück, dass die molekularen Mechanismen, die die Krankheitsentwicklung antreiben, bislang nicht ausreichend erforscht sind. Häufige Risikofaktoren wie Hypertonie, Dyslipidämie, männliches Geschlecht, fortgeschrittenes Alter, Rauchen und Diabetes wurden mit AVS in Verbindung gebracht, aber sie sind nicht sehr prädiktiv für die Erkrankung (Freeman and Otto, 2005; Stewart et al., 1997). Die Pathophysiologie der AVS wurde aufgrund der weitgehend überlappenden klinischen Risikofaktoren oft mit der Atherosklerose verglichen.

Dennoch existieren ebenso große Unterschiede zwischen Aortenklappenstenose und Atherosklerose in der klinischen Präsentation und im therapeutischen Ergebnis, die die unterschiedlichen Merkmale der beiden Erkrankungen unterstreichen (Niepmann et al., 2019). So haben nur wenige Patienten mit signifikanter koronarer Herzkrankheit auch eine AVS, die Inzidenz von Patienten mit AVS, die auch eine signifikante atherosklerotisch bedingte koronare Herzkrankheit, haben, liegt andererseits ebenfalls nur bei ungefähr 50-60 % (Matta and Moussallem, 2019; Mazzone et al., 2007; Paradis et al., 2014; Qian et al., 2010). Auch sind HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) bei Patienten mit Atherosklerose eine der wirksamsten Therapien in Primär- und Sekundärprophylaxe, sind jedoch nutzlos, um die Progression der AVS zu verhindern (Rossebo et al., 2008; Teo et al., 2011). Zudem stehen prominente Einzelnukleotid-Polymorphismen, die mit AVS einhergehen, in keinem Zusammenhang mit der Verkalkung der Koronararterien und der klinischen koronaren Herzkrankheit (Thanassoulis et al., 2013). Es wurden genetische Varianten, die zu einer beschleunigten Verkalkung und Veränderungen der extrazellulären Matrix (ECM) durch Dysregulation von Matrix-Metalloproteinasen und zur Entwicklung von AVS führen, identifiziert. Dazu gehören Mutationen in NOTCH1 (Neurogenic locus notch homolog protein 1) und in der GATA-Familie von Zinkfingerproteinen (Kerstjens-Frederikse et al., 2016; Liu et al., 2018; Michelena et al., 2014).

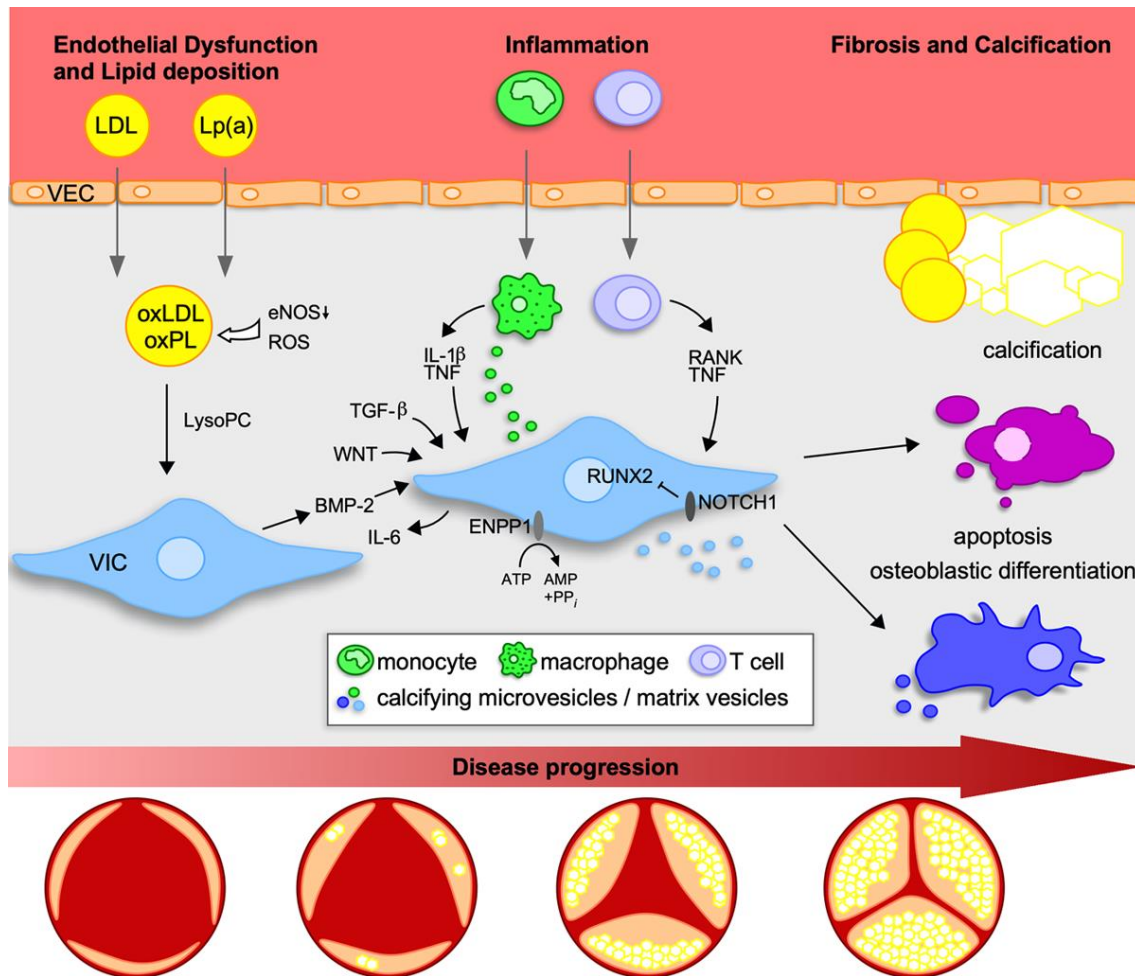
Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer AVS besteht in der mechanischen Belastung und Schädigung, die durch hämodynamische Beanspruchung während des ständigen Öffnens und Schließens der Klappentaschen verursacht wird (Li et al., 2011). Wichtig zu erwähnen ist, dass die nichtkoronare Klappentasche häufig vor der linken und der rechten koronaren Klappentasche Anzeichen von Schädigung zeigt. Dies könnte mit der niedrigeren Scherspannung über dem Endothel aufgrund des Fehlens eines diastolischen koronaren Flusses zusammenhängen. Die endotheliale Dysfunktion, die die Klappenläsionen initiiert, ist womöglich auf einen erhöhten mechanischen Stress oder eine erniedrigte Scherspannung zurückzuführen (Freeman and Otto, 2005; Hulin et al., 2018).

Gesunde Taschenklappen (valvulae semilunares) sind weniger als ein Millimeter dick und bestehen aus drei Schichten, den laminae fibrosa, spongiosa und ventricularis. Die dem Ventrikel zugewandte lamina ventricularis und die der Aorta zugewandte lamina

fibrosa werden von einer Endothelschicht überzogen, die aus valvulären Endothelzellen (VECs) besteht. Das Interstitium der Klappe, die lamina spongiosa, besteht zu großen Teilen aus valvulären interstitiellen Zellen (VICs), einer fibroblastenähnlichen Zellpopulation (Goody et al., 2020; Rutkovskiy et al., 2017). Um den unterschiedlichen biomechanischen Anforderungen der Klappe gerecht zu werden, verfügen diese Schichten über extrazelluläre Matrix (extracellular matrix; ECM). Die lamina fibrosa, die den größten Teil der Klappe und die tragende Hauptstruktur darstellt, weist reichlich Kollagenfibrillen vom Typ I auf. Die lamina ventricularis besteht aus Kollagen und radial ausgerichtetem Elastin, die eine wesentliche Rolle bei der Verteilung der radialen Kräfte während der Klappenöffnung spielen. Zwischen den beiden Schichten liegt die lamina spongiosa, die größtenteils aus Glykosaminoglykanen (GAGs) besteht. Es wird angenommen, dass sie eine Gleitfunktion für die äußeren Schichten haben. Die Kenntnis über den Aufbau der Aortenklappe stellt die Grundlage für das Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen im Falle einer Stenose dar (Goody et al., 2020; Simionescu et al., 2003; Vesely, 1998).

Der fibrokalzifizierende Umbau der Klappe bei der degenerativen AVS wurde lange als ein altersbedingter degenerativer Prozess angesehen, der durch passive Kalziumablagerung in der Klappe verursacht wurde. Heutzutage wird der Krankheitsverlauf mit aktiven Prozessen in Verbindung gebracht, an denen zelluläre und molekulare Signalwege beteiligt sind (Donato et al., 2020). Diese werden vermutlich v.a. durch die valvulären interstitiellen Zellen (VICs) koordiniert (Rutkovskiy et al., 2017; Zheng et al., 2020).

Die Entstehung der AVS kann in 2 Phasen unterteilt werden. Bei der ersten Phase spielt die Endothelschädigung, durch Verletzungen, Entzündungen und nachfolgende Ablagerung von Lipiden und Lipoproteinen eine wesentliche Rolle. In der zweiten Phase sind osteogene Differenzierung der VICs, Verkalkung und Fibrosierung für das Fortschreiten der Erkrankung verantwortlich (Aikawa et al., 2007; Goody et al., 2020; Zheng et al., 2020). Auf molekularer Ebene sind zahlreiche Signalwege und Faktoren identifiziert worden, die darin involviert sind (Donato et al., 2020; Goody et al., 2020).



**Abbildung 2:** Phasen der kalzifizierten Aortenklappenstenose (Goody et al., 2020).

VEC: valvuläre Endothelzellen, LDL: Low-Density-Lipoprotein, Lp(a): Lipoprotein(a), ox-LDL: oxidiertes LDL, ox-PLs: oxidierte Phospholipide, eNOS: endotheliale Stickoxid-Synthase, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, LysoPC: Lysophosphatidylcholin, VIC: valvuläre interstitielle Zellen, IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ , TNF: Tumornekrosefaktor, RANK: receptor activator of nuclear factor kappa B, TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ , WNT: wingless and Int-1, BMP-2: bone morphogenic protein 2, IL-6: Interleukin-6, Runx2: runt-related transcription factor 2, NOTCH1: Neurogenic locus notch homolog protein 1, ENPP1: ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1, ATP: Adenosintriphosphat, AMP: Adenosinmonosphat, PP: Pyrophosphat.

Der mechanische Stress induziert eine endotheliale Dysfunktion der valvulären Endothelzellen (VECs) mit nachfolgender Infiltration von Lipoproteinen, insbesondere LDL (Low-Density-Lipoprotein) und Lp(a) (Lipoprotein[a]). Dies wird begleitet von

einer Extravasation von Immunzellen aus dem Blut in das Interstitium von Klappentaschen. Eine Dysregulation des eNOS-Signalwegs (endotheliale Stickoxid-Synthase) führt zu einer Induktion der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Letztere stimulieren die Oxidation von infiltrierten Lipiden zu ox-LDL (oxidiertem LDL) und oxidierten Phospholipiden (ox-PLs). Diese Moleküle werden weiter in Lysophosphatidylcholin (LysoPC) umgewandelt, wodurch die Apoptose von valvulären interstitiellen Zellen (VICs) und die Freisetzung apoptotischer Körper gefördert werden, was eine diffuse Verkalkung und Fibrosierung zur Folge hat. Die abgelagerten oxidierten Lipide in der Klappe verstärken die Infiltration der Immunzellen in das Gewebe und führen zu ihrer Aktivierung. Die eingewanderten Makrophagen und T-Zellen stimulieren die osteogene Differenzierung von VICs durch die Freisetzung von Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und TNF (Tumornekrosefaktor) (Goody et al., 2020). Aktivierte VICs produzieren desorganisiertes Kollagen, was Fibrose und progressive Klappenverdickung und -versteifung verursacht. Anschließend werden durch die osteoblastenähnlichen Zellen kalzifizierende extrazelluläre Vesikel produziert. Die Verkalkung des Ventils induziert ein Compliance-Mismatch, was zu erhöhter mechanischer Belastung, Verletzung, Apoptose und Osteoblastenaktivierung führt, was die Verkalkung vorantreibt, wodurch sich letztendlich ein Teufelskreis entwickelt (Zheng et al., 2020). Das bereits genannte Notch1-Protein, dessen Defizienz zu einem beschleunigten Verkalkungsprozess führt, schützt vor osteoblastischer Differenzierung durch Hemmung der BMP-2-Expression. BMP-2 (bone morphogenic protein 2) induziert nämlich die osteogene Differenzierung (Goody et al., 2020).

### **1.1.3 Klinischer Verlauf und Prognose**

Die erworbene AVS verläuft oft über eine lange Zeit ohne Symptome. Sie führt zu einer Zunahme der Druckbelastung des linken Ventrikels. Die typischen drei Symptome der Aortenstenose sind Dyspnoe, Angina pectoris und Schwindel bzw. Synkope (Vogelgesang et al., 2018). Im Allgemeinen manifestieren sich diese Symptome erst spät, sodass das Auftreten eines oder mehrerer dieser Symptome in der Regel die Indikation zur baldigen Operation darstellt (Flachskampf and Daniel, 2004). Die Öffnungsfläche der Aortenklappe (Normwert bei Erwachsenen 2,6 - 3,5 cm<sup>2</sup>) muss sich stark verringern (unter 1-1.5 cm<sup>2</sup>), bevor es zu einer signifikanten hämodynamischen Beeinträchtigung kommt (hochgradige AVS < 1.0 cm<sup>2</sup>) (Aluru et al., 2022). Das

häufigste Symptom der AVS ist die Dyspnoe (Park et al., 2013). Mehr als zwei Drittel der symptomatischen Patienten zeigen Anzeichen von Atemnot und Angina pectoris, insbesondere bei Belastung (Vogelgesang et al., 2018). Etwa 10 % der symptomatischen Patienten berichten von Schwindel oder Synkope (Vogelgesang et al., 2018). Zusätzlich können auch Herzrhythmusstörungen auftreten, insbesondere in Form von tachykardem Vorhofflimmern (Flachskampf and Daniel, 2004). Im Verlauf zeigt die Aortenstenose eine deutliche Tendenz zur Progression und Verschlechterung der Symptomatik. Die mittlere Progressionsrate betrug in einer Studie mit 170 Patienten  $0,10 \pm 0,27 \text{ cm}^2/\text{Jahr}$ . Allerdings konnte sie im Einzelfall bis zu 43 % des initialen Wertes erreichen, was bedeutet, dass sie im individuellen Fall unvorhersehbar war (Palta et al., 2000).

Der plötzliche Herztod tritt meistens bei körperlicher Belastung und fast nur bei symptomatischen Patienten auf. Er kann jedoch in manchen Fällen vor der Diagnosestellung auftreten (Herold, 2023, S. 173; Taniguchi et al., 2018). Nach dem Auftreten erster Symptome steigt die Mortalität sprunghaft an, die Überlebensdauer beträgt nur bis zu fünf Jahre und bei eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion lediglich zwei Jahre (Coffey et al., 2021; Schuler, 2017, S. 289). Die zweijahres-Mortalität steigt bei symptomatischer AVS bis auf 50 % (Coffey et al., 2021; Makkar et al., 2012; Otto and Prendergast, 2014). Die schlechte Prognose der AVS unterstreicht die Notwendigkeit einer intensiven Erforschung ihrer Pathophysiologie und therapeutischen Möglichkeiten.

#### **1.1.4 Diagnostik und Therapie**

In der klinischen Untersuchung zeigt sich beim Vorliegen von AVS ein pulsus tardus et parvus mit kleiner Amplitude und langsamer Steigung. (Herold, 2023, S. 173).

Auskultatorisch zeigt sich ein raues spindelförmiges Holosystolikum mit punctum maximum parasternal über dem 2. rechtsseitigen Intercostalraum. Dieses Geräusch wird häufig beidseitig in die Karotiden fortgeleitet (Vogelgesang et al., 2018). Im EKG lassen sich charakteristische Veränderungen feststellen. Es finden sich bei höhergradiger Stenose: Linkstyp, Linkshypertrophiezeichen (Sokolow-Lyon-Index für Linkshypertrophie:  $SV1 + RV5$  oder  $RV6 > 3,5 \text{ mV}$ ), T-Negativierung linkspräkordial ( $V4-6$ ) (Herold, 2023, S. 173). Die Diagnose der AVS wird mithilfe der transthorakalen

Echokardiographie (TTE) und in Ergänzung der transösophageale Echokardiographie (TEE) gestellt und qualitativ bewertet (Erbel, 2020; Vahanian et al., 2022). Trotz der Weiterentwicklung anderer bildgebender Verfahren bleibt die transthorakale Echokardiographie (TTE) gemäß den aktuellen Leitlinien der Europäischen und der Amerikanischen Fachgesellschaft für Kardiologie nach wie vor der diagnostische Goldstandard (Vahanian et al., 2022).

Unter schlechten Schallbedingungen, wie beispielsweise bei adipösen Patienten, ist eine transösophageale Echokardiographie (TEE) als ergänzende Methode hilfreich (Vahanian et al., 2022; Vogelgesang et al., 2018). In ausgewählten Fällen kommen zudem die schnittbildgebenden Verfahren Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) zum Zweck der Diagnosestellung zum Einsatz. Zur Planung der TAVI (Transkatheter-Aortenklappenimplantation) ist die CT das bevorzugte bildgebende Verfahren zur Darstellung von Aortenwurzel bis Beckenstrombahn, während die MRT das bildgebende Verfahren der Wahl bei Verdacht auf Myokardfibrose darstellt (Herold, 2023, S. 173; Vahanian et al., 2022). Aufgrund der zuvor beschriebenen immer noch hohen Prävalenz einer koronaren Herzkrankheit bei Patienten mit AVS wird weiterhin eine Koronarangiographie durchgeführt (Vahanian et al., 2022; Vogelgesang et al., 2018).

Eine spezifische medikamentöse Therapie der Aortenklappenstenose existiert zurzeit nicht. Patienten mit Herzinsuffizienz, die ungeeignet sind für eine chirurgische Operation oder eine TAVI-Intervention (oder darauf warten), sollten gemäß den ESC (European Society of Cardiology)-Richtlinien für Herzinsuffizienz medikamentös behandelt werden (Authors/Task Force et al., 2022). Im Fokus der medikamentösen Therapie steht vor allem die Blutdruckkontrolle. ACE-Hemmer haben sich dabei als nützlich erwiesen (Ochiai et al., 2018; Vahanian et al., 2022). Ein neuer therapeutischer Ansatz besteht im Eingreifen in den Vitamin-K-Stoffwechsel, da Vitamin-K-abhängige Proteine (VKDP) eng mit vaskulärer Steifigkeit und Verkalkung verbunden sind und für ihre Aktivität auf Vitamin K angewiesen sind. Eine Inaktivierung der VKDP steht in engem Zusammenhang mit kardiovaskulären Ereignissen (Brandenburg et al., 2017; Erbel, 2020). Bisphosphonate und Denosumab stellen weitere experimentelle therapeutische Ansätze dar (Donato et al., 2020). Eine Studie, die sich mit der Wirksamkeit von Bisphosphonaten und Denosumab auseinandersetzte, ergab jedoch

keinen signifikanten positiven Effekt auf die Progression der AVS (Pawade et al., 2021). Somit bleibt als kurative Therapieoption für Patienten mit hochgradiger symptomatischer AVS nur der chirurgische oder interventionelle prothetische Klappenersatz. Abschließend wird Patienten mit zu schweren Komorbiditäten und einer prognostizierten Lebenserwartung von unter einem Jahr, die von einer Intervention mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht profitieren, eine palliative Therapie empfohlen (Vahanian et al., 2022; Vogelgesang et al., 2018).

### **1.1.5 Aortenklappenstenose im Mausmodell**

Für die pathophysiologische Untersuchung der AVS und die Erprobung von neuen Therapien werden zuverlässige und reproduzierbare Modelle benötigt.

Eine Vielzahl von Kleintiermodellen - und hier v.a. Mausmodellen - ist zur Erforschung der Aortenklappenstenose grundlagenwissenschaftlich evaluiert worden, ein geeignetes Modell mit reproduzierbaren Ergebnissen und einem praktikablen Untersuchungsaufwand hat sich aber bislang nicht durchgesetzt. Mäuse sind neben dem Menschen die einzige Spezies, die durch gezielte Eingriffe nachweislich eine hämodynamisch relevante Stenose entwickeln können (Barrick et al., 2009; Miller et al., 2009; Miller et al., 2010; Weiss et al., 2006). Genetische Veränderungen sind an Mäusen relativ leicht verfügbar. Die relativ kurze Lebensdauer und dadurch relativ beschleunigte Pathogenese der Maus macht sie zu einem attraktiven Modell für die Untersuchung zeit- und altersabhängiger Krankheiten wie AVS (Miller et al., 2011).

Nachteilig ist hingegen die geringe Größe, welche die hämodynamische Beurteilung des Schweregrades der Stenose für lange Zeit zu einer Herausforderung machte. Die Kleintierechokardiografie hat sich jedoch in letzter Zeit sprunghaft verfeinert, und hochauflösende Bildgebungssysteme sind zurzeit im Handel erhältlich (Barrick et al., 2009; Miller et al., 2011; Weiss et al., 2006). Die anatomische Struktur der Aortenklappe der Maus unterscheidet sich von derjenigen des Menschen. Mäuse haben nicht die typische, wie vorangegangen beschriebene dreischichtige Gewebemorphologie der Aortenklappe, wie sie bei Menschen vorkommt. Stattdessen sind ihre Taschen normalerweise nur etwa 5-10 Zellen dick und zeigen keine getrennten Schichten. Außerdem entwickeln Wildtyp-Mäuse eine Aortenklappenstenose nicht spontan,



sondern wie bereits erwähnt durch chirurgische, genetische oder diätetische Interventionen (Sherzad et al., 2021; Sider et al., 2011).

Es wurden bereits mehrere Methoden beschrieben, um eine AVS bei Mäusen im Labor auszulösen. So wurde ein diätetisches Modell der Aortenklappenstenose bei Wildtyp-Mäusen veröffentlicht, in dem Wildtyp Mäuse (C57BL/6) über einen Zeitraum von 4 Monaten mit einer fett- und kohlenhydratreichen, aber cholesterinfreien Diät gefüttert wurden. Diese Mäuse zeigten eine Verdickung der Aortenklappentaschen und eine verminderte Aortenklappenöffnung, entwickelten jedoch nur eine leichte Aortenklappenstenose (Drolet et al., 2006). Hypercholesterinämische LDLr<sup>-/-</sup> ApoB<sup>100/100</sup> (low-density lipoprotein receptor-deficient apolipoprotein B-100-only) Mäuse zeigten erst in einem Alter von 20 Monaten Anzeichen von Verkalkung und oxidativem Stress in der Aortenklappe mit daraus folgender Aortenstenose und funktioneller Herzklappenerkrankung (Weiss et al., 2006). Eine deutliche frühe Abnahme der linksventrikulären Funktion wurde kürzlich bei naiven neuseeländischen fettleibigen (Naive New Zealand Obese, NZO) Mäusen beobachtet. Es wurde gezeigt, dass NZO-Mäuse im Alter von 3-6 Monaten eine degenerative Aortenstenose und damit verbundene ventrikuläre und pulmonale Endorganschäden entwickeln, analog zum klinischen Szenario einer degenerativen Aortenklappenstenose (Ott et al., 2021).

Eine der vielversprechenden artifiziellen Methoden ist die mechanische Induktion einer Aortenklappenstenose durch eine gezielte Drahtverletzung der Klappe bei gesunden Mäusen, die von Honda et al im Jahr 2014 erstmalig vorgestellt wurde (Honda et al., 2014). Das Modell wies zudem einige wesentliche Charakteristika der menschlichen Aortenklappenstenose auf, wie z.B. die Immigration von Entzündungszellen und eine zumindest teilweise Verkalkung der Taschenklappen.

Diese mechanische Verletzung stellt gerade im Vergleich zu diätetischen Ansätzen ein interessantes, vielversprechendes Modell dar, wodurch in Abgrenzung zu diätetischen Versuchsaufbauten in relativ kurzer Zeit (innerhalb von wenigen Wochen, 1-4 Wochen) und unabhängig vom primären genetischen Hintergrund eine schwere AVS induziert werden kann.

Die folgende Tabelle (1) fasst die wesentlichen Charakteristika der genannten Mausmodelle zusammen.

**Tabelle 1:** Charakteristika von einigen Mausmodellen für Aortenklappenstenose.

WT: Wildtyp, LDLr<sup>-/-</sup> ApoB<sup>100/100</sup>: low-density lipoprotein receptor-deficient apolipoprotein B-100-only, NZO: Naive New Zealand obese.

Mausmodell	Art der Behandlung	Dauer bis zur AVS-Entwicklung	Studie
WT C57/BL6J	fett- und kohlenhydratreiche Diät	4 Monate	Drolet et al., 2006
LDLr <sup>-/-</sup> ApoB <sup>100/100</sup>	genetisch, Normal-Diät	20 Monate	Weiss et al., 2006
NZO-Mäuse	spontan, Normal-Diät	3-6 Monate	Ott et al., 2021
WT C57/BL6J	mechanische Verletzung	1-4 Wochen	Honda et al., 2014

## **2 Zielsetzung und Fragestellungen**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das von Honda et al. entwickelte Mausmodell der Aortenklappenstenose zu reproduzieren und kritisch zu überprüfen, die pathophysiologischen Veränderungen der induzierten Aortenklappenschädigung nachzuvollziehen und die technische Machbarkeit und die Reproduzierbarkeit im Labor zu hinterfragen (Honda et al., 2014).

In dem untersuchten Modell wurde eine Aortenklappenstenose durch eine operative, lokale Schädigung mithilfe eines Drahtes induziert. Trotz der bislang vielversprechenden wissenschaftlichen Daten bestanden aufgrund der insgesamt noch geringen Verwendung zahlreiche offene Fragen hinsichtlich der genauen, modellspezifischen Pathophysiologie und damit eigentlichen Nützlichkeit für die Erforschung von AVS (Artiach et al., 2020; Niepmann et al., 2019; Wen et al., 2023).

Es ergaben sich für diese Arbeit folgende Hauptfragestellungen:

1. Lässt sich das Modell zuverlässig und effizient reproduzieren?
2. Welchen Effekt hat die Verletzung der Klappe auf die Immunantwort sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase?
3. Welche histologischen Veränderungen der Aortenklappe treten in der chronischen Phase nach der induzierten Schädigung auf?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Operative Schädigung der Aortenklappe im Mausmodell**

##### **3.1.1 Versuchstiere**

Für die Untersuchungen wurden männliche C57BL/6J-Mäuse im Alter von 8-10 Wochen verwendet (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Unterbringung erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen in einem 22 °C-Raum mit 12-stündigem Tag-Nacht-Zyklus, mit Wasser und Nahrung ad libitum. Alle experimentellen Verfahren wurden gemäß der Tierschutzbestimmungen des LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) durchgeführt (Tierversuchsantrag: 84-02.04.2017.A438). Alle Tierversuche erfolgten in Einklang mit institutionellen Richtlinien und deutschem Tierschutzgesetz.

##### **3.1.2 Versuchsaufbau**

Zur Untersuchung von Veränderungen in der Früh- und Spätphase nach einer operativen Schädigung der Aortenklappe wurden die folgenden Versuchsmodelle erstellt.

- Frühphasenmodell:

Die Gruppeneinteilung wurde in Analogie zum ursprünglichen Modell von Honda et al. vorgenommen. Ziel war es, kurzfristige echokardiografische und immunologische Veränderungen 1 Woche nach Intervention zu detektieren.

- Gruppenaufteilung:

1. Interventionsgruppe, bei der der Draht durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt und 200-mal gedreht wurde (Wire injury-Gruppe, 4 Mäuse).
2. Interventionsgruppe, bei der der Draht ohne schädigendes Drehungsmanöver durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt wurde (Sham-OP-Gruppe, 4 Mäuse).

- Spätphasenmodell:

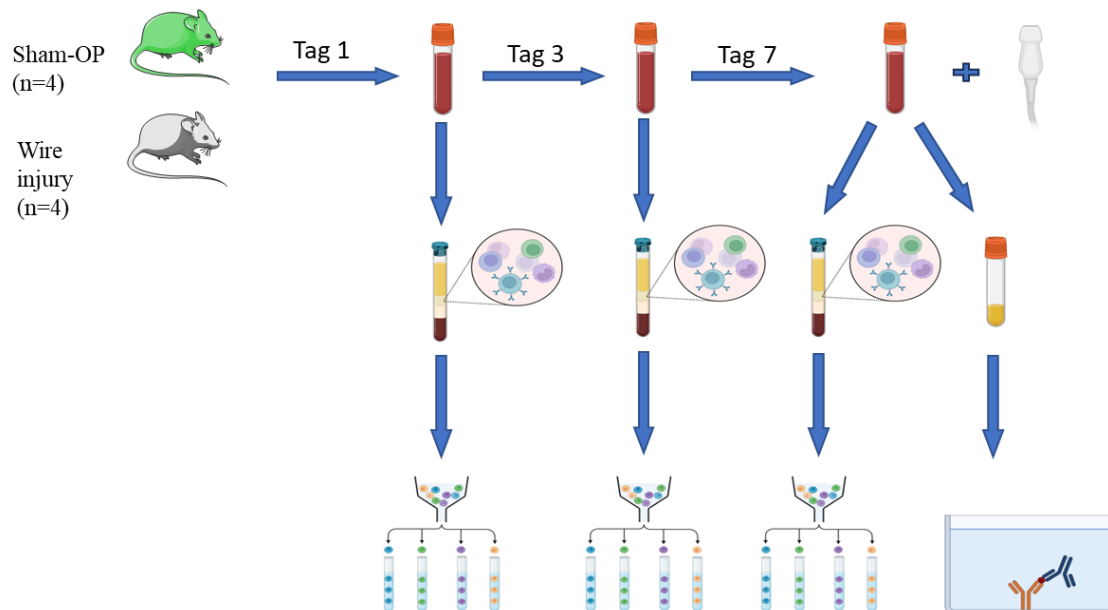
Ziel in diesem Teil der Arbeit war es, längerfristige echokardiografische, immunologische und histologische Veränderungen nach einem postinterventionellen Zeitraum von 4 Monaten zu detektieren. Basierend auf den Ergebnissen des Frühphasenmodells und um die Aussagekraft zu steigern, wurde eine weitere Kontrollgruppe ohne jegliche Operation in das Experiment integriert. Unter Berücksichtigung der aus einer ersten Analyse gewonnenen Daten wurde für eine alternative Bewertung die Gruppeneinteilung neu festgelegt, um die primären Endpunkte in der Beurteilung der schädigungsbedingten Entwicklung von AVS erfolgreich bearbeiten zu können.

- Gruppeneinteilung:

1. Kontrollgruppe ohne Intervention (10 Mäuse).
2. Interventionsgruppe, bei der der Draht ohne schädigendes Drehungsmanöver durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt wurde (Sham-OP-Gruppe, 4 Mäuse).
3. Interventionsgruppe, bei der der Draht durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt und 200-mal gedreht wurde (Wire injury-Gruppe, 7 Mäuse).

- Aufteilung nach Regruppierung:

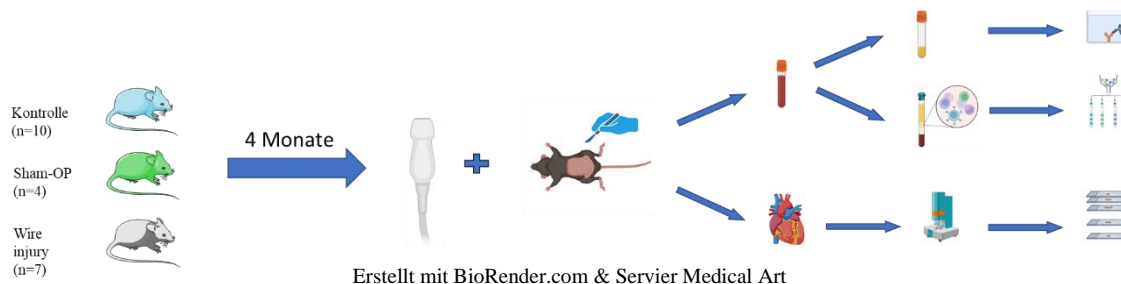
1. Kontrollgruppe ohne Intervention (10 Mäuse).
2. Interventionsgruppe, bei der der Draht ohne schädigendes Drehungsmanöver durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt wurde (analog zu Sham-OP, 4 Mäuse) oder keine Flussbeschleunigung nach operativer Schädigung mit Drehungsmanöver im Verlauf entwickelt wurde (2 Mäuse) (no AVS-Gruppe, 6 Mäuse).
3. Interventionsgruppe, bei der der Draht durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt, 200-mal gedreht wurde und AVS durch Flussbeschleunigung nach 4 Monaten bestätigt wurde (AVS-Gruppe, 5 Mäuse).



Erstellt mit BioRender.com & Servier Medical Art

**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus vom Frühphasenmodell.

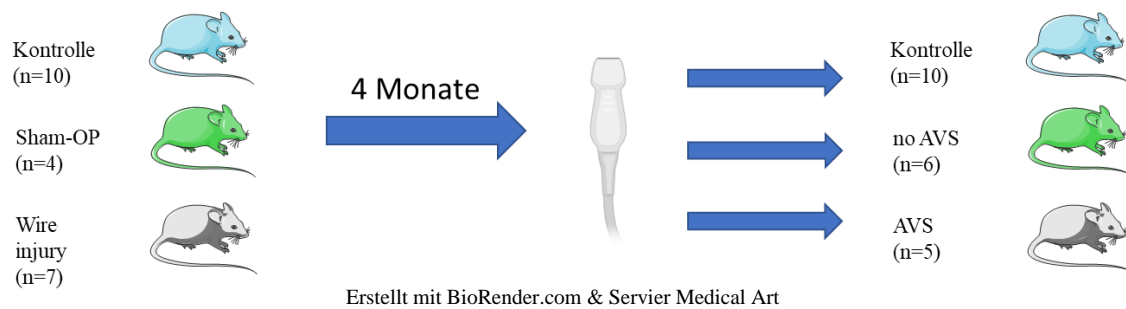
Das Schema zeigt die untersuchten Mausgruppen. Am Tag 1, 3 und 7 postoperativ wurde eine durchflusszytometrische Analyse der peripheren Blutzellen (Leukozyten) ausgeführt. Am Tag 7 wurden zusätzlich eine Zytokin-Analyse des Blutplasmas und eine echokardiografische Untersuchung durchgeführt.



Erstellt mit BioRender.com & Servier Medical Art

**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus vom Spätphasenmodell.

Das Schema zeigt die untersuchten Mausgruppen. 4 Monate nach der Prozedur wurden Echokardiografie sowie Organentnahme durchgeführt. Mit dem Blutplasma wurde eine Zytokin-Assay und mit den peripheren Blutzellen (Leukozyten) wurde eine durchflusszytometrische Analyse ausgeführt. Mit den Herzen wurde eine lichtblattemikroskopische Analyse und im Anschluss eine konventionelle histologische und immunhistochemische Analyse ausgeführt.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der echokardiografisch basierten Neugruppierung.

Die Gruppen wurden anhand der echokardiografischen Bestätigung der Aortenklappenstenose (Flussbeschleunigung) neu gebildet.

2 Mäuse aus der Wire injury-Gruppe wurden mit der Sham-OP-Gruppe aufgrund fehlender Entwicklung einer Aortenklappenstenose ausgewertet (no AVS).

### 3.1.3 Materialien

- OP-Bestech bestehend aus Schere, Mikroschere, Anatomischer Pinzette, Chirurgischer Pinzette, feinen Mauspinzetten (World Precision Instruments, Florida, USA)
- Leica Stereomikroskop Binokular 35 x Microsyst (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- Medimex Ultraschallgel (Medimex, Limburg, Deutschland)
- Chemischer Haarentferner (Nair Sensitive Hair Removal Cream) (Church & Dwight Canada Corp, Mississauga, Kanada)
- Narkosemittel (Ketamin 10 % / Xylazin 2 %) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland)
- Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml (LEO Pharma, Ballerup, Dänemark)
- Ultraschallgerät Vevo 3100 (VisualSonics, Toronto, Kanada)
- 0,014" (Inch)-Führungsdraht (MIRACLEBROS 6) (Asahi Intecc, Nagoya, Japan)
- Buprenorphin-Lösung 100 µg/mL (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Thermometer BIO-TK8851 (BIOSEB, Vitrolles, Frankreich)

### **3.1.4 Lösungsherstellung**

#### **Narkoselösung**

Ketamin 100 mg/kg Körpergewicht und Xylazin 20 mg/kg Körpergewicht.

1 ml Ketamin 10 % + 1 ml Xylazin 2 % + 8 ml NaCl = 10 ml Narkoselösung.

Von dieser Lösung wurden 10 µl pro Gramm Mausgewicht injiziert. Die Narkosedauer betrug 30 - 60 min.

#### **NaCl-Heparin-Lösung**

1 ml (5000 I.E.) Heparin + 499 ml NaCl = 500 ml NaCl-Heparin-Lösung. Diese Lösung enthält 10 I.E. Heparin pro ml und wurde zur Spülung von dem Draht zur Antikoagulation verwendet.

### **3.1.5 Operation**

Die Tiere wurden vor Durchführung der Operation gewogen. Die Mausbrust wurde rasiert und mit einem chemischen Haarentferner zur Verringerung der Ultraschalldämpfung bei der Echokardiographie behandelt. Im Anschluss erhielt die Maus eine intraperitoneale Narkose (Ketamin 100 mg/kgKG und Xylazin 20 mg/kgKG). Zum intraoperativen Schutz der Augen wurde eine Creme aufgetragen und ein Thermometer zur Temperaturkontrolle während der OP rektal eingeführt. Die Maus wurde auf eine Platte fixiert und der Kopf leicht rekliniert. Die Haut wurde in Projektion der rechten A. carotis communis inzidiert. Die Muskelschichten und Speicheldrüsen wurden nach lateral präpariert.

Die A. carotis communis wurde nach dem Setzen einer distalen und einer proximalen Ligatur in die Vorderseite eingeschnitten und der Draht unter Ultraschallkontrolle transcarotidal unter langsamer alternierender Rotation in den linken Ventrikel eingeführt.

Der Draht wurde gemäß dem Protokoll von Honda et al. im Ventrikel 20-mal 3 mm vor und zurück bewegt, um eine erste Schädigung des Endothels der Aortenklappe zu erreichen. Anschließend wurde die Drahtspitze in die Klappenebene bzw. in den linksventrikulären Ausflusstrakt 1-2 mm hinter die Aortenklappe zurückgezogen und unter Verwendung der Drehvorrichtung 200-mal alternierend rotiert.

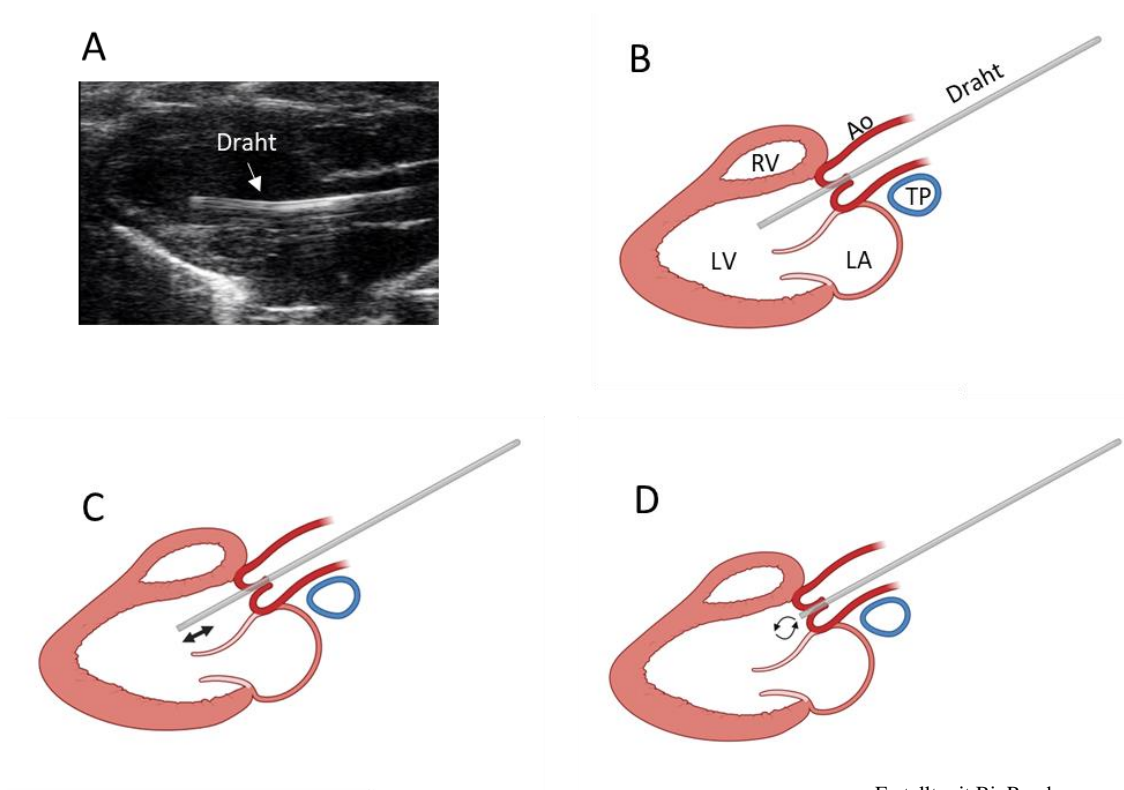
Echokardiografisch wurde mittels Farbdoppler die erwartete Aortenklappeninsuffizienz



überprüft. Der Draht wurde unter leichter Rotation entfernt mit anschließender Ligatur der proximalen rechten A. carotis communis und abschließender Hautnaht. Zuletzt erfolgte eine erneute transthorakale Echokardiografie zur Evaluation der Aortenklappe.

Postoperativ erhielten die Mäuse Buprenorphin (0,1 mg/kg KG 3 x tgl. s.c.) zur Analgesie.

Bei den Sham-OP-Mäusen erfolgte die Drahtpositionierung wie oben aufgeführt, entgegen dem Schädigungsprotokoll wurde der Draht im linken Ventrikel weder rotiert noch bewegt. Der Draht verblieb dort für 1:40 min (die benötigte Zeit für das Bewegungs- und Rotationsmanöver) und wurde anschließend wie oben erwähnt entfernt.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Operation an der Aortenklappe.

2-dimensionales Echokardiogramm aus der Ansicht der parasternalen langen Achse mit Führungsdraht im linken Ventrikel (A). Schematische Darstellung des Herzens aus der

Ansicht der parasternalen langen Achse mit Führungsdraht im linken Ventrikel; Ao: Aorta ascendens, LV: linker Ventrikel, LA: linkes Atrium. RV: rechter Ventrikel, TP: Truncus pulmonalis (B). Verletzung der Aortenklappe durch den Führungsdraht (C). Positionierung und Rotation der Drahtspitze an der ventrikulären Seite der Klappe (D).

Der primäre sowie langfristige Erfolg der Prozedur wurden durch Echokardiographie bestätigt. Technisches Versagen des Verfahrens wurde definiert als das Fehlen einer Zunahme der Spitzengeschwindigkeit durch die Aortenklappe bei der echokardiografischen Messung nach 4 Monaten im Vergleich zu den Kontrollmäusen, im Einklang mit früheren Studien, die das Model ebenso untersucht haben (Artiach et al., 2020; Niepmann et al., 2019).

### **3.1.6 Organentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte im Frühphasenmodell am Tag 1, 3 und 7 nach der Operation aus dem retrobulbären Venenplexus unter einer kurzzeitigen Inhalationsnarkose mit Isofluran.

Die Entnahme von Blut und Herz erfolgte im Spätphasenmodell 4 Monate nach der Operation unter Verwendung einer zum Tod führenden Analgosedierung, wie im Folgenden erklärt wird.

#### **3.1.6.1 Materialien**

- OP-Besteck bestehend aus Schere, Mikroschere, Anatomischer Pinzette, Chirurgischer Pinzette, feinen Mauspinzetten (World Precision Instruments, Florida, USA)
- Leica Stereomikroskop Binokular 35 x Microsyst (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- 25 G-Nadeln (B.Braun, Melsungen, Deutschland)
- 10 ml-Spritzen (B.Braun, Melsungen, Deutschland)
- 2 ml-Spritzen (B.Braun, Melsungen, Deutschland)
- Feinwaage (Präzisionswaage - 200 g / 0,001 g) (Steinberg systems, Berlin, Deutschland)
- Narkosemittel (Ketamin 10 % / Xylazin 2 %) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

- 1 ml-Tuberkulin-Spritzen (B.Braun, Melsungen, Deutschland)
- 15 ml-Röhrchen (StonyLab, New York, USA)
- 1,5 ml- Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- PBS (phosphate-buffered saline) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml (LEO Pharma, Ballerup, Dänemark)
- 70 % Ethanol (Walter CMP, Kiel, Deutschland)
- 4 % Formaldehyde (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- EDTA 0,5 mol/l (ethylenediaminetetraacetic acid) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

### **3.1.6.2 Lösungsherstellung**

#### **Narkoselösung**

Ketamin 100 mg/kg Körpergewicht und Xylazin 20 mg/kg Körpergewicht.

1 ml Ketamin 10 % + 1 ml Xylazin 2 % + 8 ml NaCl = 10 ml Narkoselösung.

Von dieser Lösung wurden 10 µl pro Gramm Mausgewicht injiziert. Die Narkosedauer betrug 30 - 60 min.

#### **PBS-Heparin-Lösung**

0,1 ml (500 I.E.) Heparin + 9,9 ml PBS = 10 ml Spüllösung, die 5 I.E. Heparin pro ml enthält.

#### **PBS-EDTA-Lösung**

20 µl 0,5 mol/l EDTA + 80 µl PBS = 100 µl Antikoagulationslösung für 1 ml murines Blut.

### **3.1.6.3 Durchführung**

Nach Feststellung des Körpergewichts erhielten die Versuchstiere eine intraperitoneale Narkose (Ketamin 100 mg/kgKG und Xylazin 20 mg/kgKG). Die Maus wurde in Rückenlage fixiert, die Brust mit Ethanol desinfiziert und anschließend die Haut unterhalb des Processus xiphoideus angeschnitten, ohne die Pleura bzw. das Zwerchfell zu verletzen. Das Peritoneum wurde inzidiert und der Schnitt nach kaudal und Richtung Extremitäten erweitert. Der Darm wurde zur Seite geschoben und die Vena cava inferior freigelegt. Mittels 1 ml-Tuberkulin-Spritze, die mit 100 µl PBS-EDTA-Lösung befüllt war, wurde Blut aus der Vena cava inferior entnommen, in ein 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen gegeben und auf Eis gelagert.

Im Anschluss wurde das Herz durch Inzision des Diaphragmas und Entfernung der Lungen freigelegt.

Das Herz wurde gespült, indem man 10 ml sterile 4 °C kalte PBS-Heparin-Lösung mittels 25 G-Nadel in den Apex des linken Ventrikels über 2 - 3 min injiziert.

Das Herz wurde nah an der Aortenwurzel abgesetzt, gewogen und in 4 °C kalte 4 % Formaldehyd gegeben.

Es wurde mit den Herzen fortgefahren, wie es unter 3.3.3 beschrieben ist.

Aus dem Blut wurden Plasma durch Zentrifugation und Leukozyten (durch Lyse der Erythrozyten) extrahiert. Mit den gewonnenen Zellen erfolgte eine durchflusszytometrische Immunzellanalyse. Das Plasma wurde zunächst in 80 °C gelagert und später für eine Zytokinanalyse verwendet.

## **3.2 Echokardiografie**

In dieser Studie wurden 7 Tage (Frühphase) bzw. 4 Monate (Spätphase) nach der Intervention Ultraschalluntersuchungen an den Mäusen durchgeführt und miteinander verglichen, wobei der Fokus auf Flussgeschwindigkeit durch die Aortenklappe, LVEF (linksventrikuläre Ejektionsfraktion), LVEDD (linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser), Herzfrequenz und Vena contracta gesetzt wurde.

### 3.2.1 Materialien

- Ultraschallgerät Vevo 3100 (VisualSonics, Toronto, Kanada)
- Vevo Imaging Station (inklusive EKG-Ableitung) (VisualSonics, Toronto, Kanada)
- Medimex Ultraschallgel (Medimex, Limburg, Deutschland)
- Chemischer Haarentferner (Nair Sensitive Hair Removal Cream) (Church & Dwight Canada Corp, Mississauga, Kanada)
- Isofluran (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Sauerstoff (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Induktionskammer für Euthanasie 7900 (Ugo Basile, Gemonio VA, Italien)
- Anästhesiegerät für Kleintiere (R500 Small Animal Anesthesia Machine) (RWD, Mainz, Deutschland)
- Maus-Nasenmaske (Anesthesia Mask for Rat, Mouse, Small Animal) (RWD, Mainz, Deutschland)
- Thermometer BIO-TK8851 (BIOSEB, Vitrolles, Frankreich)

### 3.2.2 Durchführung

Die Raumtemperatur wurde zwischen 21 und 24 °C gehalten. Die Ultraschallplattform wurde auf 40 °C vorgeheizt, ebenso das Ultraschallgel. Im Anschluss erfolgte eine Isofluran-Sedierung in der Induktionskammer mit 3 % Isofluran bei 1 l O<sub>2</sub>/min. Innerhalb von 10 Sekunden war die Maus sediert, wobei die Maus nicht länger als 2 min in der Kammer verblieb. Im Anschluss wurde eine Nasenmaske mit 1 - 1,5 % Isofluran bei 1 l O<sub>2</sub>/min angelegt. Die angestrebte Herzfrequenz sollte dabei zwischen 500/min und 600/min liegen. Die Maus wurde auf die Platte mit den EKG-Elektroden fixiert, der Thermometer rektal eingeführt und die Brusthaare entfernt.

Im Anschluss wurde mittels Vevo 3100 von Visualsonics die Ultraschalluntersuchung durchgeführt, wobei folgende Ansichten eingestellt wurden:

Anlotungsebenen der Untersuchung waren die parasternal lange und kurze Achse, der apikale 4-Kammerblick und die suprasternale Achse. Es wurde in B-Mode, M-Mode, PW-Doppler und Farb-Doppler gemessen.

### **3.2.3 Auswertung der Daten**

Die Auswertung der Ultraschallbilder erfolgte mittels des Programms VevoLab 3.2 software (FUJIFILM Visualsonics, Toronto, Kanada). Es wurden je 3 konsekutive Herzzyklen ausgewertet.

### **3.3 Lichtblattmikroskopie**

Die Lichtblattmikroskopie (light sheet fluorescence microscopy; LSFM) ist eine Variante des von Siedentopf entwickelten Ultra-Spaltmikroskops. Die Lichtblattmikroskopie ist ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren, bei dem eine dünne Schicht von wenigen Mikrometern in der Probe beleuchtet wird. Im Vergleich zu herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie erreicht man dadurch eine bessere Bildauflösung und einen geringeren Bildhintergrund. Außerdem führt dies zur Verminderung der negativen Auswirkungen durch Bleichen oder lichtinduzierten Stress in den Proben (Borlinghaus, 2017).

#### **3.3.1 Materialien**

- 15 ml-Röhrchen (StonyLab, New York, USA)
- 5 ml- Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- 4 % Formaldehyd (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- PBS (phosphate buffered saline) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- 50 %, 70 %, 100 % Ethanol (Walter CMP, Kiel, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) ROTIDRY® (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ethylcinnamat (ECI) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Triton-X 100 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Saponin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ziegenserum (Normal Goat Serum) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Monoklonaler CD31-Antikörper (Ratte, anti-Maus CD31) gekoppelt an alexa fluor 790, Klon: ER-MP12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

- BOBO-3 (trimethine cyanine homodimer dye) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Schüttelplattform (Orbital Shaker, SHK-O210) (Bioevopeak, Shandong, China)
- Lightsheet Ultra Blaze (LaVision Ultramicroscope III) (LaVision, Göttingen, Deutschland)

### **3.3.2 Pufferherstellung**

Vor dem Start mit dem Protokoll wurden folgende Pufferlösungen angesetzt.

#### **Permeabilisierungspuffer**

20 % DMSO + 1 % Triton-X 100 + 2,3 g Glycin/100 ml in PBS.

#### **Bleichpuffer**

5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 5 % DMSO in 100 % Ethanol.

#### **Blockpuffer**

0,1 % Saponin + 0,1 % Triton-X 100 + 0,02 % NaN<sub>3</sub> + 5 % normal goat serum in PBS.

#### **Waschpuffer**

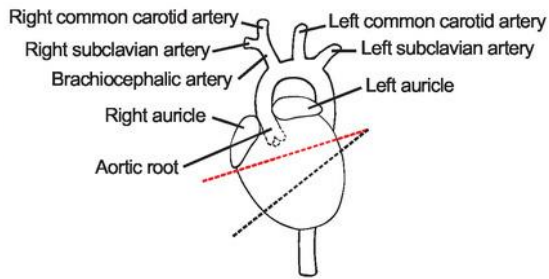
0,1 % Saponin + 0,1 % Triton-X 100 + 0,02 % NaN<sub>3</sub> in PBS.

### **3.3.3 Durchführung**

Die folgenden Schritte wurden in lichtgeschützten Verhältnissen durchgeführt, entweder durch Umwicklung in Alufolie oder Lagerung in lichtundurchlässigen Röhrchen. Die Schüttelplattform wurde bei Nutzung auf 2 rpm (revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute) eingestellt.

Die Proben wurden am Tag der Entnahme zunächst fixiert, indem sie über Nacht in 15 ml 4 % Formaldehyd in 15 ml-Röhrchen bei 4 °C im Dunkeln auf Schüttelplattform inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Proben dreimal für 1 h in PBS auf Schüttelplattform bei 4 °C im Dunkeln gewaschen.

Nach dem Fixieren und dem Waschen wurden die Herzen mit der ventralen Seite nach oben auf ein Korkbrett oder Styropor gelegt und mit einer Nadel durch die Herzspitze fixiert. Mit einem Skalpell wurden 2/3 des apikalen Teils des Herzens entfernt und verworfen. Schnittrichtung war dabei eine gedachte Linie, welche beide Vorhöfe verbindet (siehe Abbildung 7, rote Linie).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Herzens und der Aorta.

Die gepunktete Linie in Rot zeigt die angestrebte Schnittebene an (Centa et al., 2019).

Die verbliebenen Probenteile wurden in 5 ml-Eppendorf-Röhrchen mit dem Permeabilisierungspuffer für 5 Tage bei Raumtemperatur (RT) auf der Schüttelplattform permeabilisiert.

Es folgte eine Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (EtOH):

- 50 % EtOH für 4 h bei RT auf Schüttelplattform.
- 70 % EtOH für 4 h bei RT auf Schüttelplattform.
- 100 % EtOH für 4 h bei RT auf Schüttelplattform.

Darauf folgte das Bleichen für 4 h in frisch zubereiteter, vorgekühlter Bleichlösung bei 4 °C.

Hierfür wurden 15 ml-Röhrchen verwendet, mit 10 ml Bleichlösung befüllt und im Stehen inkubiert.

An dieser Stelle wurden die Proben wieder in 5 ml-Eppendorf-Röhrchen nach der folgenden Rehydratationsreihe rehydriert:

- 70 % EtOH für 4 h bei RT auf Schüttelplattform.
- 50 % EtOH für 4 h bei RT auf Schüttelplattform.

Anschließend wurde eine Proteinblockade durchgeführt, indem man die Proben in 5 ml-Eppendorf-Röhrchen in einer Blocklösung für 6 h bei 37 °C auf Schüttelplattform inkubierte.

Im folgenden Schritt wurde eine Mischung aus CD31-Antikörper (zur Endothelmarkierung) und BOBO-3 (zur DNA-Markierung) in Blocklösung mit der Verdünnung der Reihe nach 1/100 und 1/0,0025 angesetzt.

Die Antikörperfärbung erfolgte in 1,5 ml-(low Protein binding)-Eppendorf-Röhrchen für 5 Tage bei 37 °C auf Schüttelplattform.



Die nicht gebundenen Antikörper wurden in 5 ml-Eppendorf-Röhrchen mit dem Waschpuffer wie folgt gewaschen:

- 1 h auf Schüttelplattform bei RT.
- 2 h auf Schüttelplattform bei RT.
- Übernacht auf Schüttelplattform bei RT.

Abschließende Dehydrierung der Proben in 5 ml-Eppendorf-Röhrchen erfolgte wie folgt:

- 50 % EtOH für 12 h bei RT auf Schüttelplattform.
- 70 % EtOH für 12 h bei RT auf Schüttelplattform.
- 100 % EtOH für 12 h bei RT auf Schüttelplattform.
- 100 % EtOH für 12 h bei RT auf Schüttelplattform.

Zuletzt wurden die Proben für 4 h in 5 ml ECI (Ethylcinnamat) bei RT transparent gemacht.

Die Proben wurden in einem mit ECI befüllten Glasbehälter bis zur bildlichen Aufnahme aufbewahrt.



**Abbildung 8:** Herzbasis nach der Zubereitung.

### **3.3.4 Bildakquisition und -auswertung**

Die bildliche Aufnahme der Proben erfolgte in den Laborräumen von IMCES (Imaging Center Essen) mittels eines Lichtblattmikroskops (Lightsheet Ultra Blaze).

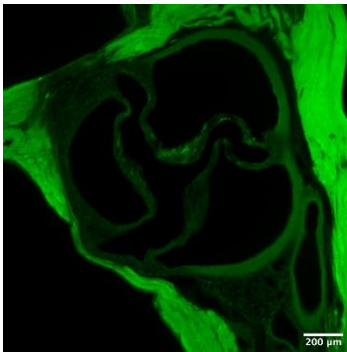
Die transparenten Proben wurden mit einer dünnen Lichtplatte beleuchtet und auf einer hochauflösenden sCMOS-Kamera orthogonal zur Beleuchtung abgebildet.

Die Proben wurden während der Aufnahme in eine mit ECI befüllte Kammer eingetaucht. Die Aortenwurzel mit der Aortenklappe wurde über 600  $\mu\text{m}$  in 10  $\mu\text{m}$ -Takt mit jeweils 3 Momentaufnahmen (abhängig vom Exzitationsbereich der Fluorochrome) in 4-facher Vergrößerung visualisiert. Eine Aufnahme für die Autofluoreszenz des Gewebes, eine für die Fluoreszenz des CD31- Antikörpers zur

Endothelmarkierung und eine weitere für die Fluoreszenz von BOBO-3 zur DNA-Markierung. Es wurden 180 Bilder pro Herz gemacht.

Die generierten Bilder wurden mithilfe von IMARIS 9.6 (Oxford Instruments, Abingdon, England) in 3D-Rekonstruktionen der Aortenklappe umgewandelt. IMARIS ist ein 3/4D Bildvisualisierungs- und Analysesoftware, das dem Nutzer eine große Anzahl an Möglichkeiten bei der Auswertung der Daten bietet.

Für die Berechnung des Klappenvolumens wurde eine Oberfläche erzeugt, indem manuell der innere und der äußere Rand der Klappe begrenzt wurden. Dieser Vorgang wurde alle 10  $\mu\text{m}$  über die gesamte Klappe hinweg wiederholt. Anschließend wurde das absolute Volumen der Klappe durch einen Interpolationsalgorithmus der Software berechnet.



**Abbildung 9:** LSFM-Aufnahme einer Aortenklappe.

### 3.4 Histologie

Dieselben Proben, die mittels LSFM analysiert wurden, wurden nachfolgend auch konventionell histologisch verarbeitet. Hierfür mussten wir die Proben in einen histologisch prozessierbaren Zustand versetzen. Da ECI bzw. Ethyleinnamat durch Ethanol herausgewaschen werden kann, wurden die Proben nach der Aufnahme mit dem Lichtblatmikroskop gemäß dem folgenden Schema behandelt:

- Herzen in 100 % Ethanol für 2x 4 h auf Schüttelplattform bei RT geben.
- Herzen in 70 % Ethanol über Nacht auf Schüttelplattform bei RT geben.

Durch diese Maßnahme wurde ECI entfernt und die Proben wurden rehydriert, was eine Voraussetzung für den Beginn der histologischen Prozessierung darstellt. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet. Der Prozess erfolgte automatisiert im Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen nach folgendem Protokoll.

- 10 % neutrales gepuffertes Formalin für 1 Stunde bei 42 °C.
- 10 % neutrales gepuffertes Formalin für 1 Stunde bei 42 °C.
- 70 % Ethanol für 30 min bei 40 °C.
- 85 % Ethanol für 30 min bei 40 °C.
- 100 % Ethanol für 45 min bei 40 °C.
- 100 % Ethanol für 45 min bei 40 °C.
- 100 % Ethanol für 45 min bei 40 °C.
- Xylol für 1 Stunde bei 40 °C.
- Xylol für 1 Stunde bei 40 °C.
- Xylol für 1 Stunde bei 40 °C.
- Paraffinwachs für 45 min bei 63 °C.
- Paraffinwachs für 45 min bei 63 °C.
- Paraffinwachs für 45 min bei 63 °C.
- Paraffinwachs für 45 min bei 63 °C

Nach der Verarbeitung wurden die Proben in beschriftete Paraffin-Kassetten eingebettet und in diesem Zustand bei Raumtemperatur verwahrt. Die Paraffinblöcke mit den Proben wurden am Mikrotom im histologischen Labor der CSL (CardioScienceLabs) geschnitten. Es wurden 5 µm dicke Schnitte der Aortenwurzel bzw. der Aortenklappe

über eine Gesamtlänge von 600 µm erstellt, um alle Taschenanteile der Aortenklappe untersuchen zu können. Der Startpunkt der Schnittübertragung auf die Objektträger wurde auf 90 µm Entfernung von unserem hypothetischen Nullpunkt festgelegt. Der Nullpunkt definiert die Ersterscheinung einer der drei Klappentaschen. Der Bereich von 0-90 µm dient der Ausrichtung des Paraffinblockes, sodass alle Taschen der Klappe, so gut wie möglich, in die Schnittebene zu liegen kommen. Die Paraffinschnitte wurden im Anschluss in diesem Zustand bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.4.1 Masson-Trichrom-Färbung**

Die Masson-Trichrom-Färbung (MT) ist eine mikroskopische Färbemethode, bei der die Dispersität (Farbstoffmolekülgröße) von ausschlaggebender Bedeutung für die Färbung ist. Die MT-Färbung zählt zu den Standardfärbungen in der Histologie und ermöglicht eine umfassende Darstellung der Gewebestrukturen (Lang, 2013a, S. 205-208). Diese Färbemethode wurde ausgewählt, da man anhand dessen sowohl die Kollagenfasern quantifizieren kann als auch die Zelldichte in der Aortenklappe bestimmen kann. Dies gibt einen Aufschluss über dem Ausmaß der Fibrosierung bzw. der Zellularität in der Klappe, welche wichtige Parameter im Rahmen der histologischen Beurteilung einer Aortenklappenstenose darstellen.

Von jeder Herzprobe wurden 6 Schnitte in 100 µm Abstand gefärbt, ausgehend vom 100 µm-Punkt bis zum 600 µm-Punkt (gemäß dem bereits erklärten Schema), sodass alle Anteile der Klappentaschen über den gesamten Verlauf dargestellt werden konnten.

#### **3.4.1.1 Materialien**

- Ethanol (70 %, 95 %, 100 %) (Walter CMP, Kiel, Deutschland)
- Xylol (Formafix, Düsseldorf, Deutschland)
- Hämatoxylin Lösung A nach Weigert (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Hämatoxylin Lösung B nach Weigert (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Xylidin Ponceau 2R (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Molybdätdiphosphorsäure Hydrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Lichtgrün SF (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Säurefuchsin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- ddH<sub>2</sub>O (doppelt destilliertes Wasser)

- 100 % Essigsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Bouinsche Lösung (MORPHISTO, Offenbach am Main, Deutschland)
- Färbeküvetten nach Hellendahl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Cytoseal Tm XYL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Deckgläser (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- ZEISS Axio Observer Z1 (Apotome) (ZEISS, Oberkochen, Deutschland)

### **3.4.1.2 Lösungsherstellung**

Vor Beginn der Färbeprozedur wurden 4 Lösungen frisch angesetzt.

Für 100 ml jeder der unten genannten Lösungen werden nachfolgende Substanzen benötigt:

#### **Lösung A**

Säurefucsin	0,5 g
Xylidin Ponceau 2R	0,5 g
100% Essigsäure	1 ml
ddH <sub>2</sub> o (doppelt destilliertes Wasser)	99 ml

#### **Lösung B**

Molybdatphosphorsäure Hydrat	1 g
ddH <sub>2</sub> o (doppelt destilliertes Wasser)	100 ml

#### **Lösung C**

Lichtgrün SF	2 g
ddH <sub>2</sub> o (doppelt destilliertes Wasser)	98 ml
100% Essigsäure	2 ml

#### **Eisenhematoxylin nach Weigert**

Hämatoxylin Lösung A nach Weigert	50 ml
Hämatoxylin Lösung B nach Weigert	50 ml

### **3.4.1.3 Durchführung**

Die Schnitte wurden zunächst für 20 min im vorgeheizten Ofen bei 60 °C entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in 3x Xylol für 5 min, 2x 100 % Ethanol für 5 min, 2x 95 % Ethanol für 3 min, 1x 70 % Ethanol und 1x ddH<sub>2</sub>O für 5 min eingetaucht. Im Anschluss wurden die Proben in der Bouinschen Lösung für 1 h bei 56 °C im Wasserbad refixiert. Dieser Schritt ist wichtig, um eine intensive Färbung der Gewebestrukturen zu ermöglichen. Außerdem verbessert sich dadurch der Kontrast zwischen den Gewebebestandteilen und die Wahrscheinlichkeit von Bleichartefakten wird reduziert. Als nächstes wurden die Schnitte unter fließendes Leitungswasser für 5 min gestellt, um die gelbliche Färbung der Bouinschen Lösung zu entfernen.

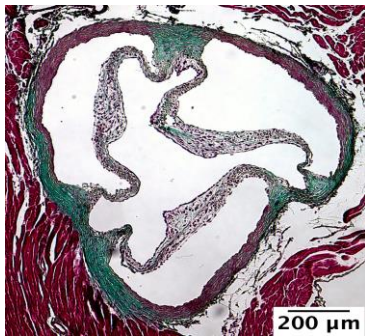
Der Rest des Protokolls bestand aus den folgenden Schritten:

- 10 min in Eisenhematoxylin nach Weigert geben.
- 2-3 min gut im Leitungswasser waschen.
- 10-mal in destilliertes Wasser eintauchen.
- 10 Minuten in Lösung A geben.
- 10-mal in destilliertes Wasser eintauchen.
- 5 Minuten in Lösung B geben.
- 10-mal in destilliertes Wasser eintauchen.
- 10 Minuten in Lösung C geben.
- 10-mal in destilliertes Wasser eintauchen.
- Dehydrieren mit Ethanol (70 % 1 min, 95 % 2 min, 100 % 2 min).
- 2 min in Xylol geben.
- 3 Tropfen eines harzigen Xylol-haltigen Eindeckmediums (Cytoseal) auf den Objektträger geben und ein Deckglas vorsichtig darauf montieren.

### **3.4.1.4 Bildakquisition und -auswertung**

Die bildliche Aufnahme der Schnitte erfolgte mittels Zeiss Apotome (Lichtmikroskop) in den Laborräumen von IMCES (Imaging Center Essen) in 5-facher Vergrößerung. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Bildanalyseprogramms Fiji (ImageJ Software). Wobei wir zunächst den Fokus auf die Fläche bzw. die Dicke der Klappe über den gesamten Verlauf von 600 µm gelegt haben. Darüber hinaus konnten wir mit Fiji den

Anteil der Kollagenfasern in der Klappe bestimmen. Ebenso wurde die Zellkernzahl in der Aortenklappe mit dem Programm bestimmt.



**Abbildung 10:** Masson-Trichrom-Färbung einer stenosierten Aortenklappe.

### 3.4.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode, die es ermöglicht, spezifische Zellstrukturen präzise zu detektieren, indem spezifische Antikörper und Markermoleküle verwendet werden. Das Prinzip der Nachweisreaktion basiert auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft, dem sogenannten Epitop. Es wird dadurch eine sogenannte Antigen-Antikörper-Reaktion ausgelöst (Lang, 2013b, S. 270).

Es wurde eine chromogenbasierte indirekte Nachweismethode, die sogenannte labelled avidin-biotin-technique (LAB), verwendet. Das Prinzip beruht auf der starken Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin (Lang, 2013b, S. 277).

Die Reaktion läuft wie folgt ab: Primärantikörper + biotinylierter Sekundärantikörper + Avidin-Biotin-Enzym-Komplex + Substrat → Farbstoff.

So erfolgte der Nachweis von CD68 im Klappengewebe, einem auf Oberfläche der Makrophagen liegenden Strukturprotein.

Von jeder Probe wurden 3 Schnitte in den Abständen 200, 400 und 500 µm, ausgehend vom Nullpunkt, gefärbt (gemäß dem bereits erklärten Schema im Absatz 3.4). Diese Abstände wurden ausgewählt, da sie die größte Klappenfläche im Verlauf demonstrieren und somit kann ein valider Vergleich zwischen den Herzproben erreicht werden.

### 3.4.2.1 Materialien

- Ethanol (70 %, 95 %, 100 %) (Walter CMP, Kiel, Deutschland)
- Xylol (Formafix, Düsseldorf, Deutschland)
- ddH<sub>2</sub>o (doppelt destilliertes Wasser)
- Ziegenserum (Normal Goat Serum) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tween 20 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- PBS (phosphate-buffered saline) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Hämatoxylin nach Mayer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- EDTA-Pulver  $\geq 98.5$  % (ethylenediaminetetraacetic acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- DAB Substrate Kit (3,3'-diaminodbenzidine) (Abcam, Cambridge, England)
- Avidin/Biotin Blocking Kit (Abcam, Cambridge, England)
- CD68-Biotin FA-11 (monoklonaler Primärantikörper), Ratte, anti-Maus (Bio-rad, Düsseldorf, Deutschland)
- Peroxidase-konjugierter Antikörper (monoklonaler Sekundärantikörper), Maus, anti-Biotin (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, England)
- Glas- und Polypropylen-küvetten (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Cytoseal Tm XYL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Deckgläser (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- ZEISS Axio Observer Z1 (Apotome) (ZEISS, Oberkochen, Deutschland)

### 3.4.2.2 Pufferherstellung

#### Waschpuffer PBS-T

0,05 % Tween 20 in PBS.

#### Blockpuffer

5 % normal goat serum + 0,1 % Triton X-100 in PBS.



### **Antigendemaskierungspuffer (antigen retrieval buffer), EDTA-Puffer**

0,00037 % EDTA in ddH<sub>2</sub>O.

#### **3.4.2.3 Durchführung**

Die Schnitte wurden zunächst für 20 min im vorgeheizten Ofen bei 60 °C entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in 3x Xylol für 5 min, 2x 100 % Ethanol für 5 min, 2x 95 % Ethanol für 3 min, 1x 70 % Ethanol und 1x ddH<sub>2</sub>O für 5 min eingetaucht.

Als nächstes wurde eine Hitze-induzierte Antigendemaskierung durchgeführt, um auch Antigene bzw. Epitope, die durch die Formalinfixierung und Paraffineinbettung blockiert wurden, für die entsprechenden Antikörper detektierbar zu machen. Die Antigenblockade ist durch eine Quervernetzung (Maskierung) der Proteine bedingt. Durch sogenannte Retrieval-Lösungen werden die Quervernetzungen aufgebrochen und die Antigene zugänglich gemacht.

Hierfür wurde die EDTA-Lösung in eine Polypropylen-Färbeküvette gegeben und im Wasserbad auf 92-95 °C vorgewärmt. Die Schnitte wurden 30 min in der Lösung inkubiert, anschließend abgekühlt und 3x 5 min in PBS-T gewaschen.

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Die Avidin/Biotin-Blockade wurde mit Avidin/Biotin Blocking Kit für jeweils 15 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurden auf jeden Schnitt 50 µl Blockpuffer hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Primärantikörper (CD68-Biotin) wurde im Verhältnis 1:10 in dem Blockpuffer verdünnt und 50 µl davon wurden auf jeden Schnitt hinzupipettiert. Die Schnitte blieben über Nacht bei 4 °C in diesem Zustand.

Am darauffolgenden Morgen wurde 4x 5 min in PBS-T gewaschen.

Der Sekundärantikörper (Peroxidase-konjugierter anti-Biotin Antikörper) wurde im Verhältnis 1:400 in dem Blockpuffer verdünnt und 50 µl davon wurden hinzugegeben. Die Schnitte wurden 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert und wiederholt (4-mal) 5 min in PBS-T gewaschen. Dann wurden 50 µl DAB-Substrat (Chromogen) pro Schnitt hinzugegeben, die Schnitte 10 min inkubiert und danach 4x 5 min gewaschen.

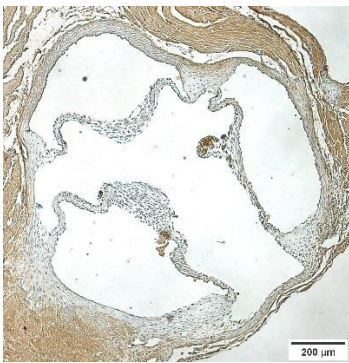
Am Ende waren folgende Schritte zu beachten:

- Für 1 min in Hämatoxylin nach Mayer eine Kerngegenfärbung durchführen.
- Schnitte für 10 min mit lauwarmem fließendem Leitungswasser waschen und 3-mal in ddH<sub>2</sub>O eintauchen.
- Dehydrieren mit Ethanol (70 % 1 min, 95 % 2 min, 100 % 2 min).
- 2 min in Xylol geben.
- 3 Tropfen eines harzigen Xylol-haltigen Eindeckmediums (Cytoseal) auf den Objektträger geben und ein Deckglas vorsichtig darauf montieren.

#### **3.4.2.4 Bildakquisition und -auswertung**

Die bildliche Aufnahme der Schnitte erfolgte mittels Zeiss Apotome (Lichtmikroskop) in den Laborräumen von IMCES (Imaging Center Essen) in 5-facher Vergrößerung.

Die Auswertung erfolgte analog zu den Masson-Trichrom-gefärbten Bildern mithilfe des Bildanalyseprogramms Fiji (ImageJ Software). Wobei wir mit dem Programm die DAB-positiven Zellen bzw. die Makrophagen in der Aortenklappe identifizieren und quantifizieren konnten.



**Abbildung 11:** CD68-Färbung einer Aortenklappe.

### **3.5 Durchflusszytometrie**

Die Analyse der zirkulierenden Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Neben Aussagen zur Zellgröße und Zellgranularität, können mit zellspezifischen Farbstoffen wie z.B. DNA-Farbstoffen oder antigenspezifischen Fluorochrom-Antikörper-Konjugaten oberflächliche und intrazelluläre Strukturen gefärbt werden. Im Durchflusszytometer werden die Zellen dann hydrodynamisch in einer Küvette

fokussiert und durch einen Laserstrahl geleitet, der die Fluorochrome anregt. Diese emittieren daraufhin eine sehr geringe Menge an Fluoreszenzlicht, welche dann detektiert werden kann. Als Ergebnis entsteht für jede Zelle ein phänotypischer Fingerabdruck, welcher durch die gefärbten Marker erzeugt wird. (Giesecke and Kaiser, 2017).

In dieser Arbeit erfolgten durchflusszytometrische Untersuchungen auf Immunzellen, die aus dem Blut gewonnen wurden.

### **3.5.1 Materialien**

- PBS (phosphate-buffered saline) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- 15 ml-Röhrchen (StonyLab, New York, USA)
- Zombie Aqua (Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit) (BioLegend, San Diego, USA)
- Fc-Block-Lösung (TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32) Antibody) (BioLegend, San Diego, USA)
- EDTA 0,5 mol/l (ethylenediaminetetraacetic acid) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- 96-well-Platten (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- FACS-Röhrchen (MIDSCI, Valley Park, USA)
- BD CellFIX (BD Biosciences™ CellFIX™) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Counting Beads (CountBright Plus Absolute Counting Beads) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- RBC-Lysepuffer (Red blood cell lysis buffer) (BioLegend, San Diego, USA)
- Antikörper (anti-Maus, gebunden an Fluorochromen) (BV 605 CD11b, FITC CD4, PerCP/Cyanine5.5 Gr1, PE CD115, PE/Cy7 B220, AF700 CD8) (BioLegend, San Diego, USA)
- BSA (bovines Serumalbumin)  $\geq 96$  % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Zentrifuge (Centrifuge 5920 R) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- BD FACSAria III (Durchflusszytometer) (BD Biosciences, Bedford, USA)

### **3.5.2 Pufferherstellung**

#### **FACS-Puffer**

0,5 % BSA + 2 mM EDTA in PBS, 498 ml PBS + 2 ml 0,5 mol/l EDTA + 2,5 g BSA = 500 ml FACS-Puffer.

#### **Fc-Block-Arbeitslösung**

2 % Fc-Block-Stammlösung in PBS.

#### **Zombie-aqua-Arbeitslösung**

0,1 % Zombie Aqua-Stammlösung in PBS.

#### **Antikörper-Mastermix**

Der Mastermix wurde aus FACS-Puffer und den zur Zellmarkierung benötigten Antikörpern hergestellt, wobei die folgenden Antikörperkonzentrationen vorlagen:

CD11b: 2,5 µg/ml, CD4: 2,5 µg/ml, GR1: 5 µg/ml, CD115: 2,5 µg/ml, B220: 2,5 µg/ml, CD8a: 5 µg/ml.

### **3.5.3 Durchführung**

Es wurden pro Maus 100 µl des entnommenen Blutes in ein 15 ml-Röhrchen gegeben. Anschließend wurden 2 ml RBC-Lysepuffer hinzugegeben und für 5 min bei RT inkubiert, wobei die Röhrchen regelmäßig geschwenkt wurden, um zu verhindern, dass sich Koagulate bilden. Als nächstes wurden 10 ml PBS hinzugegeben, dann wurde bei 400 g und 4 °C für 4 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig aspiriert. Falls das Pellet noch viele rote Blutzellen enthielt, konnte erneut mit 2 ml RBC-Lysepuffer für 3 min bei RT lysiert werden. Es wurde an dieser Stelle eine Poolprobe für FMO (fluorescence minus one)-Kontrollen erstellt, die für die Kompensation partieller Überlappungen zwischen den Spektren am Durchflusszytometer verwendet wurden. Als nächstes wurden 25 µl Fc-Blockpuffer zu jeder Probe hinzugegeben und für 10 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Darauf folgte eine Gabe von 25 µl Zombie-aqua-Arbeitslösung und 25 µl Antikörper-Mastermix und eine Inkubation für 30 min im Dunkeln bei 4 °C. Anschließend wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Hinzugabe von 3 ml FACS-Puffer, Zentrifugation bei 400 g und 4 °C für 4 min
- Aspiration des Überstandes
- Resuspension in 200 µl FACS-Puffer bei Messung am gleichen Tag.
- Bei Messung am nächsten Tag Fixation in 200 µl BD CellFIX, weitere Prozessierung wie folgt:
  - Inkubation für 1h bei 4 °C.
  - Zentrifugation für 5 min bei 300 g und 4 °C und Verwerfen des Überstandes
  - Hinzugabe von 200 µl FACS-Puffer und Zentrifugation für 5 min bei 300 g und 4 °C.
  - Resuspension in FACS-Puffer und Lagerung bei 4 °C im Dunklen bis zum nächsten Tag.
- Hinzugabe von 50 µl Counting-Beads-lösung und Mischung vor Anwendung für 30 – 45 s.
- Filtern der Probe unmittelbar vor Messung mit einem 35 µm-Filter

### **3.5.4 Messung und Auswertung**

Die Messung der vorbereiteten Proben erfolgte nach durchgeführter Kompensation mittels BD FACSAria III (Durchflusszytometer) in den Laborräumen von IMCES (Imaging Center Essen).

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels BD FACSDiva™ Software in den Laborräumen von IMCES (Imaging Center Essen).

### **3.6 Zytokinanalyse**

Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren sind Proteine, die als extrazelluläre Signalmoleküle in der Kommunikation zwischen den Zellen fungieren und zu Analyse und Verständnis von inflammatorischen Prozessen grundlegend sind (Commins et al., 2010).

In dieser Arbeit wurde mit dem Blutplasma der untersuchten Mäuse ein Zytokin-Assay durchgeführt, um relevante Unterschiede des Zytokinmilieus festzustellen. Für diesen Zweck wurde das Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array (ARY028) von R&D Systems-Biotechnie verwendet. Das Mouse XL Cytokine Array Kit ist ein Sandwich-

Immunoassay auf Membranbasis. Es ist ein schnelles, sensitives und ökonomisches Werkzeug, das dem Nutzer semiquantitative Bestimmungen der Zytokine ermöglicht. Die relativen Expressionslevels von 111 löslichen Mausproteinen konnten damit ohne die Verwendung zahlreicher Immunoassays bestimmt werden. Es sind Kontroll- und Einfangantikörper in Duplikaten auf Nitrocellulosemembranen angebracht.

### **3.6.1 Materialien**

- 50 ml-Röhrchen (StonyLab, New York, USA)
- Schüttelplattform (Orbital Shaker, SHK-O210) (Bioevopeak, Shandong, China)
- Zentrifuge (Centrifuge 5920 R) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array (ARY028) (R&D Systems-Bio-  
techne, Wiesbaden, Deutschland)
- Röntgenfilme (Kodak® BioMax™ Light-1) (Avantor VWR, Radnor, USA)
- Amersham 600 Imager (GE Healthcare, Chicago, USA)

### **3.6.2 Durchführung**

Aus den untersuchten Gruppen wurden Plasma-Pool-Proben, jeweils eine Probe pro Gruppe, generiert. Die Plasmaproben wurden mit Array-Puffern verdünnt und über Nacht mit den Membranen vom Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array inkubiert (pro Probe wurden 200 µl verwendet). Die enthaltenen Antikörper banden spezifische Zielproteine in der Probe. Die Membran wurde im Anschluss mit Array-Waschpuffer gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen, gefolgt von einer Inkubation mit einem Cocktail aus biotinylierten Detektionsantikörpern, die die Zielproteine ebenso spezifisch banden. Anschließend wurden Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase)- und Chemilumineszenz-Detektionsreagenzien aufgetragen. An jedem Fangpunkt wurde ein Signal erzeugt, dessen Intensität mit der Menge des gebundenen Proteins korrespondiert. Aus jeder Membran wurde ein Röntgenfilm entwickelt. Es sei auf das Datenblatt des oben genannten Produktes verwiesen, um Genaueres über die einzelnen Schritte der Prozedur zu erfahren.

### 3.6.3 Aufnahme und Auswertung

Pixeldichten auf dem entwickelten Röntgenfilm konnten mit einem Transmissionsscanner und einer Bildanalysesoftware Fiji (ImageJ Software) gesammelt und analysiert werden. Die entsprechenden Signale auf verschiedenen Arrays wurden miteinander verglichen, um relative Plasmaspiegelunterschiede zwischen den Proben nachzuweisen.



**Abbildung 12:** Zytokin-Array vom Pool-Plasma aus Mäusen mit stenosierter Aortenklappe.

### 3.7 Statistische und graphische Auswertung

Alle Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel von Windows® erfasst. Nach Verschlüsselung erfolgte die Datenanalyse. Die statistische Auswertung und die grafische Analyse erfolgten mit dem Statistik-Programm GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, USA). Wesentliche Parameter wurden mithilfe von deskriptiven statistischen Methoden analysiert und deren arithmetischer Mittelwert sowie Standardabweichung für die jeweiligen Proben errechnet. Alle Werte im Ergebnissteil mit Ausnahme der Zytokin-Analyse werden als Mittelwert  $\pm$  SD (standard deviation, Standardabweichung) dargestellt. Der D'Agostino-Pearson-Test wurde angewandt, um eine Normalverteilung zu überprüfen. Bei 2 Vergleichsgruppen wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt, bei 3 Vergleichsgruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test zur Überprüfung signifikanter Unterschiede benutzt. Im Frühphasenmodell erfolgte die statistische Auswertung mit 4 Mäusen pro Gruppe in der echokardiografischen und durchflusszytometrischen Analyse. Für die Zytokin-Analyse wurden 5 Mäuse pro Gruppe in der Spätphase und 4 Mäuse pro Gruppe in der Frühphase zur Herstellung gepoolter Plasmaproben zusammengeführt. Im Spätphasenmodell erfolgte die statistische Auswertung wie folgt. Für die echokardiografische und durchflusszytometrische Analyse wurden 10 Kontrollmäuse herangezogen, während 5 Kontrollmäuse für die histologische und

lichtblattnmikroskopische Analyse herangezogen wurden. Außerdem beinhaltete die statistische Auswertung der oben genannten Analysen 6 Mäuse der no AVS-Gruppe und 5 Mäuse der AVS-Gruppe. Die Ergebnisse wurden bei  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

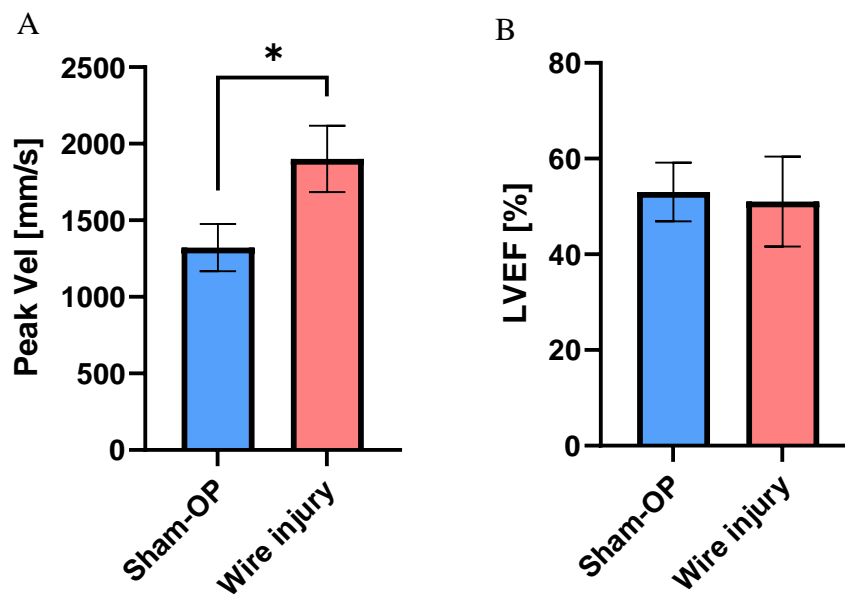


## 4. Ergebnisse

### 4.1 Veränderungen in der Frühphase nach Schädigung der Aortenklappe

#### 4.1.1 Akute echokardiografische Veränderungen des Herzens

Es zeigte sich bereits 1 Woche nach der Operation ein Anstieg der Spitzengeschwindigkeit des Blutflusses durch die Aortenklappe in der Wire injury-Gruppe ( $1901,6 \pm 216,9$  mm/s) verglichen mit der Sham-OP-Gruppe ( $1321,9 \pm 154,8$  mm/s,  $p = 0,03$ ), was in unserem Modell das Vorhandensein einer Stenose belegt. Die Ejektionsfraktion als Parameter der linksventrikulären Funktion war vollkommen erhalten und zeigte in der Frühphase keine nennenswerte Reduktion (Wire injury:  $51,0 \pm 9,4$  %, Sham-OP:  $53,1 \pm 6,1$  %,  $p = 0,89$ ) (Abb. 13 A-B).



**Abbildung 13:** Darstellung der echokardiografischen Messungen 1 Woche nach der Operation.

Spitzengeschwindigkeit (Peak Velocity, Peak Vel) (A), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) (B). Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar. \*  $P < 0,05$  statistisch signifikanter Unterschied,  $n = 4$  pro Gruppe.

#### 4.1.2 Akute zelluläre und humorale Immunantwort

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der peripheren Immunzellen im Blut zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 2, Abb. 14 A-B). Trotzdem fand sich eine tendenzielle Erhöhung der B-Zellen in der Wire injury-Gruppe verglichen mit der Sham-OP-Gruppe am Tag 1 und 3 nach der Verletzung, während am Tag 7 der Anteil der B-Zellen zurückging und in beiden Gruppen vergleichbar war. Die Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen schienen am ersten Tag erhöht in der Wire injury-Gruppe, am Tag 3 und 7 kam es zu einem gleichsamem Anstieg in beiden Gruppen. Die klassischen (CD115<sup>+</sup> GR1-high, M1) und nichtklassischen Monozyten (CD115<sup>+</sup> GR1-low, M2) schienen leicht erhöht in der Wire injury-Gruppe am Tag 1 und 3, am Tag 7 stieg der Anteil in der Sham-OP-Gruppe und übertraf die Wire injury-Gruppe. Die neutrophilen Granulozyten hingegen waren im Trend am Tag 1 und 3 nach der Schädigung in der Wire injury-Gruppe niedriger als in den kontrolloperierten Mäusen (Sham-OP). Am Tag 7 war ein Anstieg bei den Mäusen mit Schädigung zu beobachten, während bei den Kontrolloperierten eine Stagnation beobachtet wurde, wobei die Werte sich wieder angleichen.

**Tabelle 2:** Durchflusszytometrische Ergebnisse der peripheren Blutzellen 1, 3 und 7 Tage nach der Operation.

Die Daten sind in der Darstellung "Mittelwert ± Standardabweichung" mit den entsprechenden P-Werten präsentiert.

##### B-Zellen

TAG	Sham-OP (%)	Wire injury (%)	P-Wert
1	6,2 ± 3,6	13,7 ± 8,0	0,4
3	28,7 ± 6,5	34,2 ± 6,6	0,3
7	30,3 ± 4,9	28,9 ± 7,4	> 0,9

##### CD4<sup>+</sup> T-Zellen

TAG	Sham-OP (%)	Wire injury (%)	P-Wert
1	3,5 ± 2,8	5,3 ± 1,3221	0,6
3	6,7 ± 1,2	7,7 ± 1,2892	0,1
7	11,5 ± 0,2	10,7 ± 1,3579	0,8

### CD8<sup>+</sup> T-Zellen

TAG	Sham-OP (%)	Wire injury (%)	P-Wert
1	3,2 ± 2,2	5,0 ± 1,4	0,4
3	5,7 ± 1,3	6,3 ± 1,0	0,9
7	10,1 ± 1,89	11,4 ± 1,0	0,5

### CD115<sup>+</sup> GR1-high-Monozyten

TAG	Sham-OP (%)	Wire injury (%)	P-Wert
1	2,1 ± 1,2	3,1 ± 2,6	0,9
3	1,6 ± 0,7	3,1 ± 0,6	0,06
7	5,7 ± 2,1	1,0 ± 0,2	0,2

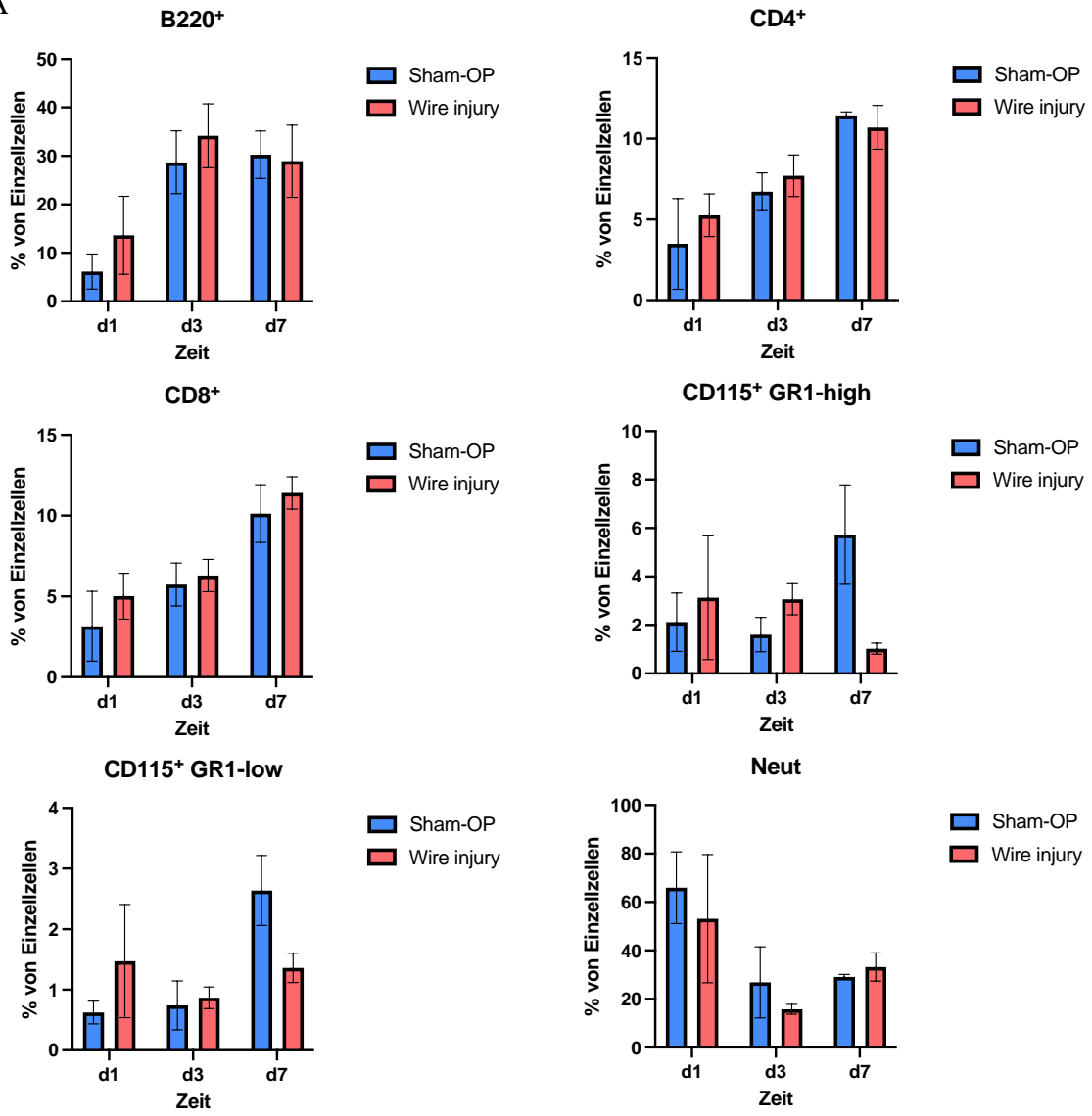
### CD115<sup>+</sup> GR1-low-Monozyten

TAG	Sham-OP (%)	Wire injury (%)	P-Wert
1	0,6 ± 0,2	1,5 ± 0,9	0,4
3	0,7 ± 0,4	0,9 ± 0,2	0,9
7	2,6 ± 0,6	1,4 ± 0,2	0,2

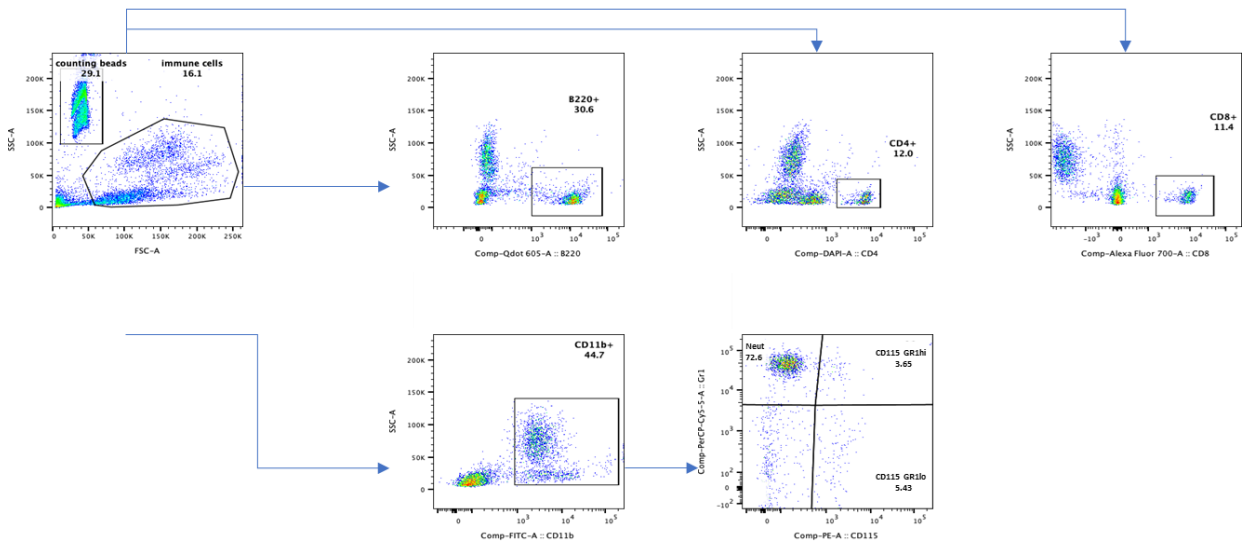
### Neutrophile

TAG	Sham-OP (%)	Wire injury (%)	P-Wert
1	65,9 ± 14,8	53,2 ± 26,4	0,7
3	26,9 ± 14,7	15,8 ± 2,0	0,3
7	29,1 ± 1,0	33,2 ± 5,9	0,8

A



B

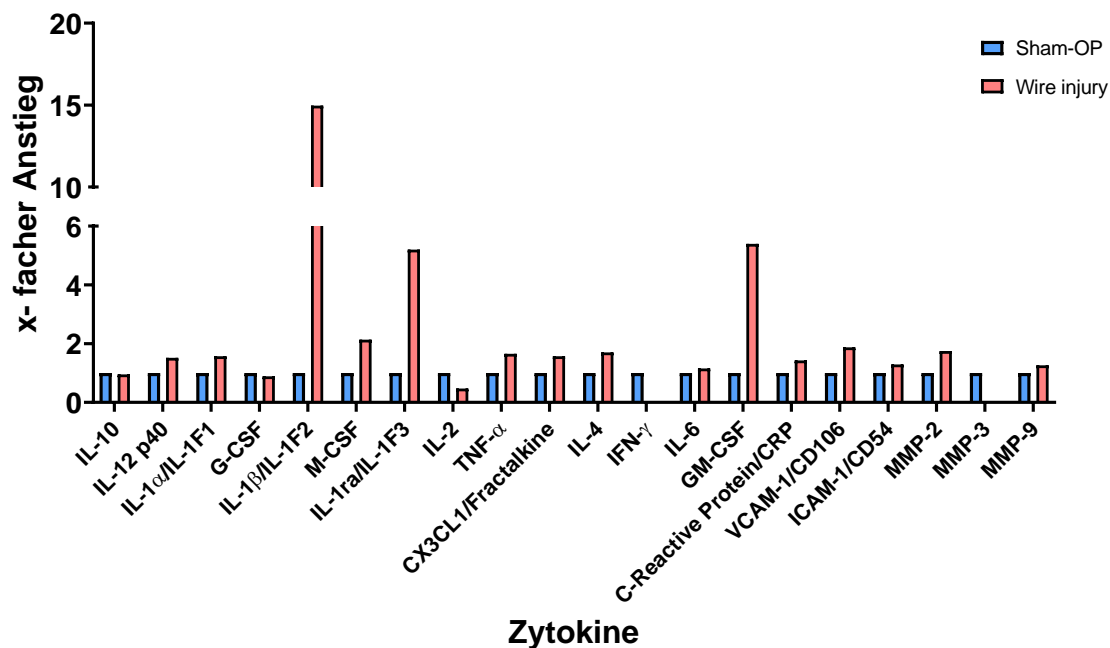


**Abbildung 14:** Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse der peripheren Blutzellen 1, 3 und 7 Tage nach der Operation.

Prozentuelle Anteile der jeweiligen Immunzellgruppen (B220<sup>+</sup> B-Zellen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD115<sup>+</sup> GR1-high-Monozyten (M1), CD115<sup>+</sup> GR1-low-Monozyten (M2), Neutrophilen (Neut)) im peripheren Blut in der Wire Injury- und Sham-OP-Gruppe (A). Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar, n= 4 pro Gruppe. Gating-Hierarchie der durchflusszytometrischen Analyse mit den jeweiligen Immunzellpopulationen (B).

Bei der Untersuchung vom Zytokin-Milieu ließ sich ein Anstieg von einigen proinflammatorischen Zytokinen im Blutplasma 1 Woche nach der Schädigung der Klappe verglichen mit kontrolloperierten Mäusen feststellen. Einen 15-fachen Anstieg zeigte das proinflammatorische Zytokin Interleukin 1 $\beta$ , der koloniestimulierende Faktor GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor) zeigte eine 6-fache relative Erhöhung. Ebenso relativ erhöht war der Spiegel von TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) (1,5-fach), CRP (1,3-fach), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, Gefäßzelladhäsionsmolekül-1) (2-fach), MMP-2 (Matrix-Metalloproteinase-2) (2-fach), Interleukin 4 (1,4-fach) und Interleukin 12 (1,5-fach). Interessanterweise war der Spiegel vom antiinflammatorischen Interleukin-1-Rezeptorantagonisten ebenso deutlich erhöht (5,5-fach).

Die folgende Abbildung zeigt die relativen Plasmaspiegelunterschiede zwischen der Wire Injury- und der Sham-OP-Gruppe (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Darstellung der Zytokin-Analyse aus Pool-Plasma 1 Woche nach der Operation.

Zytokin-Profile der Wire injury- und der Sham-OP-Gruppe normalisiert auf die Sham-OP-gruppe (Referenzgruppe). Pool-Plasma: n= 4 pro Gruppe. IL: Interleukin, G-CSF: Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor, M-CSF: Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor, GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor, TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ . VCAM-1: Gefäßzelladhäsionsmolekül-1, ICAM-1: Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1, MMP: Matrix-Metalloproteasen.

## **4.2 Veränderungen in der Spätphase nach Schädigung der Aortenklappe**

### **4.2.1 Echokardiographische und histologische Veränderungen der Aortenklappe 4 Monate nach Sham-OP oder Drahtschädigung im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren**

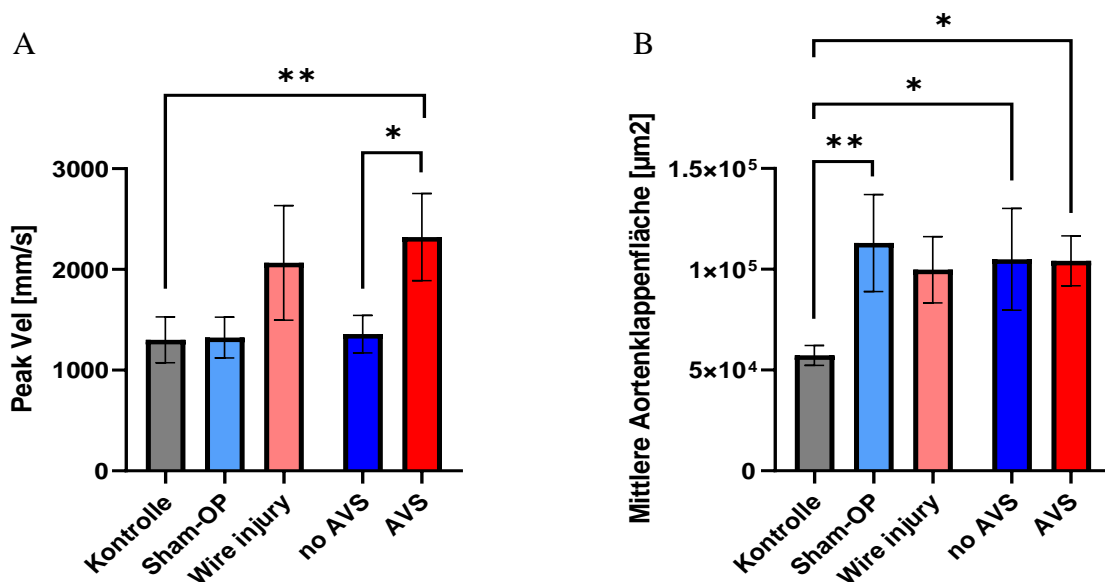
Im Langzeitversuch über 4 Monate überlebten 4 von initial 5 Tieren nach Sham-OP bzw. 7 von 9 Mäusen nach Drahtschädigung (Wire injury) über den gesamten Zeitraum von 4 Monaten. Hierbei zeigte sich bei 5 Mäusen nach Wire injury eine signifikante Zunahme der Flussbeschleunigung über der Aortenklappe, während 2 Mäuse aus der Gruppe mit Drahtschädigung trotz ultraschallkontrollierten technischen Erfolges des Verfahrens keine Flussbeschleunigung durch die Aortenklappe aufwiesen (1562,8 und 1287,5 mm/s), verglichen mit den Kontrollmäusen ( $1302,1 \pm 227,8$  mm/s,  $p > 0,9$ ) und Sham-OP ( $1323,7 \pm 202,6$  mm/s,  $p > 0,9999$ ) (Abb. 16 A).

Dennoch zeigten beide Mäuse nach 4 Monaten in der histologischen Analyse eine ähnliche Verdickung der Aortenklappe ( $81619,1$  und  $107126,0 \mu\text{m}^2$ ) wie die anderen übrigen Mäuse der Wire injury-Gruppe ( $104148,4 \pm 12362,6 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0,9$ ).

Bemerkenswert ist zudem, dass auch die Mäuse der Sham-OP-Gruppe ( $113003,8 \pm 24027,5 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0,9$  vs Wire injury) eine vergleichbare Verdickung der Aortenklappe aufwiesen, wohingegen die völlig unbehandelten Kontrolltiere deutlich dünnere Klappentaschen hatten ( $57265,9 \pm 4938,6 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,03$  vs. Wire injury) (Abb. 16 B).

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der schädigungsbedingten Aortenklappenstenose lag, wurden die Mäuse für eine alternative Analyse neu gruppiert. Die beschriebenen 2 Mäuse der Wire injury-Gruppe ohne Flussbeschleunigung wurden bei offensichtlichem Induktionsversagen der Sham-OP-Gruppe, die ebenso eine Verdickung der Klappe zeigte (jedoch ohne Flussbeschleunigung), zugeordnet.

Die dadurch entstandenen Gruppen sind nachfolgend als „AVS“ (für aortic valve stenosis) und „no AVS“ (für no aortic valve stenosis) in Übereinstimmung mit der bereits erschienenen Publikation bezeichnet. Die Kontrollgruppe blieb unverändert.



**Abbildung 16:** Darstellung von ausgewählten Ergebnissen mit der neuen und der anfänglich geplanten Gruppeneinteilung.

Spitzengeschwindigkeit (Peak Velocity, Peak Vel) (A), durchschnittliche Aortenklappenfläche im Balkendiagramm (B). Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  statistisch signifikanter Unterschied, Kontrolle  $n = 10$ , Sham-OP  $n = 4$ , Wire injury  $n = 7$ , no AVS  $n = 6$ , AVS  $n = 5$ .

#### 4.2.2 Chronische echokardiografische Veränderungen des Herzens bei Mäusen mit (AVS) und ohne (no AVS) schädigungsinduzierte Aortenklappenstenose sowie unbehandelten Kontrollmäusen (Kontrolle)

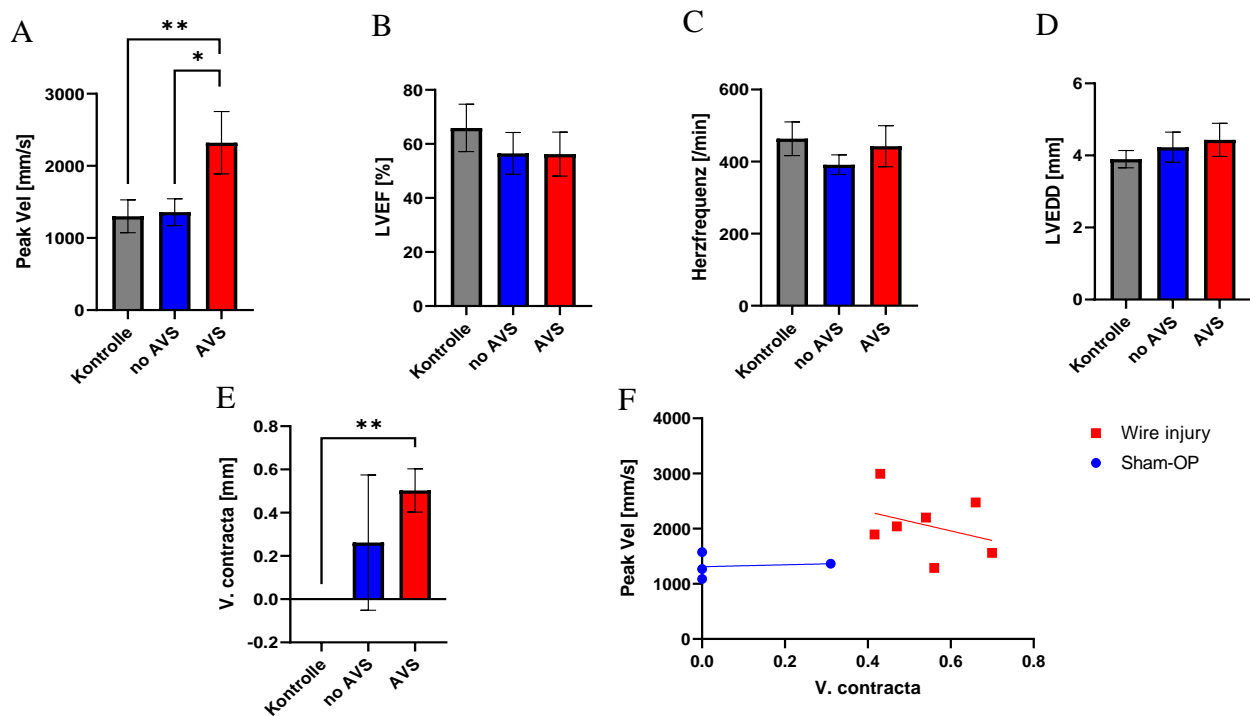
Die Tiere der AVS-Gruppe zeigten in Einklang mit Vorstudien (Artiach et al., 2020, Niepmann et al., 2019, Honda et al. 2014) eine signifikant höhere Spitzengeschwindigkeit des Blutflusses durch die Aortenklappe ( $2321,5 \pm 433,4$  mm/s;  $p = 0,005$  vs Kontrolle,  $p = 0,02$  vs no AVS) als die no AVS-Gruppe ( $1357,5 \pm 187,0$  mm/s) und die unbehandelte Kontrollgruppe ( $1302,1 \pm 227,8$  mm/s) (Abb. 17 A, 18 A).

Es gab keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (AVS  $56,2 \pm 8,1$  % vs. no AVS  $56,5 \pm 7,4$  % vs. Kontrolle  $66,0 \pm 8,8$  %; AVS vs no AVS  $p > 0,9$ , AVS vs Kontrolle  $p = 0,2$ , no AVS vs. Kontrolle  $p = 0,1$ ) und die Herzfrequenz (AVS  $443,0 \pm 57,0$ /min vs. no AVS ( $391,4 \pm 27,1$ /min) vs. Kontrolle ( $463,7 \pm 46,7$ /min) , AVS vs. no AVS  $p = 0,5$  , AVS vs. Kontrolle  $p > 0,9$ ,



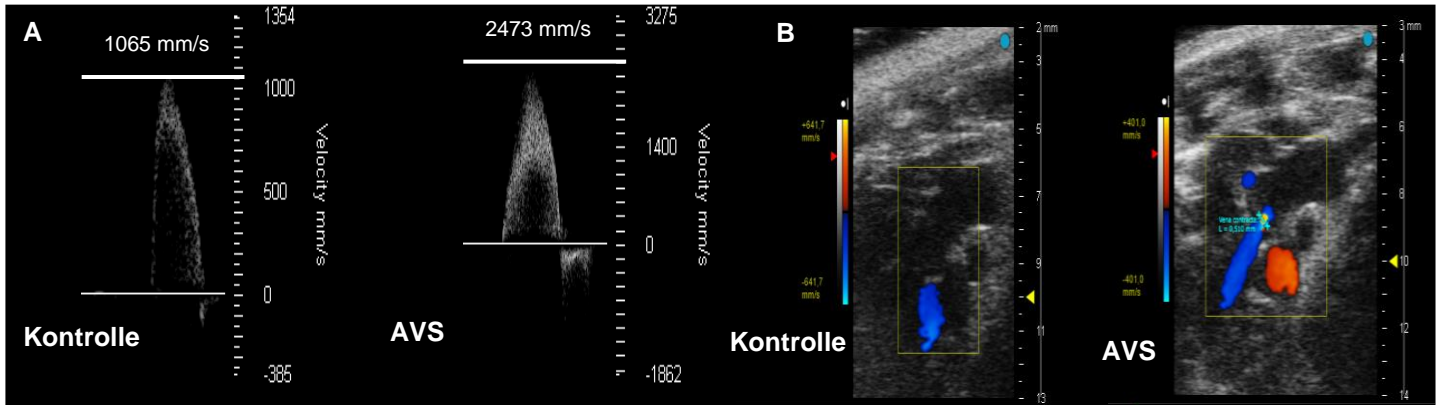
no AVS vs. Kontrolle  $p= 0,05$ ) zwischen den Gruppen (Abb. 17 B&C). Zudem gab es keinen Unterschied im Hinblick auf den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (AVS  $4,4 \pm 0,5$  mm vs. Kontrolle  $3,9 \pm 0,2$  mm vs no AVS ( $4,2 \pm 0,4$  mm; AVS vs. no AVS  $p > 0,9$ , AVS vs. Kontrolle  $p= 0,07$ , no AVS vs. Kontrolle  $p= 0,1$ ) und somit war keine Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion durch die Schädigung der Klappe und die daraus folgende AVS im Langzeitmodell zu verzeichnen (Abb. 17 D).

Darüber hinaus fanden wir einen signifikant erhöhten Wert der Vena contracta der Aortenklappe in der AVS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, was für eine Insuffizienzkomponente der Aortenklappenschädigung spricht (AVS  $0,5 \pm 0,1$  mm, no AVS ( $0,3 \pm 0,3$  mm, Kontrolle nicht nachweisbar; AVS vs. Kontrolle  $p= 0,003$ , AVS vs. no AVS  $p= 0,5$ , no AVS vs. Kontrolle  $p= 0,2$ ) (Abb. 17 E, 18 B). Die Insuffizienzkomponente (V. contracta) war dabei bei den Mäusen mit Schädigungsoperation (Wire injury) vom Aspekt ausgeprägter als in der Sham-OP-Gruppe, auch wenn dieser Unterschied kein Signifikanzniveau erreichte und keine Korrelation mit der Erhöhung der Spitzengeschwindigkeit bestand (Abb. 17 F).



**Abbildung 17:** Darstellung der echokardiografischen Messungen 4 Monate nach der Operation.

Spitzengeschwindigkeit (Peak Velocity, Peak Vel) (A), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) (B), Herzfrequenz (C), linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) (D), Vena contracta (E). Die Balken stellen den Mittelwert ± SD dar. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 statistisch signifikanter Unterschied, Kontrolle n= 10, no AVS n= 6, AVS n= 5. Spearman-Korrelation zwischen Spitzengeschwindigkeit (Peak Vel.) und V. contracta in der Wire injury-Gruppe und der Sham-OP-Gruppe (F), die Gerade wurde mittels linearer Regression ermittelt.



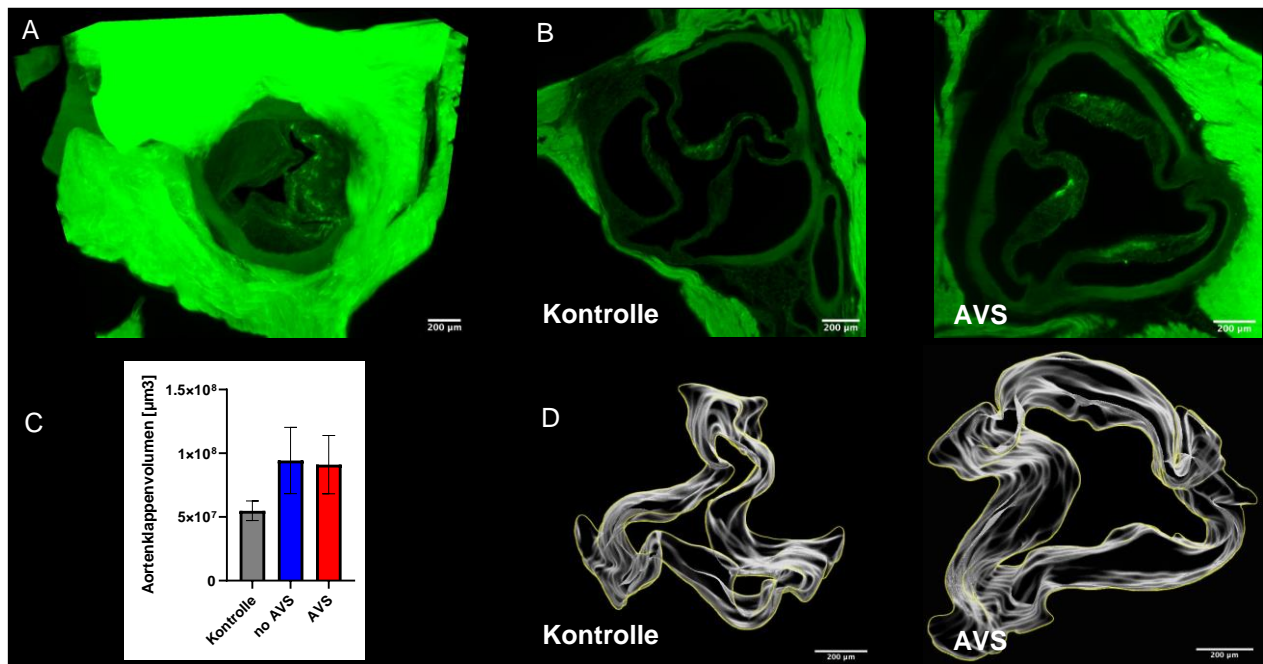
**Abbildung 18:** Repräsentative echokardiografische Bilder.

Messungen der Spitzengeschwindigkeit (A) und der Vena contracta (B) an der Aortenklappe in der AVS-Gruppe und der Kontrollgruppe.

### 4.2.3 Veränderungen der Gewebestruktur der Aortenklappe

Neben der Echokardiographie erfolgte eine strukturelle Analyse der Aortenklappe zur besseren Interpretation des Modells. Da die valvuläre Verdickung und der sklerotische Umbau ein Kennzeichen der chronischen Aortenklappenerkrankung sind, wurde ein spezifisches Lichtblattmikroskopie-Protokoll mit hoher räumlicher Auflösung für eine vollständige 3D-Analyse der gesamten Aortenklappe etabliert.

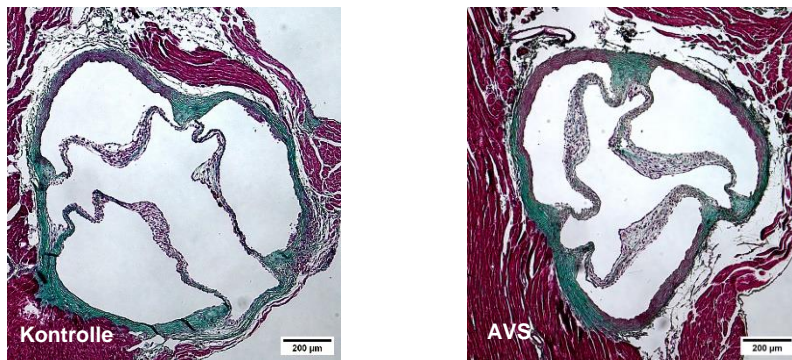
Das Gesamtvolumen der Aortenklappe bei den Kontrolltieren betrug durchschnittlich  $54836200 \pm 7698471,1 \mu\text{m}^3$ , bei den Tieren mit Aortenklappenstenose (AVS) fand sich ein höheres Volumen von  $91018901 \pm 22874857 \mu\text{m}^3$  ( $p=0,1389$ ). Die Volumina der Aortenklappen der Mäuse ohne echokardiografische Aortenklappenstenose (no AVS) waren ebenfalls höher als die Werte der Kontrolltiere und glichen, wenn auch nicht signifikant, denen der AVS-Gruppe ( $94308366 \pm 25974213 \mu\text{m}^3$ ,  $p=0,07$  vs. Kontrolle,  $p > 0,9$  vs. AVS) (Abb. 19 A-E). Es lag keine signifikante Korrelation zwischen dem Klappenvolumina und der echokardiografisch gemessenen Spitzengeschwindigkeit über der Aortenklappe in der AVS ( $r=0,4038$ ,  $p=0,5001$ ) und no AVS ( $r=0,3858$ ,  $p=0,5$ ) vor, während es in der Kontrollgruppe eine starke negative und signifikante Korrelation vorlag ( $r=-0,9739$ ,  $p=0,005$ ) (Abb. 19 E).



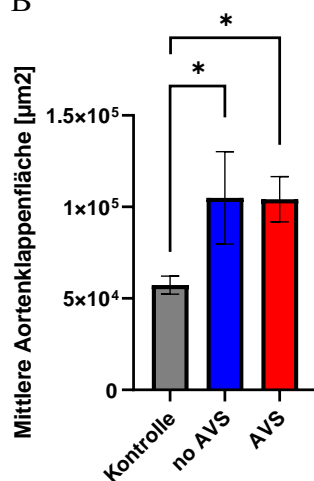
**Abbildung 19:** Darstellung der Lichtblatmikroskopischen Messungen. 3D-Rekonstruktion einer ganzen intakten Aortenwurzel mit Lichtblatmikroskopie (A). Repräsentative 2D-Schnitte von Kontroll- und AVS-Mäusen aus der Lichtblatmikroskopie (B). Statistische Analyse des Aortenklappen volumens in den untersuchten Gruppen (C), Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar, Kontrolle n= 5, no AVS n= 6, AVS n= 5. 3D-Rekonstruktion der Aortenklappe (D). Spearman-Korrelation zwischen Spitzengeschwindigkeit (Peak Vel.) und Aortenklappen volumens (E), die Gerade wurde mittels linearer Regression ermittelt.

Die Ergebnisse der hochauflösenden Lichtblatmikroskopie wurden durch eine (konventionelle) histologische Analyse von sequenziellen Schnitten der gleichen Organproben mit anschließender Durchführung einer Masson-Trichrom-Färbung bestätigt. Wir beobachteten einen signifikant erhöhten Mittelwert der Aortenklappenfläche in Tieren mit und ohne echokardiografischer Aortenklappenstenose im Vergleich zu den Kontrollmäusen über die Gesamtstrecke von 600  $\mu\text{m}$  (Kontrolle  $57265,9 \pm 4938,6 \mu\text{m}^2$  vs. AVS ( $104148,4 \pm 12362,6 \mu\text{m}^2$  vs. no AVS  $104940,6 \pm 25230,2 \mu\text{m}^2$ ; Kontrolle vs. AVS  $p = 0,03$ , no AVS vs. Kontrolle  $p = 0,01$ ). Zwischen AVS- und no AVS-Gruppe hingegen fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p > 0,9$ ) (Abb. 20 A-C).

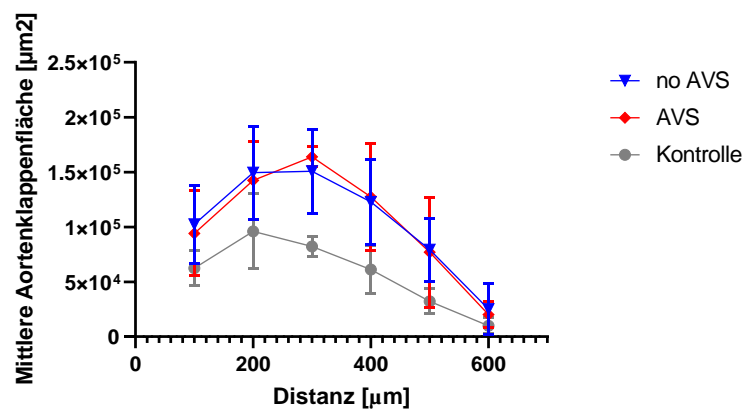
A



B



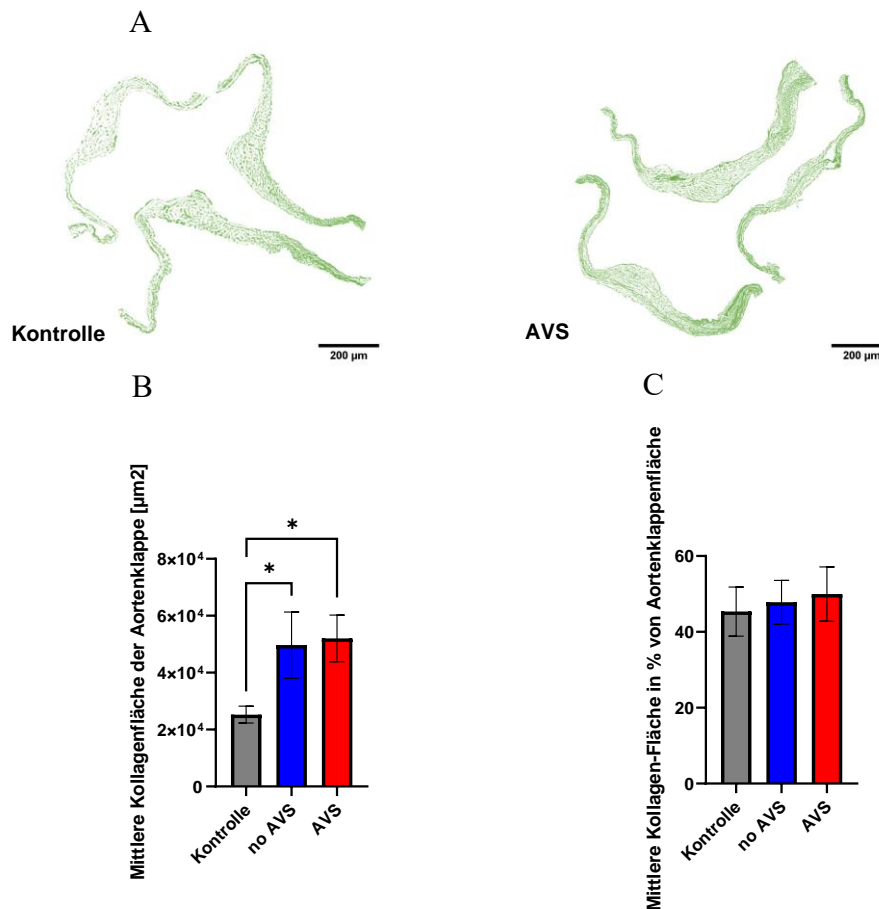
C



**Abbildung 20:** Darstellung der konventionellen histologischen Messungen.

Repräsentative Bilder von Masson-Trichrom-Färbung aus Kontroll- und AVS-Mäusen (A). Durchschnittliche Aortenklappenfläche im Balkendiagramm (B), Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar, \*  $P < 0,05$  statistisch signifikanter Unterschied, Kontrolle  $n= 5$ , no AVS  $n= 6$ , AVS  $n= 5$ . Analyse der durchschnittlichen Aortenklappenfläche über die Distanz (C).

Die Zunahme von Volumen und Dicke der Aortenklappe in AVS- und no AVS- Gruppe ging einher mit einer absoluten Vermehrung des Kollagengehaltes (Kontrolle:  $25266,0 \pm 2939,5 \mu\text{m}^2$ ; AVS:  $52040,3 \pm 8176,8 \mu\text{m}^2$ ,  $p= 0,03$  vs. Kontrolle; no AVS:  $49667,5 \pm 11661,4 \mu\text{m}^2$ ,  $p= 0,02$  vs. Kontrolle). Erneut zeigte sich aber zwischen der AVS- und der no AVS-Gruppe kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,9$ ) (Abb. 21 A&B). Der relative Kollagengehalt der Klappe zeigte hingegen keine nennenswerten Unterschiede zwischen allen 3 Gruppen (Abb. 21 C). AVS ( $50,0 \pm 7,1 \%$ ) vs. Kontrolle ( $45,4 \pm 6,5 \%$ ), no AVS ( $47,8 \pm 5,7 \%$ ) ( $p= 0,9$ ,  $p > 0,9$ ), no AVS vs. Kontrolle ( $p > 0,9$ ).



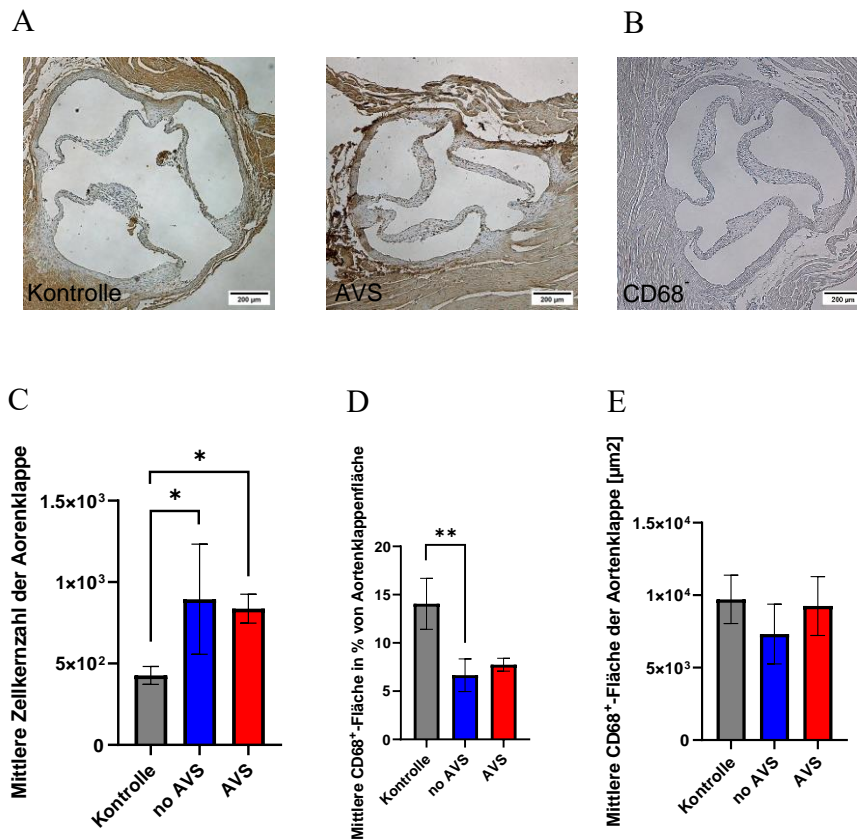
**Abbildung 21:** Darstellung der Kollagengehaltmessungen.

Repräsentative Bilder für die Messung der Kollagenfläche in der Aortenklappe aus der AVS- und der Kontrollgruppe (A). Durchschnittliche absolute vom Kollagen durchsetzte Fläche der Aortenklappe (B). Durchschnittlicher prozentueller Anteil vom Kollagen bezogen auf die gesamte Aortenklappenfläche (C). Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar. \*  $P < 0,05$  statistisch signifikanter Unterschied, Kontrolle  $n= 5$ , no AVS  $n= 6$ , AVS  $n= 5$ .

In der histologischen Zellanalyse fiel eine hohe Zelldichte mit Hyperplasie im Klappengewebe der operierten Mäuse ohne (no AVS) und mit (AVS) echokardiografischer Stenose im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe auf (Kontrolle:  $426,7 \pm 54,7$ ; no AVS:  $895,0 \pm 338,5$ ,  $p= 0,0166$  vs. Kontrolle; AVS:  $836,8 \pm 88,8$ ,  $p= 0,0237$  vs. Kontrolle) (Abb. 22 C). Erneut zeigt sich aber zwischen der AVS- und der no AVS-Gruppe kein sign. Unterschied ( $p > 0,9$ ).

Die no AVS- und AVS- Gruppe zeigten einen niedrigeren prozentuellen Makrophagengehalt bezogen auf die Fläche der Aortenklappe (CD68<sup>+</sup> Zellen in % von Aortenklappenfläche) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle ( $14,1 \pm 2,6$  %), no AVS  $6,7 \pm 1,7$  %;  $p= 0,004$  vs. Kontrolle, AVS  $7,7 \pm 0,7$  %;  $p= 0,09$  vs. Kontrolle) (Abb. 22 D). Zwischen den behandelten Gruppen mit und ohne Stenose ließ sich kein Unterschied beobachten ( $p > 0,9$ ).

Interessanterweise zeigte die Analyse der absoluten Makrophagenfläche keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Kontrolle ( $9709,8 \pm 1670,1 \mu\text{m}^2$ ); AVS  $9253,9 \pm 2030,0 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0,9$  vs. Kontrolle; no AVS  $7319,8 \pm 2063,2 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,1$  vs. Kontrolle) (Abb. 22 E).



**Abbildung 22:** Darstellung der Zellulären Analyse der Aortenklappe.

Repräsentative Bilder der immunhistochemischen CD68-Färbung der Makrophagen aus der AVS- und der Kontrollgruppe (A). CD68<sup>+</sup> Kontrollbild der Aortenklappe (B).

Durchschnittliche absolute Zellkernanzahl in der Aortenklappe (C). Durchschnittlicher prozentueller Anteil der von Makrophagen durchsetzten Fläche bezogen auf die gesamte Fläche der Aortenklappe (D). Durchschnittliche absolute von CD68<sup>+</sup>

Makrophagen durchsetzte Fläche in der Aortenklappe (E). Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  statistisch signifikanter Unterschied, Kontrolle  $n= 5$ , no AVS  $n= 6$ , AVS  $n= 5$ .

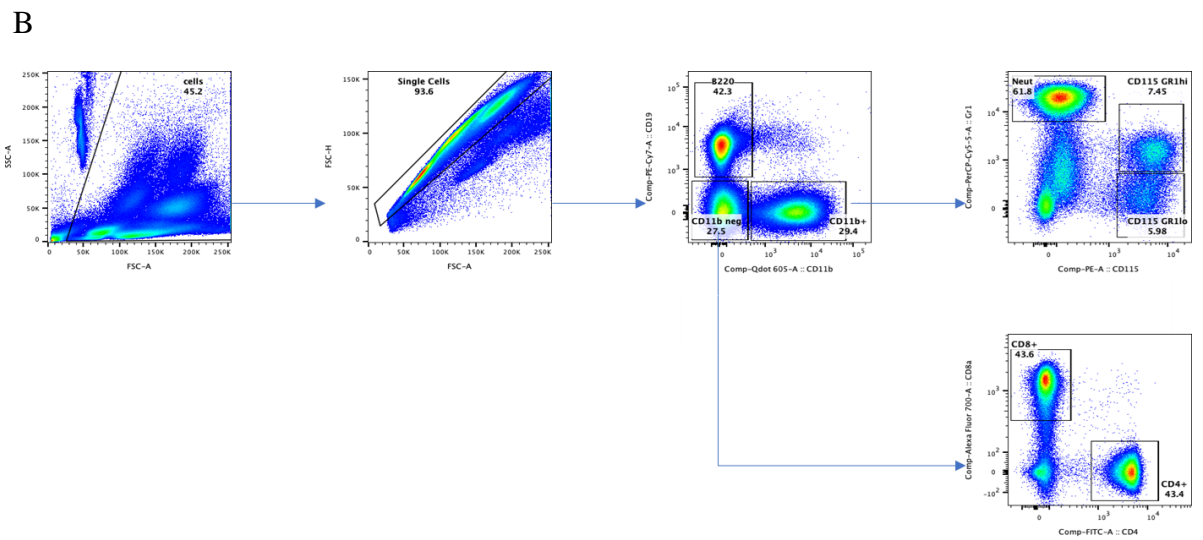
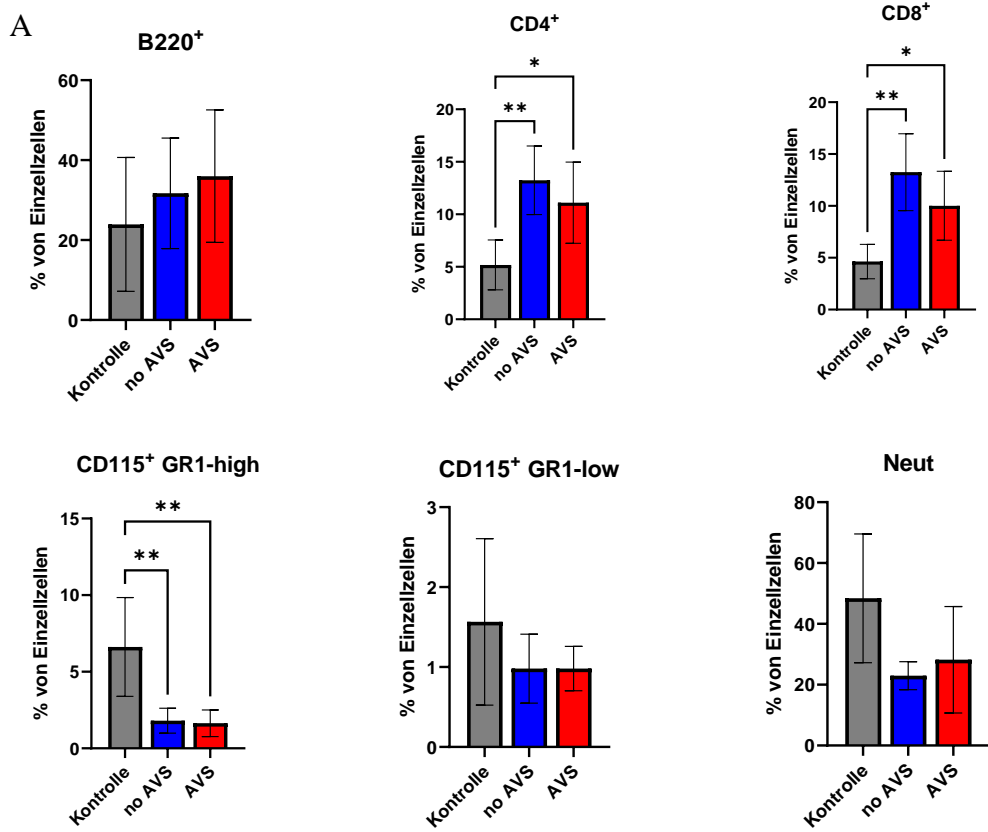
#### 4.2.4 Chronische zelluläre und humorale Immunantwort

Die peripheren, zirkulierenden Blutzellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Anteil der B220<sup>+</sup> B-Zellen in den behandelten Mäusen ohne und mit Stenose war tendenziell höher als in den unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle  $23,9 \pm 16,8$  %; no AVS  $31,7 \pm 13,8$  %,  $p= 0,9$  vs. Kontrolle; AVS  $36,0 \pm 16,6$  %,  $p > 0,9$  vs. Kontrolle,  $p= 0,5$  vs. no AVS) allerdings ohne Erreichen eines signifikanten Niveaus.



Hinsichtlich CD4 und CD8 positive T-Lymphozyten fanden sich signifikante Erhöhungen in den behandelten Mäusen ohne und mit Stenose im Vergleich mit den Kontrolltieren (Kontrollmäuse: CD4<sup>+</sup> 5,2 ± 2,4 %, CD8<sup>+</sup> 4,6 ± 1,7 %; no AVS: CD4<sup>+</sup> 13,2 ± 3,3 %, p= 0,002 vs. Kontrolle; CD8<sup>+</sup> 13,3 ± 3,7 %, p= 0,001 vs. Kontrolle; AVS: CD4<sup>+</sup> 11,1 ± 3,9 %, p= 0,04 vs. Kontrolle, CD8<sup>+</sup> 10,0 ± 3,3 %; p= 0,048 vs. Kontrolle). Es ließ sich zwischen AVS und no AVS keine signifikante Differenz verzeichnen (CD4<sup>+</sup>: p > 0,9, CD8<sup>+</sup>: p > 0,9).

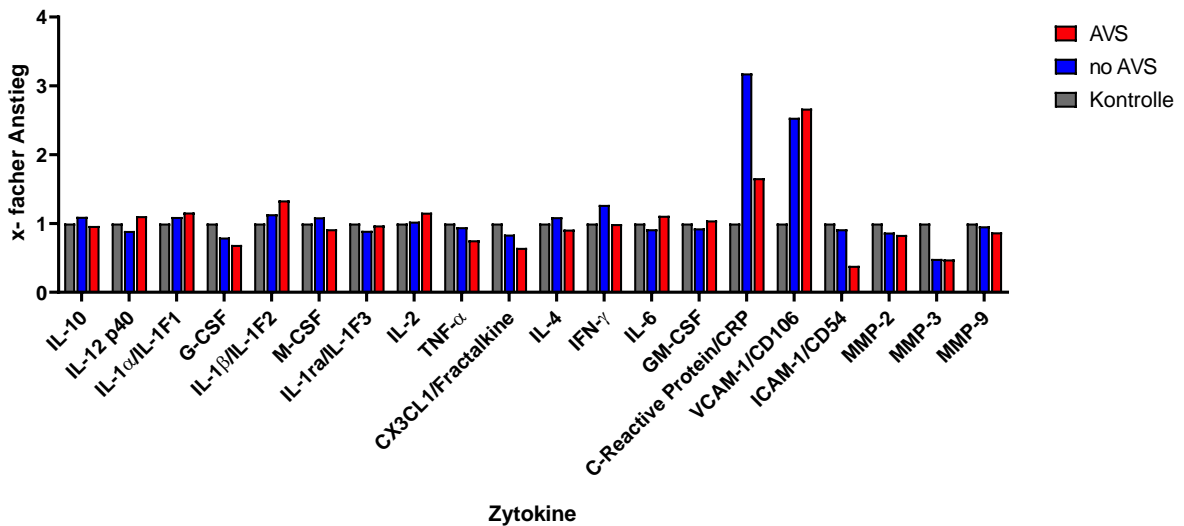
Die gemessenen klassischen Monozyten waren zwischen den behandelten Mäusen ohne und mit Stenose vergleichbar und im Verhältnis zu den Kontrollen signifikant niedriger (CD115<sup>+</sup> GR1-high: Kontrolle 6,6 ± 3,2 %; no AVS 1,8 ± 0,8 % p= 0,007 vs. no AVS; AVS 1,6 ± 0,9 % p= 0,006 vs. Kontrolle, p > 0,9 no AVS vs. AVS), nicht-klassische Monozyten (M2, CD115<sup>+</sup> GR1-low) und neutrophile Granulozyten waren zwischen allen untersuchten Gruppen vergleichbar (CD115<sup>+</sup> GR1-low: Kontrolle: 1,6 ± 1,0 %, no AVS: 1,0 ± 0,4 % p= 0,9 vs. Kontrolle; AVS: 1,0 ± 0,3 %, p > 0,9 vs. Kontrolle; p > 0,9 AVS vs. no AVS; Neutrophile Granulozyten: Kontrolle 48,4 ± 21,2 %; no AVS: 23,0 ± 4,6 %, p= 0,08 vs. Kontrolle; AVS: 28,2 ± 17,5 %, p= 0,3 vs. Kontrolle; p > 0,9 AVS vs. no AVS) (Abb. 23 A-B).



**Abbildung 23:** Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse der peripheren Blutzellen 4 Monate nach der Operation.

Prozentuelle Anteile der jeweiligen Immunzellgruppen (B220<sup>+</sup> B-Zellen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD115<sup>+</sup> GR1-high-Monozyten (M1), CD115<sup>+</sup> GR1-low-Monozyten (M2), Neutrophilen (Neut)) im peripheren Blut in AVS-, no AVS- und Kontrollgruppe (A). Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 statistisch signifikanter Unterschied, Kontrolle n= 10, no AVS n= 6, AVS n= 5. Gating-Hierarchie der durchflusszytometrischen Analyse mit den jeweiligen Immunzellpopulationen (B).

Zur Detektion chronischer humoraler Veränderungen führten wir eine Zytokin-Analyse durch, um relative Unterschiede im Zytokin-Milieu bei den operierten Mäusen und den Kontrollmäusen zu identifizieren. 4 Monate nach der Operation gab es bei der Mehrheit der untersuchten Zytokine keine Unterschiede zwischen den Gruppen bzw. es ließen sich keine Plasmaspiegel detektieren. Unter Berücksichtigung der Zytokindynamik nach 1 Woche wie im Frühphasenmodell bestimmt, wurde die Analyse auf die in Abbildung 24 aufgeführten Zytokine konzentriert. Verglichen mit der Kontrollgruppe sank unter anderem der Spiegel von MMP-3 (Matrix-Metalloproteinase-3) (0,5-fach) sowie von ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) (0,4-fach) in den behandelten Mäusen (AVS und no AVS) im Vergleich mit den Kontrollen, wohingegen CRP (3,1-fach) in no AVS und (1,6-fach) in AVS sowie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, Gefäßzelladhäsionsmolekül-1) (2,5-fach) erhöht waren gegenüber den Kontrollen. Die übrigen in der akuten Phase erhöhten Zytokine - insbesondere Interleukin 1 $\beta$ , GM-CSF und TNF- $\alpha$  - zeigten in der späten Phase keine relevante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abb. 24). Somit unterscheidet sich die chronische humorale Antwort deutlich von der akuten postoperativen Antwort in diesem Modell.



**Abbildung 24:** Darstellung der Zytokin-Analyse aus Pool-Plasma 4 Monate nach der Operation.

Zytokin-Profile der AVS-, no AVS- und Kontrollgruppe normalisiert auf die Kontrollgruppe (Referenzgruppe). Pool-Plasma: n= 5 pro Gruppe. IL: Interleukin, G-CSF: Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor, M-CSF: Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor, GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor, TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ . VCAM-1: Gefäßzelladhäsionsmolekül-1, ICAM-1: Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1, MMP: Matrix-Metalloproteasen.

## **5 Diskussion**

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung eines Mausmodells für Aortenklappenstenose mit Fokus auf die pathophysiologischen Veränderungen der durch eine Drahtverletzung induzierten Aortenklappenschädigung in der akuten und chronischen Phase. Methodisch wurde hierfür erstmals eine präzise volumetrische 3D-Messung der Klappe basierend auf lichtblattmikroskopischen Aufnahmen verwendet.

Die Hauptergebnisse der durchgeführten Experimente waren wie folgt:

- a. Durch die Schädigung der murinen Aortenklappen durch longitudinale Bewegungs- und Rotationsmanöver ließ sich bei vielen, wenn auch nicht allen der so behandelten Mäuse eine transvalvuläre Flussbeschleunigung nach 4 Monaten induzieren, die als Aortenklappenstenose interpretiert wurde.
- b. Die Positionierung des Drahtes in der und durch die Aortenklappe führte bei allen operativ behandelten Mäusen unabhängig von der vorbeschriebenen Prozedur zur lokalen Schädigung nach 4 Monaten zu einer signifikanten Verdickung der Klappe verglichen mit den unbehandelten Kontrollmäusen, war aber unabhängig von der Entwicklung einer Stenose mit erhöhter Spitzengeschwindigkeit durch die Klappe.
- c. Bei allen operierten Mäusen fand sich nach 4 Monaten unabhängig vom Schädigungsmanöver in den verdickten Taschen der Aortenklappe eine zelluläre Hyperplasie in Ergänzung zum fibrotischen Umbau.
- d. Die Induktion der Aortenklappenstenose mittels Drahtverletzung ging sowohl mit akuten als auch mit chronischen Veränderungen des Zytokin-Milieus und der Immunzellen der angeborenen sowie erworbenen Immunität im Blut nach 1 Woche bzw. 4 Monaten einher.

### **5.1 Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen**

#### **Gesamtkontext**

In C57/BL6-Mäusen ließen sich, wie zuvor Honda et al. erstmalig beschrieben, durch eine drahtgeführte Schädigung der Aortenklappe Veränderungen des Klappenapparates entwickeln, die zu einer mutmaßlichen Stenose wie beabsichtigt, aber auch oder in einigen Fällen vornehmlich zu Insuffizienzen führten. Dies stand nur teilweise in

Einklang mit der Erstbeschreibung dieses Modells (Honda et al., 2014) und bedingt eine Neubewertung des initial vielversprechenden Modells.

### **5.1.1 Gewebeeränderungen durch die Drahtschädigung**

Nach einer viermonatigen Beobachtungsperiode stellten wir bei allen operierten Mäusen unabhängig von der Entwicklung einer funktionellen Aortenklappenstenose eine Verdickung und Proliferation der Klappentaschen im Vergleich zu nicht operierten Kontrollmäusen fest.

Die Zunahme der histologisch bestimmten Aortenklappenfläche nach der Verletzung ging einher mit einer verstärkten Kollagenproduktion und einer hyperplastischen Vermehrung der valvulären Zellen. Im Einklang mit den Ergebnissen früherer Studien des gleichen Mausmodells stieg der absolut gemessene Kollagengehalt bei den operierten Mäusen deutlich (Honda et al., 2014; Niepmann et al., 2019). Der relative Kollagenanteil blieb hierbei in allen Gruppen gleich. Quantitativ ließ sich eine erhöhte Dichte an Zellkernen in den Klappen operierter Tiere nachweisen, unabhängig von der Entwicklung einer Flussbeschleunigung und mutmaßlichen Stenose. Hierbei war der relative Anteil der Makrophagen -gemessen als CD68<sup>+</sup>-Zellen in % der Aortenklappe- allerdings deutlich geringer als in unbehandelten Kontrollmäusen. Da der absolute Anteil der Makrophagen in den Aortenklappen aller Tiere inkl. der Kontrollmäuse ohne Operation allerdings vergleichbar war, lässt sich mutmaßen, dass Makrophagen keinen quantitativen Anteil an der Verdickung der Aortenklappen durch Drahtverletzung hatten.

Wesentlich zur Verdickung der Aortenklappe könnten hier  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive Myofibroblasten bzw. valvuläre interstitielle Zellen beitragen, deren Proliferation bei der beschriebenen Verletzung bereits von Honda et al. nachgewiesen wurde und deren zentrale Rolle darüber hinaus auch in Untersuchungen an menschlichen Klappen postuliert wurde (Singh and Torzewski, 2019). Hinsichtlich des valvulären Remodelings scheint das Modell somit wesentliche Aspekte der menschlichen Erkrankung widerzuspiegeln.

### **5.1.2 Steigerung der inflammatorischen Aktivität durch das Gewebetrauma**

Inflammatorische Zytokine (Kaden et al., 2005; Kaden et al., 2003; Toutouzas et al., 2008), reaktive Sauerstoffspezies (Miller et al., 2008) und Wachstumsfaktoren (Clark-Greuel et al., 2007; Yang et al., 2009) wurden bei der menschlichen Aortenklappenstenose beobachtet und spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung von AVS. In unserer Studie wurde das Zytokin-Milieu im Blutplasma sowohl 1 Woche als auch 4 Monate nach der Schädigung der Aortenklappe erfasst. Bei der Zytokin-Analyse nach 1 Woche zeigte sich eine Erhöhung der Plasmaspiegel von Interleukin-1 $\beta$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukin-4 und C-reaktivem-Protein, ebenso GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, Gefäßzelladhäsionsmolekül-1). Dies kann als eine akute, prädominant proinflammatorische Reaktion auf die Schädigung gewertet werden, die aber nicht über die gesamte Dauer des Untersuchungszeitraums persistierte und sich nach 4 Monaten weitgehend wieder den Spiegeln der Kontrollgruppe angleich. Bereits in der Studie von Honda et al 2014 wurde gezeigt, dass inflammatorische Zytokine (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-6) und der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 (TGF-beta 1) 1 Woche nach der Verletzung hochreguliert wurden, und dies hielt etwas mehr als 4 Wochen an. Möglicherweise spielen Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  also v.a. in der Startphase, aber nicht für die chronische Pathophysiologie des Modells eine Rolle und könnten daher sogar ausschließlich artefiziell erhöht sein. 4 Monate nach der Operation stellten wir allerdings einen konsistent erhöhten Plasmaspiegel von VCAM-1 fest. Die Expression der löslichen Form von VCAM-1 (sVCAM-1) wird durch entzündungsfördernde Zytokine im Endothel von Blutgefäßen für die Rekrutierung, Adhäsion und Transmigration von Monozyten, Lymphozyten, Basophilen und Eosinophilen induziert (Dessein et al., 2005; Meigs et al., 2004; Troncoso et al., 2021). Es wurde bereits nachgewiesen, dass der sVCAM-1-Spiegel bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, die mit einer Endothelschädigung einhergehen, erhöht ist (Troncoso et al., 2021) und auf eine langanhaltende endotheliale Dysfunktion oder manifeste Endothelschädigung in unserem Modell hindeutet. Dieses Ergebnis lässt sich mit den

bereits vorhandenen Erkenntnissen vereinbaren (Honda et al., 2014; Sucusky et al., 2009).

Die zelluläre Immunantwort im peripheren Blut zeigte in der akuten Phase an Tag 1 und 3 nach der Operation keine signifikanten Unterschiede, sondern allenfalls Trends zu leichter Erhöhung von B-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie klassischen (M1) und nichtklassischen Monozyten (M2). Bei der Zellanalyse nach 4 Monaten zeigte sich bei den operierten Mäusen insbesondere ein erhöhter Anteil von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten und CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen, die bereits durch weitere Studien in Aortenklappenstenosen nachgewiesen wurden (Raddatz et al., 2019; Steiner et al., 2012). Erstaunlicherweise zeigte sich im Einklang mit unseren immunhistochemischen Ergebnissen der Klappengewebe ein erniedrigter Anteil von klassischen und nicht-klassischen Monozyten in der peripheren Zirkulation. Dies widerspricht vorangegangenen Untersuchungen in Menschen, die einen Anstieg der klassischen Monozyten (M1) hätten erwarten lassen (Li et al., 2017; Raddatz et al., 2019). Hier wurde angenommen, dass sowohl die Gesamtzahl als auch die Polarisierung der Makrophagen bzw. Monozyten den Verkalkungsprozess in der menschlichen Aortenklappe durch eine Verschiebung zum M1-Phänotyp und eine so verstärkte Verkalkung durch interstitielle Klappenzellen fördern (Li et al., 2017). Im untersuchten Modell ließ sich diese Hypothese nicht reproduzieren.

## **5.2 Limitationen des Modells und Kritikpunkte**

22 % der operierten Mäuse verstarben kurze Zeit nach der Operation. Dies war in einer ähnlichen Dimension der Fall bei vorangegangenen Studien des Modells (Honda et al., 2014; Niepmann et al., 2019). Bei zwei der 7 operierten und überlebenden Mäuse konnte trotz des ultraschallkontrollierten technischen Erfolgs des Verfahrens und trotz der Gewebeverdickung der Klappentaschen im Verlauf keine AVS (Flussbeschleunigung) festgestellt werden. Sowohl Ausfallquote als auch Misserfolg der Induktion einer Aortenklappenstenose sprechen gegen eine ausreichende Verlässlichkeit der Methode, da neben dem technisch hohen Anspruch auch hohe Fallzahlen erforderlich scheinen, um beispielsweise therapeutische oder diagnostische Hypothesen zu testen.



Anders als in einigen vorangegangenen Studien fand sich trotz der Entwicklung einer echokardiografischen Aortenklappenstenose keine relevante ventrikuläre Hypertrophie bzw. Reduktion der Ejektionsfraktion, beides sind wichtige Endpunkte für Untersuchungen der Pathophysiologie. Angesichts der Erkenntnisse aus anderen Studien war die fehlende Verschlechterung der linken Ventrikelfunktion überraschend (Honda et al., 2014; Niepmann et al., 2019). Eine fehlende Reduktion der Ejektionsfraktion war nur bei milder AVS in weiteren Studien zu beobachten (Artiach et al., 2020; Wen et al., 2023) und es muss daher diskutiert werden, ob die in dem Modell gemessene Flussbeschleunigung möglicherweise auch anders erklärbar ist. Es fand sich nämlich neben der Flussbeschleunigung eine V. contracta als Marker einer relevanten Insuffizienz, welche wiederum ebenfalls eine Flussbeschleunigung bedingen und zumindest bei Patienten zu einer Überschätzung einer Stenose führen kann (Kandels et al., 2023). Die Verdickung der Aortenklappe ist im Mausmodell kein valider Marker einer relevanten Stenose, so fanden sich in unseren Gruppen mit und ohne Flussbeschleunigung durch die Aortenklappe vergleichbare Umbauprozesse und Hyperplasie.

Zuletzt birgt die Prozedur zur Klappenschädigung einen zentralen Unterschied zur natürlichen Entstehung einer Aortenklappenstenose. So beginnt die Klappenschädigung durch die Prozedur auf der Seite der lamina ventricularis (ventrikelseitig), da der Draht an dieser Stelle die Verletzung verursacht, während die natürliche Aortenklappenstenose typischerweise aortenseitig an der lamina fibrosa beginnt, was einer stärkeren hämodynamischen Belastung zugeschrieben wird (Izquierdo-Gomez et al., 2017). Zudem treten pathologische Veränderungen nach der Drahtverletzung an der freien Kante der Klappentaschen auf, während diese Veränderungen beim Menschen aortenwandnah auftreten (Wen et al., 2023).

### **5.3 Ausblick**

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das von Honda et al. beschriebene Modell der mechanischen Schädigung zur Induktion einer Aortenklappenstenose hinsichtlich vieler für die Pathophysiologie der Erkrankung relevanter Aspekte interessant ist. Es lässt sich leicht auf andere genetische Mauslinien übertragen.

Es kann die chronische, metabolisch-inflammatorisch und genetisch getriebene Entwicklung der humanen Aortenklappenstenose aber nicht vollständig rekonstruieren und ist zudem für Studien anspruchsvoller als zu Beginn gedacht. Darüber hinaus müssen grundsätzliche Unsicherheiten wie der Einfluss der durch die Schädigung entstehenden Insuffizienz durch weitere Kontrollparameter oder Anpassungen des Protokolls überwunden werden.

Somit bleibt die Erforschung der Aortenklappenstenose im Tiermodell eine Herausforderung mit großem Potential für künftige Studien.

## 6 Zusammenfassung

Die Aortenklappenstenose (aortic valve stenosis; AVS) stellt die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung und die häufigste behandlungsbedürftige Herzklappenerkrankung. Die zugrundeliegende Pathophysiologie ist unvollständig geklärt. Es gibt nur wenige Tiermodelle, in denen wesentliche Krankheitsmerkmale der AVS sinnvoll untersucht werden können. Ein neues und vielversprechendes Mausmodell basiert auf einer mechanischen Schädigung der Aortenklappe durch eine ultraschallkontrollierte Drahtverletzung der Klappe. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Mausmodell kritisch reproduziert und überprüft. Hierbei wurden in zwei Versuchsaufbauten die akuten Veränderungen innerhalb der ersten Woche und die chronischen Veränderungen nach 4 Monaten erforscht. Hierbei wurden unbehandelte Kontrolltiere, Sham-operierte Tiere und Tiere mit Aortenklappenschädigung untersucht.

An den Tagen 1 und 3 nach der Schädigung zeigten sich keine signifikanten, sondern allenfalls angedeutete Erhöhungen von B-, CD (cluster of differentiation) 4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten im Blut. Allerdings waren die Plasmaspiegel von VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1; Gefäßzelladhäsionsmolekül-1) und weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 $\beta$  deutlich gesteigert. Nach 4 Monaten fanden sich eine deutliche zelluläre Hyperplasie und fibrotischer Umbau mit resultierender Verdickung in histologischer Analyse und hochauflösender Lichtblatmikroskopie, die interessanterweise auch in Sham-operierten Tieren ohne echokardiografische Hinweise auf eine AVS nachweisbar war. Wir verzeichneten zudem in der Spätphase einen signifikanten Anstieg der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei allen operierten Mäusen unabhängig von der Entwicklung einer AVS. Außerdem stellten wir einen anhaltend erhöhten Plasmaspiegel von VCAM-1 fest. Wir fanden insgesamt aber bis auf eine veränderte echokardiografische Funktionalität der Aortenklappe keine klaren Unterscheidungsmerkmale zwischen operierten Tieren mit und ohne AVS, sondern nur in Abgrenzung zu unbehandelten Kontrolltieren.

Das Mausmodell mit draht-induzierter AVS ist wie vorbeschrieben reproduzierbar und zeigt Ähnlichkeiten zur menschlichen AVS, birgt aber auch deutliche Limitationen. Am wichtigsten scheint hier zu sein, dass neben den echokardiografischen Flussbestimmungen über der Aortenklappe weder histologisch noch immunologisch eine Abgrenzung zu Sham-operierten Tieren ohne Hinweise auf eine AVS gelingt. Somit sind weitere Untersuchungen und Verbesserungen des Modells zwingend notwendig.

## 7 Summary

Aortic valve stenosis (AVS) is the third most common cardiovascular disease and the most common valvular heart disease requiring treatment. The underlying pathophysiology is incompletely understood. There are only a few animal models in which essential disease characteristics of AVS can be meaningfully investigated. A new and promising mouse model is based on mechanical damage of the aortic valve by ultrasound-induced wire injury of the valve. In the present study, this mouse model was critically reproduced and examined. The acute changes within the first week and the chronic changes after 4 months were investigated in two experimental setups. Untreated control animals, Sham-operated animals and animals with aortic valve damage were examined.

On days 1 and 3 after the damage, there were no significant, but at best only indicated increases in B-, CD (cluster of differentiation) 4<sup>+</sup> T-cells, CD8<sup>+</sup> T-cells and monocytes in the blood. However, the plasma levels of VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and other proinflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  were significantly increased. After 4 months, there were marked cellular hyperplasia and fibrotic remodeling with resultant thickening in histological analysis and high-resolution light sheet microscopy, which interestingly was also detectable in Sham-operated animals without echocardiographic evidence of AVS. We also recorded a significant increase in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the late phase in all operated mice regardless of the development of AVS. We also found a persistently elevated plasma level of VCAM-1. However, apart from an altered echocardiographic functionality of the aortic valve, we found no clear distinguishing features between operated animals with and without AVS, but only in contrast to untreated control animals.

The mouse model with wire-induced AVS is reproducible as described above and shows similarities to human AVS, but also has clear limitations. Most importantly, in addition to the echocardiographic flow determinations over the aortic valve, neither histological nor immunological differentiation from Sham-operated animals without evidence of AVS appears to be possible. Further investigations and improvements of the model are therefore absolutely necessary.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Aikawa, E., Nahrendorf, M., Figueiredo, J.L., Swirski, F.K., Shtatland, T., Kohler, R.H., Jaffer, F.A., Aikawa, M., and Weissleder, R. (2007). Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* *116*, 2841-2850.
2. Aluru, J.S., Barsouk, A., Saginala, K., Rawla, P., and Barsouk, A. (2022). Valvular Heart Disease Epidemiology. *Med Sci (Basel)* *10*, 32.
3. Artiach, G., Carracedo, M., Plunde, O., Wheelock, C.E., Thul, S., Sjøvall, P., Franco-Cereceda, A., Laguna-Fernandez, A., Arnardottir, H., and Back, M. (2020). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Decrease Aortic Valve Disease Through the Resolvin E1 and ChemR23 Axis. *Circulation* *142*, 776-789.
4. Aumüller, G., Aust, G., Engele, J., and Kirsch, J. (2020). *Anatomie, 5., korrigierte Auflage* (Stuttgart: Thieme).
5. Authors/Task Force, M., McDonagh, T.A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R.S., Baumhach, A., Bohm, M., Burri, H., Butler, J., Celutkiene, J., Chioncel, O., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Crespo-Leiro, M.G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A.W., Jaarsma, T., Jankowska, E.A., Lainscak, M., Lam, C.S.P., Lyon, A.R., McMurray, J.J.V., Mebazaa, A., Mindham, R., Muneretto, C., Francesco Piepoli, M., Price, S., Rosano, G.M.C., Ruschitzka, F., Kathrine Skibelund, A., and Group, E.S.C.S.D. (2022). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* *24*, 4-131.
6. Barrick, C.J., Roberts, R.B., Rojas, M., Rajamannan, N.M., Suitt, C.B., O'Brien, K.D., Smyth, S.S., and Threadgill, D.W. (2009). Reduced EGFR causes abnormal valvular differentiation leading to calcific aortic stenosis and left ventricular hypertrophy in C57BL/6J but not 129S1/SvImJ mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *297*, H65-75.
7. Borlinghaus, R.T. (2017). Neuere Entwicklungen. In *Die Lichtblattmikroskopie* (Springer Fachmedien Wiesbaden), pp. 29-39.
8. Brandenburg, V.M., Reinartz, S., Kaesler, N., Kruger, T., Dirrichs, T., Kramann, R., Peeters, F., Floege, J., Keszei, A., Marx, N., Schurgers, L.J., and Koos, R. (2017). Slower Progress of Aortic Valve Calcification With Vitamin K Supplementation: Results From a Prospective Interventional Proof-of-Concept Study. *Circulation* *135*, 2081-2083.

9. Carapetis, J.R., Beaton, A., Cunningham, M.W., Guilherme, L., Karthikeyan, G., Mayosi, B.M., Sable, C., Steer, A., Wilson, N., Wyber, R., and Zuhlke, L. (2016). Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Nat Rev Dis Primers* 2, 15084.
10. Centa, M., Ketelhuth, D.F.J., Malin, S., and Gisterå, A. (2019). Quantification of Atherosclerosis in Mice. *Journal of Visualized Experiments*.
11. Clark-Greuel, J.N., Connolly, J.M., Sorichillo, E., Narula, N.R., Rapoport, H.S., Mohler, E.R., 3rd, Gorman, J.H., 3rd, Gorman, R.C., and Levy, R.J. (2007). Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events. *Ann Thorac Surg* 83, 946-953.
12. Coffey, S., Cairns, B.J., and Iung, B. (2016). The modern epidemiology of heart valve disease. *Heart* 102, 75-85.
13. Coffey, S., Roberts-Thomson, R., Brown, A., Carapetis, J., Chen, M., Enriquez-Sarano, M., Zuhlke, L., and Prendergast, B.D. (2021). Global epidemiology of valvular heart disease. *Nat Rev Cardiol* 18, 853-864.
14. Commins, S.P., Borish, L., and Steinke, J.W. (2010). Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 125, S53-72.
15. Dessein, P.H., Joffe, B.I., and Singh, S. (2005). Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, R634-643.
16. Donato, M., Ferri, N., Lupo, M.G., Faggini, E., and Rattazzi, M. (2020). Current Evidence and Future Perspectives on Pharmacological Treatment of Calcific Aortic Valve Stenosis. *Int J Mol Sci* 21.
17. Drolet, M.C., Roussel, E., Deshaies, Y., Couet, J., and Arsenault, M. (2006). A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol* 47, 850-855.
18. Dweck, M.R., Boon, N.A., and Newby, D.E. (2012). Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol* 60, 1854-1863.
19. Erbel, R. (2020). [Aortic stenosis-which diagnostic algorithms and which treatment?]. *Herz* 45, 703-714.

20. Eveborn, G.W., Schirmer, H., Heggelund, G., Lunde, P., and Rasmussen, K. (2013). The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromso study. *Heart* 99, 396-400.
21. Flachskampf, F.A., and Daniel, W.G. (2004). [Aortic valve stenosis]. *Internist (Berl)* 45, 1281-1290; quiz 1291-1282.
22. Freeman, R.V., and Otto, C.M. (2005). Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 111, 3316-3326.
23. Giesecke, C., and Kaiser, T. (2017). Neue Spektren in der Durchflusszytometrie. *BIOSpektrum* 23, 658-661.
24. Goody, P.R., Hosen, M.R., Christmann, D., Niepmann, S.T., Zietzer, A., Adam, M., Bonner, F., Zimmer, S., Nickenig, G., and Jansen, F. (2020). Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 40, 885-900.
25. Herold, G. (2023). *Innere Medizin 2024* (Berlin, Boston: De Gruyter).
26. Honda, S., Miyamoto, T., Watanabe, T., Narumi, T., Kadowaki, S., Honda, Y., Otaki, Y., Hasegawa, H., Netsu, S., Funayama, A., Ishino, M., Nishiyama, S., Takahashi, H., Arimoto, T., Shishido, T., Miyashita, T., and Kubota, I. (2014). A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 270-278.
27. Hulin, A., Hego, A., Lancellotti, P., and Oury, C. (2018). Advances in Pathophysiology of Calcific Aortic Valve Disease Propose Novel Molecular Therapeutic Targets. *Front Cardiovasc Med* 5, 21.
28. Iung, B., and Vahanian, A. (2014). Epidemiology of acquired valvular heart disease. *Can J Cardiol* 30, 962-970.
29. Izquierdo-Gomez, M.M., Hernandez-Betancor, I., Garcia-Niebla, J., Mari-Lopez, B., Laynez-Cerdena, I., and Lacalzada-Almeida, J. (2017). Valve Calcification in Aortic Stenosis: Etiology and Diagnostic Imaging Techniques. *Biomed Res Int* 2017, 5178631.
30. Kaden, J.J., Dempfle, C.E., Grobholz, R., Fischer, C.S., Vocke, D.C., Kilic, R., Sarikoc, A., Pinol, R., Hagl, S., Lang, S., Brueckmann, M., and Borggrefe, M. (2005). Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol* 14, 80-87.

31. Kaden, J.J., Dempfle, C.E., Grobholz, R., Tran, H.T., Kilic, R., Sarikoc, A., Brueckmann, M., Vahl, C., Hagl, S., Haase, K.K., and Borggrefe, M. (2003). Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* *170*, 205-211.
32. Kandels, J., Metze, M., Hagendorff, A., and Stobe, S. (2023). Impact of Aortic Valve Regurgitation on Doppler Echocardiographic Parameters in Patients with Severe Aortic Valve Stenosis. *Diagnostics (Basel)* *13*, 1828.
33. Kerstjens-Frederikse, W.S., van de Laar, I.M., Vos, Y.J., Verhagen, J.M., Berger, R.M., Lichtenbelt, K.D., Klein Wassink-Ruiter, J.S., van der Zwaag, P.A., du Marchie Sarvaas, G.J., Bergman, K.A., Bilardo, C.M., Roos-Hesselink, J.W., Janssen, J.H., Frohn-Mulder, I.M., van Spaendonck-Zwarts, K.Y., van Melle, J.P., Hofstra, R.M., and Wessels, M.W. (2016). Cardiovascular malformations caused by NOTCH1 mutations do not keep left: data on 428 probands with left-sided CHD and their families. *Genet Med* *18*, 914-923.
34. Lang, G. (2013a). Histologische Färbung. In *Histotechnik* (Springer Vienna), pp. 169-250.
35. Lang, G. (2013b). Immunhistochemie. In *Histotechnik* (Springer), pp. 269-304.
36. Li, C., Xu, S., and Gotlieb, A.I. (2011). The response to valve injury. A paradigm to understand the pathogenesis of heart valve disease. *Cardiovasc Pathol* *20*, 183-190.
37. Li, G., Qiao, W., Zhang, W., Li, F., Shi, J., and Dong, N. (2017). The shift of macrophages toward M1 phenotype promotes aortic valvular calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg* *153*, 1318-1327 e1311.
38. Liu, T., Xie, M., Lv, Q., Li, Y., Fang, L., Zhang, L., Deng, W., and Wang, J. (2018). Bicuspid Aortic Valve: An Update in Morphology, Genetics, Biomarker, Complications, Imaging Diagnosis and Treatment. *Front Physiol* *9*, 1921.
39. Makkar, R.R., Fontana, G.P., Jilaihawi, H., Kapadia, S., Pichard, A.D., Douglas, P.S., Thourani, V.H., Babaliaros, V.C., Webb, J.G., Herrmann, H.C., Bavaria, J.E., Kodali, S., Brown, D.L., Bowers, B., Dewey, T.M., Svensson, L.G., Tuzcu, M., Moses, J.W., Williams, M.R., Siegel, R.J., Akin, J.J., Anderson, W.N., Pocock, S., Smith, C.R., Leon, M.B., and Investigators, P.T. (2012). Transcatheter aortic-valve replacement for inoperable severe aortic stenosis. *N Engl J Med* *366*, 1696-1704.
40. Matta, A., and Moussallem, N. (2019). Coronary artery disease is associated with valvular heart disease, but could it Be a predictive factor? *Indian Heart J* *71*, 284-287.



41. Mazzone, A., Venneri, L., and Berti, S. (2007). Aortic valve stenosis and coronary artery disease: pathophysiological and clinical links. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 8, 983-989.
42. Meigs, J.B., Hu, F.B., Rifai, N., and Manson, J.E. (2004). Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 291, 1978-1986.
43. Michelena, H.I., Desjardins, V.A., Avierinos, J.F., Russo, A., Nkomo, V.T., Sundt, T.M., Pellikka, P.A., Tajik, A.J., and Enriquez-Sarano, M. (2008). Natural history of asymptomatic patients with normally functioning or minimally dysfunctional bicuspid aortic valve in the community. *Circulation* 117, 2776-2784.
44. Michelena, H.I., Prakash, S.K., Della Corte, A., Bissell, M.M., Anavekar, N., Mathieu, P., Bosse, Y., Limongelli, G., Bossone, E., Benson, D.W., Lancellotti, P., Isselbacher, E.M., Enriquez-Sarano, M., Sundt, T.M., 3rd, Pibarot, P., Evangelista, A., Milewicz, D.M., Body, S.C., and Investigators, B.A. (2014). Bicuspid aortic valve: identifying knowledge gaps and rising to the challenge from the International Bicuspid Aortic Valve Consortium (BAVCon). *Circulation* 129, 2691-2704.
45. Miller, J.D., Chu, Y., Brooks, R.M., Richenbacher, W.E., Pena-Silva, R., and Heistad, D.D. (2008). Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol* 52, 843-850.
46. Miller, J.D., Weiss, R.M., and Heistad, D.D. (2011). Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res* 108, 1392-1412.
47. Miller, J.D., Weiss, R.M., Serrano, K.M., Brooks, R.M., 2nd, Berry, C.J., Zimmerman, K., Young, S.G., and Heistad, D.D. (2009). Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice. *Circulation* 119, 2693-2701.
48. Miller, J.D., Weiss, R.M., Serrano, K.M., Castaneda, L.E., Brooks, R.M., Zimmerman, K., and Heistad, D.D. (2010). Evidence for active regulation of pro-osteogenic signaling in advanced aortic valve disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2482-2486.
49. Niepmann, S.T., Steffen, E., Zietzer, A., Adam, M., Nordsiek, J., Gyamfi-Poku, I., Piayda, K., Sinning, J.M., Baldus, S., Kelm, M., Nickenig, G., Zimmer, S., and Quast, C. (2019). Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype. *Clin Res Cardiol* 108, 847-856.

50. Nightingale, A.K., and Horowitz, J.D. (2005). Aortic sclerosis: not an innocent murmur but a marker of increased cardiovascular risk. *Heart* *91*, 1389-1393.
51. Nkoike, C., Damasceno, A., Edwards, C., Davison, B., Cotter, G., Sani, M., Gaeta, L., Ogah, O.S., Mondo, C., Ojji, D., Suliman, A., Yonga, G., Ba, S.A., Dzudie, A., and Sliwa, K. (2021). Differences in socio-demographic and risk factor profile, clinical presentation, and outcomes between patients with and without RHD heart failure in Sub-Saharan Africa: results from the THESUS-HF registry. *Cardiovasc Diagn Ther* *11*, 980-990.
52. Nkomo, V.T., Gardin, J.M., Skelton, T.N., Gottdiener, J.S., Scott, C.G., and Enriquez-Sarano, M. (2006). Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* *368*, 1005-1011.
53. O'Brien, K.D. (2006). Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *26*, 1721-1728.
54. O'Brien, K.D., Reichenbach, D.D., Marcovina, S.M., Kuusisto, J., Alpers, C.E., and Otto, C.M. (1996). Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *16*, 523-532.
55. Ochiai, T., Saito, S., Yamanaka, F., Shishido, K., Tanaka, Y., Yamabe, T., Shirai, S., Tada, N., Araki, M., Naganuma, T., Watanabe, Y., Yamamoto, M., and Hayashida, K. (2018). Renin-angiotensin system blockade therapy after transcatheter aortic valve implantation. *Heart* *104*, 644-651.
56. Osnabrugge, R.L., Mylotte, D., Head, S.J., Van Mieghem, N.M., Nkomo, V.T., LeReun, C.M., Bogers, A.J., Piazza, N., and Kappetein, A.P. (2013). Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol* *62*, 1002-1012.
57. Ott, C., Pappritz, K., Hegemann, N., John, C., Jeuthe, S., McAlpine, C.S., Iwamoto, Y., Lauryn, J.H., Klages, J., Klopfleisch, R., Van Linthout, S., Swirski, F., Nahrendorf, M., Kintscher, U., Grune, T., Kuebler, W.M., and Grune, J. (2021). Spontaneous Degenerative Aortic Valve Disease in New Zealand Obese Mice. *J Am Heart Assoc* *10*, e023131.
58. Otto, C.M., and Prendergast, B. (2014). Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med* *371*, 744-756.

59. Palta, S., Pai, A.M., Gill, K.S., and Pai, R.G. (2000). New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention. *Circulation* *101*, 2497-2502.
60. Paradis, J.M., Fried, J., Nazif, T., Kirtane, A., Harjai, K., Khaliq, O., Grubb, K., George, I., Hahn, R., Williams, M., Leon, M.B., and Kodali, S. (2014). Aortic stenosis and coronary artery disease: what do we know? What don't we know? A comprehensive review of the literature with proposed treatment algorithms. *Eur Heart J* *35*, 2069-2082.
61. Park, S.J., Enriquez-Sarano, M., Chang, S.A., Choi, J.O., Lee, S.C., Park, S.W., Kim, D.K., Jeon, E.S., and Oh, J.K. (2013). Hemodynamic patterns for symptomatic presentations of severe aortic stenosis. *JACC Cardiovasc Imaging* *6*, 137-146.
62. Pawade, T.A., Doris, M.K., Bing, R., White, A.C., Forsyth, L., Evans, E., Graham, C., Williams, M.C., van Beek, E.J.R., Fletcher, A., Adamson, P.D., Andrews, J.P.M., Cartlidge, T.R.G., Jenkins, W.S.A., Syed, M., Fujisawa, T., Lucatelli, C., Fraser, W., Ralston, S.H., Boon, N., Prendergast, B., Newby, D.E., and Dweck, M.R. (2021). Effect of Denosumab or Alendronic Acid on the Progression of Aortic Stenosis: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Circulation* *143*, 2418-2427.
63. Qian, J., Chen, Z., Ge, J., Ma, J., Chang, S., Fan, B., Liu, X., and Ge, L. (2010). Relationship between aortic valve calcification and the severity of coronary atherosclerotic disease. *J Heart Valve Dis* *19*, 466-470.
64. Raddatz, M.A., Madhur, M.S., and Merryman, W.D. (2019). Adaptive immune cells in calcific aortic valve disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *317*, H141-H155.
65. Rajamannan, N.M., Evans, F.J., Aikawa, E., Grande-Allen, K.J., Demer, L.L., Heistad, D.D., Simmons, C.A., Masters, K.S., Mathieu, P., O'Brien, K.D., Schoen, F.J., Towler, D.A., Yoganathan, A.P., and Otto, C.M. (2011). Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* *124*, 1783-1791.
66. Rajamannan, N.M., Subramaniam, M., Rickard, D., Stock, S.R., Donovan, J., Springett, M., Orszulak, T., Fullerton, D.A., Tajik, A.J., Bonow, R.O., and Spelsberg, T. (2003). Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* *107*, 2181-2184.
67. Rana, M. (2022). Aortic Valve Stenosis: Diagnostic Approaches and Recommendations of the 2021 ESC/EACTS Guidelines for the Management of Valvular Heart Disease -A Review of the Literature. *Cardiol Cardiovasc Med* *6*, 315-324.

68. Rossebø, A.B., Pedersen, T.R., Boman, K., Brudi, P., Chambers, J.B., Egstrup, K., Gerds, E., Gohlke-Barwolf, C., Holme, I., Kesaniemi, Y.A., Malbecq, W., Nienaber, C.A., Ray, S., Skjaerpe, T., Wachtell, K., Willenheimer, R., and Investigators, S. (2008). Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med* 359, 1343-1356.
69. Rutkovskiy, A., Malashicheva, A., Sullivan, G., Bogdanova, M., Kostareva, A., Stenslokken, K.O., Fiane, A., and Vaage, J. (2017). Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc* 6.
70. Schuler, G. (2017). 18. Aortenstenose. In *Körperliche Aktivität und Krankheit*, S. Gerhard, ed. (De Gruyter), pp. 287-300.
71. Sherzad, A.G., Xu, D., Azimee, M.A., Zafarzai, I., Nemat, A., Alsarhan, O., and Zeng, Q. (2021). Animal Models of Calcific Aortic Valve Disease. *Health Science Journal* 15, 1-13.
72. Shu, S., Yang, Y., Sun, B., Su, Z., Fu, M., Xiong, C., Zhang, X., Hu, S., and Song, J. (2023). Alerting trends in epidemiology for calcific aortic valve disease, 1990-2019: An age-period-cohort analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes* 9, 459-473.
73. Sider, K.L., Blaser, M.C., and Simmons, C.A. (2011). Animal models of calcific aortic valve disease. *Int J Inflam* 2011, 364310.
74. Simionescu, D.T., Lovekamp, J.J., and Vyavahare, N.R. (2003). Glycosaminoglycan-degrading enzymes in porcine aortic heart valves: implications for bioprosthetic heart valve degeneration. *J Heart Valve Dis* 12, 217-225.
75. Singh, S., and Torzewski, M. (2019). Fibroblasts and Their Pathological Functions in the Fibrosis of Aortic Valve Sclerosis and Atherosclerosis. *Biomolecules* 9, 472.
76. Siu, S.C., and Silversides, C.K. (2010). Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 55, 2789-2800.
77. Steiner, I., Krbal, L., Rozkos, T., Harrer, J., and Laco, J. (2012). Calcific aortic valve stenosis: Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate. *Pathol Res Pract* 208, 231-234.

78. Stewart, B.F., Siscovick, D., Lind, B.K., Gardin, J.M., Gottdiener, J.S., Smith, V.E., Kitzman, D.W., and Otto, C.M. (1997). Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 29, 630-634.
79. Sucaskey, P., Balachandran, K., Elhammali, A., Jo, H., and Yoganathan, A.P. (2009). Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 254-260.
80. Taniguchi, T., Morimoto, T., Shiomi, H., Ando, K., Kanamori, N., Murata, K., Kitai, T., Kawase, Y., Izumi, C., Kato, T., Ishii, K., Nagao, K., Nakagawa, Y., Toyofuku, M., Saito, N., Minatoya, K., Kimura, T., and Investigators, C.A.R. (2018). Sudden Death in Patients With Severe Aortic Stenosis: Observations From the CURRENT AS Registry. *J Am Heart Assoc* 7, e008397.
81. Teo, K.K., Corsi, D.J., Tam, J.W., Dumesnil, J.G., and Chan, K.L. (2011). Lipid lowering on progression of mild to moderate aortic stenosis: meta-analysis of the randomized placebo-controlled clinical trials on 2344 patients. *Can J Cardiol* 27, 800-808.
82. Thanassoulis, G., Campbell, C.Y., Owens, D.S., Smith, J.G., Smith, A.V., Peloso, G.M., Kerr, K.F., Pechlivanis, S., Budoff, M.J., Harris, T.B., Malhotra, R., O'Brien, K.D., Kamstrup, P.R., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A., Allison, M.A., Aspelund, T., Criqui, M.H., Heckbert, S.R., Hwang, S.J., Liu, Y., Sjogren, M., van der Pals, J., Kalsch, H., Muhleisen, T.W., Nothen, M.M., Cupples, L.A., Caslake, M., Di Angelantonio, E., Danesh, J., Rotter, J.I., Sigurdsson, S., Wong, Q., Erbel, R., Kathiresan, S., Melander, O., Gudnason, V., O'Donnell, C.J., Post, W.S., and Group, C.E.C.W. (2013). Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med* 368, 503-512.
83. Toutouzias, K., Drakopoulou, M., Synetos, A., Tsiamis, E., Agrogiannis, G., Kavantzias, N., Patsouris, E., Iliopoulos, D., Theodoropoulos, S., Yacoub, M., and Stefanadis, C. (2008). In vivo aortic valve thermal heterogeneity in patients with nonrheumatic aortic valve stenosis the: first in vivo experience in humans. *J Am Coll Cardiol* 52, 758-763.
84. Troncoso, M.F., Ortiz-Quintero, J., Garrido-Moreno, V., Sanhueza-Olivares, F., Guerrero-Moncayo, A., Chiong, M., Castro, P.F., Garcia, L., Gabrielli, L., Corbalan, R., Garrido-Olivares, L., and Lavandero, S. (2021). VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1867, 166170.
85. Vahanian, A., Beyersdorf, F., Praz, F., Milojevic, M., Baldus, S., Bauersachs, J., Capodanno, D., Conradi, L., De Bonis, M., De Paulis, R., Delgado, V., Freemantle, N., Gilard, M., Haugaa, K.H., Jeppsson, A., Juni, P., Pierard, L., Prendergast, B.D., Sadaba,

J.R., Tribouilloy, C., Wojakowski, W., and Group, E.E.S.D. (2022). 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J* 43, 561-632.

86. Vesely, I. (1998). The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech* 31, 115-123.

87. Vogelgesang, A., Hasenfuss, G., and Jacobshagen, C. (2018). [Diagnosis and treatment of aortic valve stenosis]. *Internist (Berl)* 59, 1279-1290.

88. Weiss, R.M., Ohashi, M., Miller, J.D., Young, S.G., and Heistad, D.D. (2006). Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice. *Circulation* 114, 2065-2069.

89. Wen, D., Hu, L., Shan, J., Zhang, H., Hu, L., Yuan, A., Pu, J., and Xue, S. (2023). Mechanical injury accentuates lipid deposition in ApoE(-/-) mice and advance aortic valve stenosis: A novel modified aortic valve stenosis model. *Front Cardiovasc Med* 10, 1119746.

90. Yadgir, S., Johnson, C.O., Aboyans, V., Adebayo, O.M., Adedoyin, R.A., Afarideh, M., Alahdab, F., Alashi, A., Alipour, V., Arabloo, J., Azari, S., Barthelemy, C.M., Benziger, C.P., Berman, A.E., Bijani, A., Carrero, J.J., Carvalho, F., Daryani, A., Duraes, A.R., Esteghamati, A., Farid, T.A., Farzadfar, F., Fernandes, E., Filip, I., Gad, M.M., Hamidi, S., Hay, S.I., Ilesanmi, O.S., Naghibi Irvani, S.S., Jurisson, M., Kasaeian, A., Kengne, A.P., Khan, A.R., Kisa, A., Kisa, S., Kolte, D., Manafi, N., Manafi, A., Mensah, G.A., Mirrakhimov, E.M., Mohammad, Y., Mokdad, A.H., Negoi, R.I., Thi Nguyen, H.L., Nguyen, T.H., Nixon, M.R., Otto, C.M., Patel, S., Pilgrim, T., Radfar, A., Rawaf, D.L., Rawaf, S., Rawasia, W.F., Rezapour, A., Roeber, L., Saad, A.M., Saadatagah, S., Senthilkumaran, S., Sliwa, K., Tesfay, B.E., Tran, B.X., Ullah, I., Vaduganathan, M., Vasankari, T.J., Wolfe, C.D.A., Yonemoto, N., Roth, G.A., and Global Burden of Disease Study Nonrheumatic Valve Disease, C. (2020). Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017. *Circulation* 141, 1670-1680.

91. Yang, X., Meng, X., Su, X., Mauchley, D.C., Ao, L., Cleveland, J.C., Jr., and Fullerton, D.A. (2009). Bone morphogenetic protein 2 induces Runx2 and osteopontin expression in human aortic valve interstitial cells: role of Smad1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Thorac Cardiovasc Surg* 138, 1008-1015.

92. Zheng, K.H., Tzolos, E., and Dweck, M.R. (2020). Pathophysiology of Aortic Stenosis and Future Perspectives for Medical Therapy. *Cardiol Clin* 38, 1-12.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Aortenklappenstenose einer trikuspiden Aortenklappe. ....	9
<b>Abbildung 2:</b> Phasen der kalzifizierten Aortenklappenstenose .....	12
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus vom Frühphasenmodell. .....	22
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus vom Spätphasenmodell. .....	22
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der echokardiografisch basierten Neugruppierung.....	23
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung der Operation an der Aortenklappe. ....	25
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung des Herzens und der Aorta. ....	32
<b>Abbildung 8:</b> Herzbasis nach der Zubereitung.....	33
<b>Abbildung 9:</b> LSFM-Aufnahme einer Aortenklappe. ....	34
<b>Abbildung 10:</b> Masson-Trichrom-Färbung einer stenosierten Aortenklappe. ....	39
<b>Abbildung 11:</b> CD68-Färbung einer Aortenklappe.....	42
<b>Abbildung 12:</b> Zytokin-Array vom Pool-Plasma aus Mäusen mit stenosierter Aortenklappe. ....	47
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung der echokardiografischen Messungen 1 Woche nach der Operation.....	49
<b>Abbildung 14:</b> Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse der peripheren Blutzellen 1, 3 und 7 Tage nach der Operation.....	53
<b>Abbildung 15:</b> Darstellung der Zytokin-Analyse aus Pool-Plasma 1 Woche nach der Operation.....	54
<b>Abbildung 16:</b> Darstellung von ausgewählten Ergebnissen mit der neuen und der anfänglich geplanten Gruppeneinteilung.....	56
<b>Abbildung 17:</b> Darstellung der echokardiografischen Messungen 4 Monate nach der Operation.....	58
<b>Abbildung 18:</b> Repräsentative echokardiografische Bilder.....	59
<b>Abbildung 19:</b> Darstellung der Lichtblatmikroskopischen Messungen.....	60
<b>Abbildung 20:</b> Darstellung der konventionellen histologischen Messungen.....	62
<b>Abbildung 21:</b> Darstellung der Kollagengehaltmessungen.....	63

<b>Abbildung 22:</b> Darstellung der Zellulären Analyse der Aortenklappe.....	64
<b>Abbildung 23:</b> Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse der peripheren Blutzellen 4 Monate nach der Operation.....	67
<b>Abbildung 24:</b> Darstellung der Zytokin-Analyse aus Pool-Plasma 4 Monate nach der Operation.....	68

## 9.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Charakteristika von einigen Mausmodellen für Aortenklappenstenose.....	18
<b>Tabelle 2:</b> Durchflusszytometrische Ergebnisse der peripheren Blutzellen 1, 3 und 7 Tage nach der Operation.....	50

## 9.3 Abkürzungsverzeichnis

AVS	Aortic valve stenosis, Aortenklappenstenose
CD	Cluster of differentiation, Oberflächenmerkmal
LSFM	Light sheet fluorescence microscopy, Lichtblattmikroskopie
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation, Standardabweichung
TAVI	Transkatheter-Aortenklappen-Implantation



## **10 Danksagungen**

Ich möchte mit diesen Dankesworten diejenigen erreichen, die einen bedeutenden Beitrag zum Erfolg meiner Dissertation geleistet haben.

Ich möchte mich an erster Stelle ganz herzlich bei meinen Betreuern, Herrn PD. Dr. med. Martin Steinmetz, Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Cristos Rammos und Herrn Dr. med. Tobias Radecke für ihre exzellente Betreuung und Zusammenarbeit während der gesamten Zeit bedanken. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft hat einen signifikanten Einfluss auf meinen Lern- und Arbeitsprozess gehabt.

Ich danke Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Tienush Rassaf dafür, dass er meine Promotion in seiner Abteilung ermöglicht hat. Zudem möchte ich ihm für seine motivierenden Worte danken.

Ich möchte Herrn Dr. med. Tobias Radecke meinen Dank aussprechen, da er zusätzlich zur Laborbetreuung seine Kenntnisse in der statistischen Auswertung und der grafischen Darstellung eingebracht hat.

Des Weiteren möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber den Mitgliedern des Cardio Science Labs ausdrücken, die mir beim Erlernen der Labor-Techniken geholfen und mich bei der Durchführung der Experimente unterstützt haben.

Bei dem evangelischen Studienwerk Villigst bedanke ich mich für die großzügige finanzielle und ideelle Förderung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit.

Ein spezieller Dank gebührt meinen Eltern, die mir bereits in jungen Jahren die Entschlossenheit und den Mut vermittelt haben, meine Träume zu verfolgen. Ohne ihren Zusammenhalt, ihre Zuwendung und liebevolle Unterstützung wäre ein solcher Weg sicherlich nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich mich herzlich beim Herrn PD. Dr. med. Martin Steinmetz bedanken, der mich von Anfang an verlässlich und gewissenhaft bei meiner Promotionsarbeit betreut hat.

## **11 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.