

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

# Degenerative Effekte einer mechanischen Linksherzunterstützung auf die Aortenklappe

Dissertation

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

vorgelegt von

Linus Mrozek

(2022)

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

gez:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen

**Teile dieser Arbeit wurden in Fachaufsätzen veröffentlicht:**

Barth, Dr. rer. nat. Mareike, Mrozek, Linus, Niazy, Naima, Selig, Jessica, Boeken, Prof. Dr. Udo, Sugimura, Dr. med. Yukiharu, Kalampokas, Nikolaos, Horn, OA PD Dr. med. Patrick, Westenfeld, PD Dr. med. Ralf, Kröpil, Prof. Dr. Patric, Aubin, PD Dr. Hug, Lichtenberg, Prof. Dr. med. Artur, Akhyari, Prof. Dr. Payam, “*Degenerative changes of the aortic valve during left ventricular assist device support*”, *ESC Heart Failure* 2022; 9: 270–282; *Online ahead of print* 21. Dezember 2021, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ehf2.13767>

## Zusammenfassung

Der Mangel an transplantierbaren Spenderherzen hat zur Entwicklung anspruchsvoller mechanischer Pumpsysteme zur Unterstützung der Herzfunktion geführt. Die bei Linksherzinsuffizienz verwendeten *left ventricular assist devices* (LVAD) werden aufgrund des steigenden Behandlungserfolgs zunehmend häufig und lange eingesetzt. Da die aktuell gängigen LVAD jedoch mit einem kontinuierlichen Flussprofil arbeiten und sich dies von der pulsatilen Funktionsweise des menschlichen Herzens unterscheidet, sind Veränderungen des Herzmuskels und der großen Gefäße beschrieben und auch die häufigere Entwicklung einer Aorteninsuffizienz ist bekannt. Da mechanische Einflüsse auch eine Schlüsselrolle in der Entstehung einer kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung spielen, besteht die Möglichkeit, dass ein LVAD auch zu solchen degenerativen Veränderungen der Klappe beiträgt. Mögliche degenerative Effekte von LVAD auf die Aortenklappe sind bislang noch unzureichend erforscht. Die Hypothese der Arbeit ist, dass durch den Einsatz eines LVAD degenerative Veränderungen der Aortenklappe induziert oder verstärkt werden. Um dies zu untersuchen, wurden Aortenklappentaschen von Patienten mit und ohne LVAD zum Zeitpunkt der Herztransplantation gewonnen. Anschließend wurden diese Klappen histologisch aufgearbeitet und mit gängigen histologischen Färbungen und spezifischen immunhistologischen Färbungen bearbeitet und untersucht. Überdies wurden die Proben mittels Computertomographie auf ihren Kalkgehalt untersucht und die mRNA-Expression repräsentativer Marker für Entzündung, Umbau der Klappenmatrix sowie für chondro-osteogene Differenzierung gemessen. Zudem wurden Patientendaten gesammelt und verglichen, um mögliche Einflussfaktoren zu identifizieren. In den Untersuchungen zeigte sich eine signifikant höhere Expression der untersuchten Entzündungsvonrker, der Matrixmetalloprotease 9 und von Osteopontin in den Aortenklappenproben von LVAD-Patienten. Weiterhin konnte bei diesen Patienten  $\alpha$ -Glattmuskelaktin als Zeichen einer Aktivierung von valvulären Interstitialzellen innerhalb der Klappenmatrix vermehrt angefärbt werden. Insgesamt stellten sich die Aortenklappen unabhängig vom Vorhandensein eines LVAD heterogen dar mit einigen stärker degenerierten Klappentaschen in beiden Gruppen. Eine vermehrte Kalklast konnte nicht gemessen werden. Es ließen sich spezifische Hinweise auf eine Aktivierung von entzündlichen und degenerativen Prozessen innerhalb der Klappe als unabhängiger Einfluss im Rahmen der LVAD-Anwendung beschreiben. Deutliche Veränderungen der Aortenklappenhistologie und der Kalklast konnten jedoch, auch aufgrund der Überlagerung mit vielen anderen degenerativen Faktoren, nicht identifiziert werden. Insgesamt sind die Ergebnisse mit der Hypothese einer Veränderung der Aortenklappe durch ein LVAD vereinbar. Deshalb sollte die Nutzung von Aortenklappen von Herztransplantationspatienten als Bioprothesenmaterial aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Erkenntnisse nicht ohne vorhergehende Untersuchung erfolgen.

## Summary

The shortage of donor hearts for heart transplantation has led to the development of advanced mechanical pumping solutions to support heart function. Increasing benefits in the treatment of left-sided heart failure with the implantation of left ventricular assist devices (LVAD) result in their longer lasting and more frequent therapeutical use. LVADs currently in use provide continuous flow. Since this differs from physiological pulsatile flow, remodelling processes of the myocardium and large vessels as well as newly developed aortic regurgitation have been postulated and have been described. Since mechanical influences play a key role in the pathogenesis of calcific aortic valve disease, degenerative potential of LVAD usage might be inferred. Little is currently known on this topic.

The starting point of the present work is the hypothesis that the use of an LVAD induces or intensifies degenerative changes in the aortic valve. To investigate this, aortic valve samples were obtained from patients with and without LVAD at the time of heart transplantation. The samples were then examined by histology and immunohistology. Computed tomographic scans of the samples were followed by RNA isolation and polymerase chain reaction for markers of inflammation, remodelling and calcification. Furthermore, patient data was collected and analysed to identify possible confounders.

This study showed a significant increase in the expression of the examined inflammatory markers, matrix metalloprotease 9 and osteopontin in the aortic valve samples of LVAD patients. Moreover, valves of these patients showed increased  $\alpha$ -smooth muscle actin staining, a sign of activation of connective tissue cells within the valve matrix. Overall, the aortic valves presented heterogeneously regardless of the presence of LVAD, with some highly degenerated valves in both groups. A significantly increased number of calcific lesions could not be measured.

Specific indications of the activation of degenerative processes within the valve could be described as an independent influence in the context of LVAD support. However, significant changes in aortic valve histology and calcification could not be identified. This might be supported due to the overlap with many other degenerative factors. Overall, the findings of this work support the hypothesis of degenerative change in the aortic valve caused by an LVAD and also support the recommendation the use of aortic valves of heart transplant patients as homografts should also not take place without prior examination.

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\alpha$ SMA	$\alpha$ -Glattmuskelaktin
$\mu$ -	mikro-
60S-Untereinheit	60 Svedberg units große Untereinheit
ACE	Acetylcholineesterase
AKE	Aortenklappenersatz
ALP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	Bone morphogenic protein
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CT	Computertomographie
CT-Wert	cycle of threshold-Wert
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HU	Houndsfield uniits
HTx	Herztransplantation
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
JPEG	Bilddatei mit .jpg Dateieindung
k-	kilo-
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LVAD	left ventricle assist device, Versuchsgruppe mit LVAD
m	Meter
m-	milli-
min	Minute
MMP	Matrixmetalloprotease
mol	Mol (Einheit der Stoffmenge)
n-	nano-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NoVAD	Versuchsgruppe ohne LVAD
NYHA	New York heart association-Klassifikation der Herzinsuffizienz

OCN	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pVO <sub>2</sub>	<i>peak oxygen consumption</i>
p-Wert	Wert des Signifikanzniveaus
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	Rhodamin X
RPL13A	Ribosomales Protein L13A
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i> - Standardfehler
TFN $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TGF $\beta$ 1	<i>transforming growth factor <math>\beta</math>1</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
VIC	Valvuläre Interstitialzellen

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
1 Einleitung.....	1
1.1 Strukturelle Herzerkrankungen und Herztransplantationen.....	1
1.1.1 Strukturelle Erkrankungen des Myokards.....	1
1.1.2 Herztransplantation (HTx).....	2
1.2 Mechanische Kreislaufunterstützung.....	2
1.2.1 Grundlagen und Funktionsprinzip.....	3
1.2.2 Anpassungsprozesse des Herzens und der großen Gefäße.....	4
1.2.3 Veränderung der Aortenklappe unter LVAD-Therapie.....	5
1.3 Die Aortenklappe und Aortenklappendegeneration.....	6
1.3.1 Aufbau und Funktion der gesunden Aortenklappe.....	6
1.3.2 Mechanismen der Aortenklappendegeneration.....	7
1.3.2.1 Risikofaktoren und protektive Faktoren.....	9
1.3.2.2 Inflammation.....	9
1.3.2.3 Umbau der Klappenmatrix.....	9
1.3.2.4 Kalzifizierung.....	10
1.3.2.5 Therapie der Kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung.....	10
1.4 Ziel der Arbeit und Hypothese.....	11
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Herkunft und Gewinnung der Aortenklappen.....	11
2.1.1 Herkunft der HTx-Proben.....	11
2.2 PCR.....	12
2.2.1 RNA-Isolation.....	12

2.2.2 Abweichungen vom Isolationsprotokoll im Zuge der Vorversuche.....	12
2.2.3 Bestimmung der RNA-Integrität.....	13
2.2.4 cDNA-Umschreibung.....	13
2.2.5 real time PCR.....	14
2.3 Histologie.....	15
2.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE).....	16
2.3.2 Von-Kossa-Färbung.....	16
2.3.3 Movat-Pentachrom-Färbung.....	17
2.3.4 Photographische Auswertung.....	19
2.4 Immunhistochemie.....	19
2.4.1 Immunfluoreszenz Standardprotokoll.....	19
2.4.2 CD3/CD68-Doppelfärbung.....	20
2.4.3 Vimentin- $\alpha$ SMA-Doppelfärbung.....	20
2.4.4 3,3'-Diaminobenzidin Standardprotokoll.....	21
2.4.5 Kollagen Typ 1.....	22
2.4.6 Elastin.....	22
2.4.7 Biglykan.....	23
2.4.8 MMP2.....	24
2.4.9 Photographische Auswertung.....	24
2.5 Bestimmung des Kalziumgehalts mit kolorimetrischem Assay.....	24
2.6 Kalziumbestimmung mittels Computertomographie.....	24
2.6.1 Agatston-Kalk-Score.....	25
2.7 Statistik.....	25
2.8 Eigenanteil der Methodik und Etablierungsarbeit.....	26
2.9 Materialien.....	26

2.9.1 Material.....	26
2.9.2 Softwareliste.....	30
2.9.3 Geräteliste .....	31
2.10 Berechtigungsnachweise .....	32
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Vorversuche RNA-Isolationsmethode .....	32
3.2 Vorversuche CT-Kalziumbestimmung.....	33
3.3 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs.....	36
3.4 Entzündung und Immunreaktion .....	41
3.4.1 Vergleich NoVAD vs. LVAD.....	41
3.4.2 Korrelation mit LVAD-Dauer .....	43
3.5 Umbau der Extrazellulärmatrix .....	44
3.5.1 Vergleich NoVAD vs. LVAD.....	44
3.5.2 Korrelation mit LVAD-Dauer .....	49
3.6 Chondro-osteogene Differenzierung.....	49
3.6.1 Vergleich NoVAD vs. LVAD.....	49
3.6.2 Korrelation mit LVAD-Dauer .....	52
3.7 Auswertungen hinsichtlich unabhängiger Einflussfaktoren .....	53
3.7.1 Einfluss durch die Indikation.....	53
3.7.2 Einfluss durch Infektionen des LVAD-Systems.....	54
3.7.3 Einfluss durch Medikamenteneinnahme .....	55
3.7.4 Einfluss durch Diabetes mellitus.....	56
3.7.5 Einfluss durch chronische Niereninsuffizienz.....	56
4 Diskussion .....	57
4.1 Auswahl eines RNA-Isolationsverfahrens anhand der Vorversuche .....	57

4.2 Untersuchung der Aortenklappen mittels CT .....	58
4.3 Entzündung und Immunreaktion .....	59
4.4 Umbau der Extrazellulärmatrix .....	61
4.5 Chondro-osteogene Differenzierung.....	63
4.6 Einfluss der Dauer der mechanischen Unterstützung.....	65
4.7 Bewertung von möglichen Einflussfaktoren.....	66
4.8 Einordnung der Ergebnisse .....	67
4.9 Konsequenzen aus der Studie für die Klinik .....	69
4.10 Limitationen der Studie.....	69
5 Literaturverzeichnis .....	70
Danksagung.....	79

# 1 Einleitung

## 1.1 Strukturelle Herzerkrankungen und Herztransplantationen

Das Herz ist während eines Menschenlebens rund um die Uhr aktiv. Wenn Krankheitsprozesse die Fähigkeit des Herzens einschränken, alle Bereiche des Körpers adäquat mit Blut zu versorgen, entwickelt sich eine Herzinsuffizienz mit den typischen Symptomen wie Luftnot, Müdigkeit und Flüssigkeitsretention [1]. Ätiologisch kann eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsbilder zu einer Herzinsuffizienz führen. In Deutschland am häufigsten sind die Schädigung des Herzens durch eine arterielle Hypertonie mit entsprechender Erhöhung der Nachlast und die koronare Herzkrankheit (KHK) mit Ischämie des Myokards oder eine Kombination beider Erkrankungen. Auch nicht-ischämische Kardiomyopathie, Arrhythmien oder Herzklappenerkrankungen können eine Herzinsuffizienz bedingen [2]. Unabhängig von den unterschiedlichen Ursachen einer Herzinsuffizienz kommt es bei einem Absinken der Auswurfleistung des Herzens zu ähnlichen Kompensationsmechanismen. Durch neurohormonale Aktivierung insbesondere des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems kommt es zwar kurzfristig zu einer Erhöhung des Herzzeitvolumens, im Zuge der chronischen Aktivierung dieser Mechanismen kommt es jedoch zu einem Progress der Herzinsuffizienz [3]. Therapeutische Optionen bestehen, neben der Behandlung der Grunderkrankung, hauptsächlich in der Unterbrechung dieses Regulationskreislaufts [3, 4]. Im Falle einer terminalen Herzinsuffizienz, bei der alle weiteren Therapieoptionen ausgeschöpft sind, bleibt oft nur die Möglichkeit einer Herztransplantation, unabhängig von der jeweiligen Ursache der Herzinsuffizienz [4].

### 1.1.1 Strukturelle Erkrankungen des Myokards

Eine terminale Herzinsuffizienz, die eine Herztransplantation nötig macht, geht mit einer strukturellen Schädigung des Herzmuskels und morphologischen Veränderungen einher. Anhand dieser Veränderungen lassen sich die heterogenen Ätiologien zu Gruppen zusammenfassen [4]. Die hypertrophe Kardiomyopathie entwickelt sich durch eine asymmetrische Hypertrophie des Herzmuskels bis hin zu einer Obstruktion des Ventrikels [5]. Bei der restriktiven Kardiomyopathie steht ein Elastizitätsverlust der Herzwand mit der Folge einer gestörten diastolischen Füllung im Vordergrund [5]. Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie stellt einen häufig genetisch bedingten Funktionsverlust des rechten Herzens durch Einlagerung von Fett und Bindegewebe dar [5]. Im *"Thirty-third Adult Heart Transplantation Report-2016"* der *International Society for Heart and Lung Transplantation* stellten diese Formen der Herzmuskelschädigung lediglich bei 7,4 %

der Herztransplantationen die Indikation dar. Bei 86,1 % aller Herztransplantationen war hingegen eine Dilatation des Herzens die führende morphologische Veränderung. Hierbei war die Ursache der Erweiterung der Ventrikel in den meisten Fällen ischämiebedingt, zum Beispiel im Rahmen einer KHK. Diese ischämische Kardiomyopathie (ICM) stellte die zugrundeliegende Indikation bei 35,6 % aller Herztransplantationen dar. Eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) mit nicht-ischämischer Ursache, also äthyltoxischer, familiärer, infektiöser oder anderer Genese, fand sich bei 50,6 % aller Herztransplantationen [4].

### 1.1.2 Herztransplantation (HTx)

Die Indikation und somit die Listung für eine Herztransplantation wird aufgrund stark eingeschränkten Leistungsvermögens von Herz und Lunge bei massiver Reduktion der maximalen Sauerstoffaufnahme und unter Berücksichtigung von Alter und Komorbiditäten gestellt [6]. Aufgrund der hohen Belastung durch eine Herztransplantation sind neben einer klaren Indikationsstellung anhand der klinischen Kriterien, jedoch auch weitere Faktoren, wie eine hohe Motivation und emotionale Stabilität des Patienten bei der Listung von Patienten zur Herztransplantation zu beachten [7]. Zusätzlich zu diesen patienteneigenen Kriterien ist die Verfügbarkeit von Spenderherzen eine große Limitation. So wurden 2018 in Deutschland 314 Patienten durch eine Herz- oder Herz- und Lungentransplantation versorgt [8], während zu Beginn des Jahres 703 Patienten auf der Warteliste von Eurotransplant für eine Herztransplantation gelistet waren [9].

## 1.2 Mechanische Kreislaufunterstützung

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Herztransplantaten wurden mechanische Unterstützungssysteme entwickelt. Am verbreitetsten sind hierbei Pumpsysteme, deren Einflusstrakt im linken Ventrikel liegt und deren Ausflusstrakt an ein Gefäß der systemischen Zirkulation, meistens der Aorta, angeschlossen ist. Diese Systeme werden aufgrund ihrer direkten Wirkung auf den linken Ventrikel als linksventrikuläre Unterstützungssysteme oder *left ventricular assist device* (LVAD) bezeichnet. Häufig dienen diese Systeme der Überbrückung der Wartezeit bis zur Verfügbarkeit eines Spenderorgans (*bridge-to-transplant*) oder als Dauerlösung (*destination therapy*).

## 1.2.1 Grundlagen und Funktionsprinzip

Mechanisch wurden zunächst pulsatile Systeme entwickelt, welche das Blut rhythmisch beschleunigen. Diesen gegenüber haben sich jedoch in den letzten zwei Jahrzehnten Systeme durchgesetzt, welche ein kontinuierliches Flussprofil erzeugen. Diese Geräte haben den Vorteil, dass sie leiser und langlebiger sind und zusätzlich aufgrund ihrer geringen Größe auch für kleinere Patienten infrage kommen [10].

Insbesondere die kontinuierlichen Systeme erzeugen jedoch einen Blutfluss, der sich stark vom natürlichen Strömungsverhalten im Bereich des Herzens und der großen Gefäße unterscheidet. Während ohne LVAD sämtliches Blut, das vom linken Ventrikel ausgeworfen wird, durch die Aortenklappe fließt und diese während der Systole öffnet, ist das LVAD mit seinem Einflusstrakt im linken Ventrikel und seinem Ausflusstrakt an den großen Gefäßen funktionell parallel zur Aortenklappe geschaltet [11, 12]. Dies führt dazu, dass je nach Stärke des Flusses durch das LVAD weniger Blut durch die Aortenklappe fließt. Die Öffnungsfläche und -dauer der Aortenklappe sind verringert [11, 12]. Im Extremfall einer starken mechanischen Unterstützung kann die Aortenklappe sogar ganz geschlossen bleiben. Das LVAD ist dann in Reihe zum Ventrikel geschaltet [11, 12]. Die Strömungsverhältnisse mit und ohne LVAD sind in Abbildung 1 dargestellt.

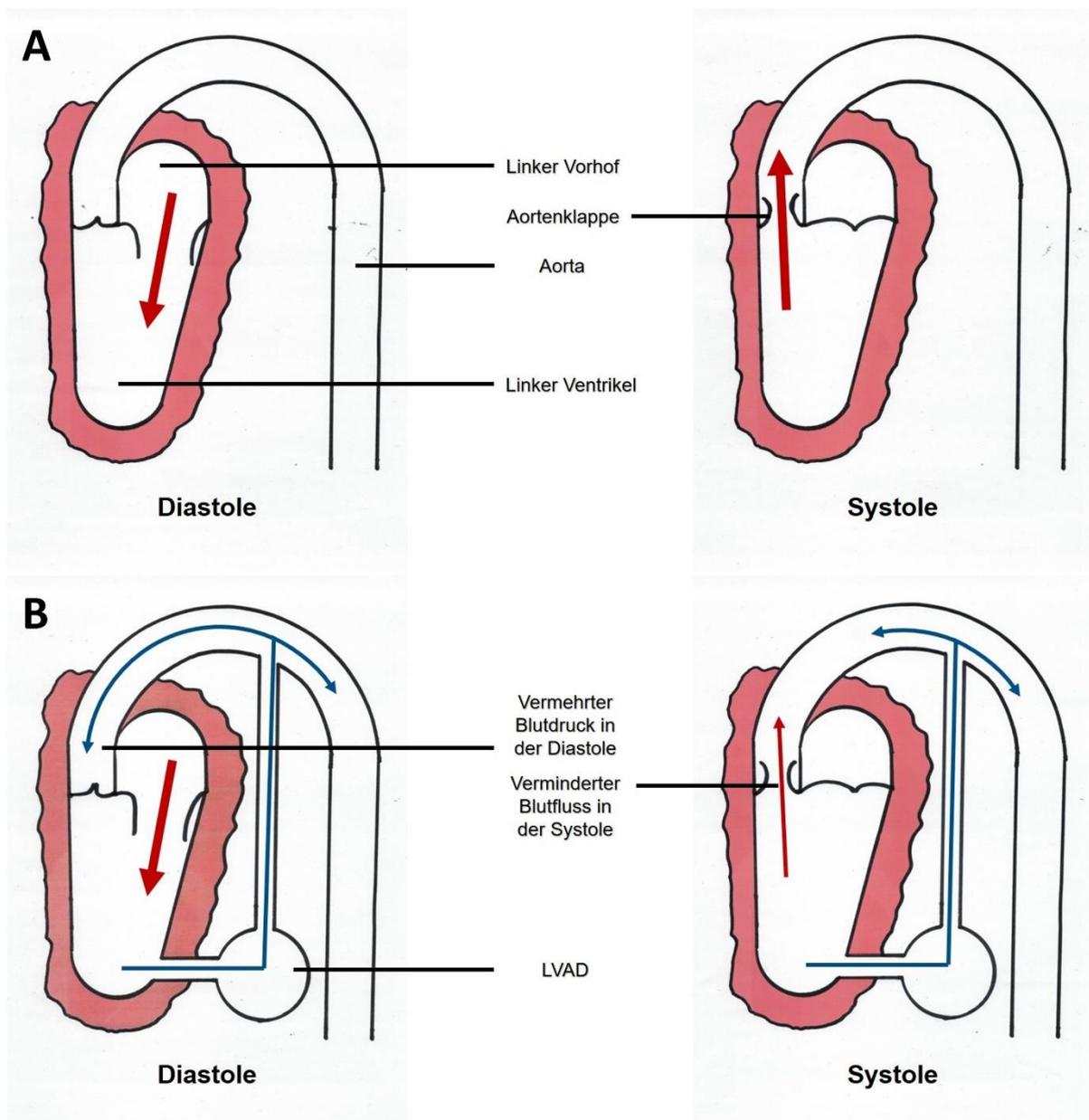


Abbildung 1: Schematische Darstellung des linken Herzens und des Aortenbogens mit Bezeichnung der Strukturen sowie Darstellung der Strömungsverhältnisse und der Öffnung der Mitralklappe in einem Herzen ohne mechanische Kreislaufunterstützung (A) und Darstellung der geänderten Strömungsverhältnisse und der Öffnung der Mitralklappe in einem Herzen mit mechanischer Kreislaufunterstützung (B). LVAD: *left ventricular assist device* (Zeichnung, mit Powerpoint bearbeitet).

## 1.2.2 Anpassungsprozesse des Herzens und der großen Gefäße

Die Steigerung des Herzminutenvolumens und die gleichzeitige Veränderung des Strömungsprofils führt zu morphologischen Veränderungen der beteiligten Strukturen. Der Herzmuskel wird durch das Unterstützungssystem entlastet. Hierdurch kommt es in vielen Fällen zu einer Erholung des Myokards auf zellulärer

oder molekularer Ebene. Dies ermöglicht in seltenen Fällen die Explantation des Unterstützungssystems [13]. Analog zum *bridge-to-transplant* spricht man dann von einem *bridge-to-recovery*-Einsatz des LVAD. Es lässt sich eine signifikant erhöhte Genexpression der Entzündungsmarker Interleukin 1  $\beta$  (IL1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und des Fas-Liganden, eines weiteren Mitglieds der Familie der Tumornekrosefaktoren in Myokardproben von LVAD-Patienten im nach Herztransplantation und Explantation des LVAD gewonnenen Material feststellen [14, 15].

Die Aortenwand und die Wand anderer zentraler Arterien dehnt sich aufgrund ihrer elastischen Eigenschaften innerhalb der Systole aus und die Gefäße geben während der Diastole das so zusätzlich aufgenommene Blut wieder ab. Dieser sogenannte Windkesseneffekt sorgt für eine verbesserte Perfusion der Peripherie in der Diastole [16]. Durch eine Unterstützung mittels eines LVAD mit kontinuierlichem Flussprofil wird dieser Ablauf gestört: es kommt zu einer Entzündungsreaktion, einer Fragmentierung elastischer Fasern, zu einer Dezellularisierung und Sklerose der Media und zu atherosklerotischen Veränderungen innerhalb der Aortenwand im Vergleich zur Aortenwand zum Zeitpunkt der LVAD-Implantation [17, 18].

Weiterhin ändert sich durch ein LVAD auch der Spiegel mehrere Marker im Blut. So sinkt der Spiegel sowohl an Markern der Herzinsuffizienz als auch an Entzündungsmarkern wie dem C-reaktiven Proteins (CRP) [19].

### 1.2.3 Veränderung der Aortenklappe unter LVAD-Therapie

Die Aortenklappe ist unter LVAD-Therapie weniger lange und weniger weit geöffnet und wird von weniger Blut durchströmt [11] bzw. ist phasenweise sogar komplett geschlossen [11]. Die ventrikuläre Seite der Aortenklappe ist somit einem deutlich geringeren Fluss ausgesetzt. Auf die aortale Seite wirkt hingegen ein deutlich höherer arterieller Druck als vor der LVAD-Implantation [20]. Bei Patienten mit LVAD-Unterstützung zeigten sich bei einem signifikant höheren Anteil Verwachsungen der Kommissuren der Aortenklappe [21, 22]. Andererseits kommt es zu einem vermehrten Auftreten und einer Verschlechterung bereits bestehender Aortenklappeninsuffizienz [12, 23-28]. Es kann zu einem verstärkten Rückstrom des Blutes während der Diastole durch die insuffiziente Klappe kommen [23, 24, 29]. Studien zeigen, dass die Ventrikularis der Aortenklappentaschen im Zuge der mechanischen Unterstützung geschädigt wird [30, 31]. Bezüglich der Anwesenheit von Zellen des Immunsystems bestehen widersprüchliche Angaben [22, 31]. Auf molekularer Ebene zeigte sich in Aortenklappen von Herztransplantationspatienten nach LVAD-Einsatz eine

erhöhte Expression von einigen Proteinen, die mit Aktin oder Myosin interagieren, an Entzündungsprozessen beteiligt sind, oder Teil des Signaltransduktionsweges von *Transforming growth factor  $\beta$ 1* sind, [32].

## 1.3 Die Aortenklappe und Aortenklappendegeneration

Die Aortenklappe ist eine Taschenklappe und besteht normalerweise aus drei Aortenklappentaschen welche am Anulus fibrosus befestigt sind. Sie liegt zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta, und ist in der Systole geöffnet und in der Diastole geschlossen [16].

Eine Stenose der Aortenklappe stellt den häufigsten Herzklappenfehler [5] beim Erwachsenen dar und entsteht häufig auf primär-degenerativem Weg. Die Prävalenz der Aortenklappenstenose steigt von 0,2 % in der Altersgruppe von 50-59 Jahren auf 9,8 % in der Altersgruppe über 80 Jahren [33], während eine Sklerose der Aortenklappe bei 27 % der über 65-Jährigen nachweisbar ist [34]. Eine Aortenklappenstenose stellt nach der KHK und der arteriellen Hypertonie die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung dar [35]. Die Lebenserwartung bei symptomatischer Aortenklappenstenose ist je nach Schwere auf 1-3 Jahre limitiert [5], 50 % der Patienten sterben ohne zeitnahen Klappenersatz innerhalb von 2 Jahren [36, 37]. Es besteht bislang keine etablierte pharmakologische Therapie, sodass lediglich interventionelle und operative Optionen bestehen [38, 39].

### 1.3.1 Aufbau und Funktion der gesunden Aortenklappe

Die Aortenklappe ist im gesunden Herzen mit unterschiedlichen mechanischen Herausforderungen konfrontiert. Die ventrikuläre Seite der Klappe ist dem schnellen tangentialen Blutstrom während der Systole und dem hieraus resultierenden Scherstress ausgesetzt. Die aortale Seite muss den systolischen Blutdruck von 120 mmHg, bei Belastung oder Bluthochdruck auch wesentlich mehr, widerstehen [16].



Abbildung 2: Halbschematische Darstellung der Aortenklappe: links humane Klappe nach Movat-Pentachrom gefärbt; rechts schematische Darstellung der Matrixbestandteile und Zellen der Aortenklappe. Die dem Ventrikel zugewandte Seite ist in der Abbildung oben, die aortale Seite unten dargestellt.

Diese unterschiedliche Beanspruchung zeigt sich auch in den histologischen Schichten innerhalb der Klappe, die in Abbildung 3 dargestellt sind. Auf der aortalen Seite liegt die Fibrosa aus straffem, kollagenem Bindegewebe, welches auch mit dem Anulus fibrosus in Verbindung steht [40, 41]. Auf der ventrikulären Seite liegt die Spongiosa aus lockerem elastischem Bindegewebe. Sie besteht aus einem zentralen Bereich, der besonders reich an Hyaluronan und Proteoglykanen [42] ist, und der Ventrikularis, einem Bereich der reich an elastischen Fasern ist und direkt ventrikelseitig liegt [43]. Diese elastischen Fasern sind am Schluss der Klappe beteiligt [43]. Besondere interstitielle Zellen in diesem Bereich, die *valvular interstitial cells* (VIC), die in einer gesunden Klappe einen fibroblastischen Phänotyp haben, bilden die charakteristischen Bestandteile der Extrazellulärmatrix dort [44]. Beide Seiten der Klappe sind mit Endothel überzogen. Eine gesunde Klappe ist frei von Blutgefäßen [16].

### 1.3.2 Mechanismen der Aortenklappendegeneration

Die Degeneration der Aortenklappe ist ein aktiver Vorgang und kann durch die Sequenz bestimmter Ereignisse beschrieben werden. Initial kommt es durch mechanische Belastung zu einer Mikrotraumatisierung und

damit zu einer Schädigung des Endothels [45]. Durch das geschädigte Endothel können Lipide einwandern und sich innerhalb der Klappe ansammeln. Oxidativer Stress führt zu einer oxidativen Modifikation der Lipoproteine, welche die Lipide umhüllen. Dies wirkt proinflammatorisch, Zytokine werden ausgeschüttet und Immunzellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten werden angezogen [46]. Im Zuge der Entzündungsreaktion kommt es zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, welche die VIC aktivieren. Als Reaktion auf die Schädigung und die Entzündung werden vermehrt Bindegewebsbestandteile produziert. Dieser Umbauprozess führt zu einer Fibrose der Herzklappentasche. Im weiteren Verlauf kommt es auch zu einer immer stärkeren Kalzifizierung, welche sich in knochenartigen Knötchen zeigt [47]. Durch den größer werdenden Durchmesser der Herzklappentasche und die damit steigende Diffusionsstrecke kommt es zu hypoxischen Arealen und hierdurch zur Neoangiogenese [48, 49]. Insgesamt ähnelt die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung in ihrer Pathogenese der Atherosklerose [47, 50].

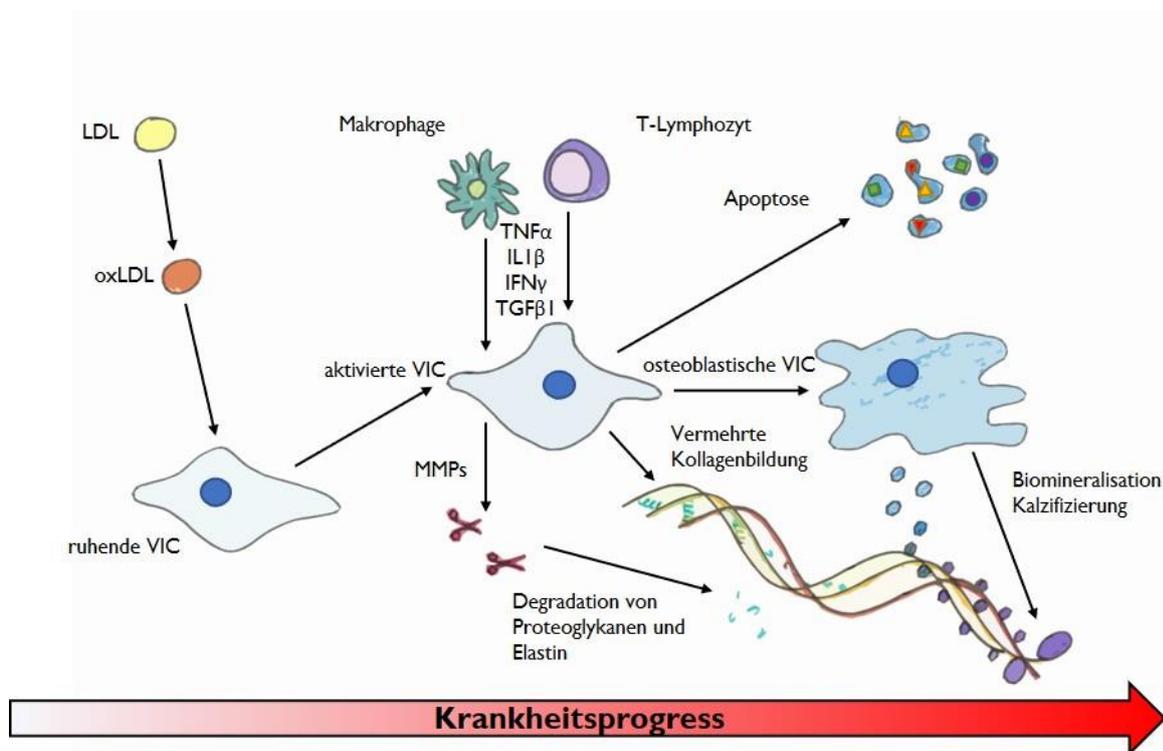


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pathomechanismen der Aortenklappendegeneration. VIC: valvuläre interstitielle Zellen, TGFβ1: Transforming growth factor β1, MMPs: Matrixmetalloproteasen, IL1β: Interleukin 1β, TNFα: Tumornekrosefaktor α, IFNγ: Interferon γ, LDL: low density lipoprotein, oxLDL: oxidierte low density lipoprotein (Zeichnung, mit Powerpoint bearbeitet).

### 1.3.2.1 Risikofaktoren und protektive Faktoren

Bisher wurden neben bikuspidaler Anlage [51, 52] und männlichem Geschlecht [34, 52, 53], einige modifizierbare Risikofaktoren einer Aortenklappendegeneration [34, 50] beschrieben wie Metabolisches Syndrom [54-56] mit Dyslipoproteinämie [57], Adipositas [58] und Diabetes Mellitus, inhalativer Nikotinabusus [52, 53, 58], chronische Niereninsuffizienz [47], systemische Entzündungskonstellation [59] oder Störungen des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels [60, 61]. Es besteht keine etablierte pharmakologische Therapie [38, 39, 62, 63], Statine und Hemmer des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE) sind jedoch mit einer langsameren Zunahme der in der Computertomographie (CT) detektierbaren Kalkakkumulation assoziiert [64, 65].

### 1.3.2.2 Inflammation

Bei 9 der 10 am stärksten hochregulierten Signaltransduktionskaskaden in kalzifizierten Aortenklappen im Vergleich zu gesunden Aortenklappen handelt es sich um Signalwege des Immunsystems [66]. Früh kommt es zur Einwanderung von Makrophagen [46, 67-70] und T-Zellen [49, 71-76]. Dies geht mit einer erhöhten Reaktion auf Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) [77, 78] und einer höheren Sekretion von TNF $\alpha$  [67, 79] und weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Akute-Phase-Proteinen einher [80-82]. Insbesondere die aortale Seite der Aortenklappe reagiert auf Scherstress mit der Expression von Entzündungsmarkern [83], während das Einwandern der Zellen mit dem Druckgradienten über der Klappe korreliert [84]. Die Entzündungsreaktion stimuliert den kalzifizierenden Prozess [85-88].

### 1.3.2.3 Umbau der Klappenmatrix

In gesunden Aortenklappen haben die VIC einen fibroblastenartigen Phänotyp [89] und werden als ruhende VIC bezeichnet [44]. In geschädigten Klappen kommt es durch mechanische [90] sowie parakrine [91-95] und autokrine Einflüsse mittels *transforming growth factor  $\beta$  1* (TGF $\beta$ 1) [96, 97] zu einer Aktivierung der VIC. Aktivierte VICs exprimieren vermehrt  $\alpha$ -Glattmuskelaktin ( $\alpha$ SMA) [98] und Kollagen [99] sowie vermindert Vimentin [100]. Aktivierte VIC zeigen vermehrte Sekretion und Degradation von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix sowie Expression von sowohl Matrixmetalloproteasen (MMP) als auch den gewebeständigen Inhibitoren der MMP [101, 102]. Auch Migration, Proliferation und Apoptose sind bei aktivierten VIC ausgeprägter [96]. Insgesamt können diese Mechanismen neben der Regeneration von Defekten auch zu

Fibrose, Neoangiogenese, chronischer Entzündung und Kalzifizierung führen [44, 96, 101-103]. Durch Scherstress kommt es über IL1B [67, 104], TNF $\alpha$  und Osteopontin [105] vermittelt auch zu einer vermehrten Aktivität der Gelatinasen MMP2 und MMP9 [95, 106-108]. Neben der Degradierung und Verminderung von Elastin [109] kommt es auch zu einer Desorganisation von Kollagen und Proteoglykanen [110]. Durch vermehrte Produktion von Kollagen Typ 1 und Typ 3 [111] führt der Umbauprozess insgesamt zu einer auch echokardiographisch feststellbaren Verdickung der Aortenklappentasche [102, 110, 112, 113].

#### 1.3.2.4 Kalzifizierung

Der Kalzifizierungsprozess stellt einen aktiv regulierten Prozess [112, 114] dar und ähnelt einer nonenchondralen, das heißt ohne Knorpelbeteiligung stattfindenden, Osteogenese [115, 116]. Die aktivierten VIC differenzieren weiter zu einem osteoblastischen Phänotyp [44, 114, 117, 118] und exprimieren verstärkt Alkalische Phosphatase (ALP) [79, 119-121], Osteopontin (OPN) und Osteocalcin (OCN) [56, 114, 122]. Da nur wenige Makrophagen einen osteoklastischen Phänotyp entwickeln kommt es in Summe zu einem Überwiegen osteoblastischer Aktivität und damit zur Biomineralisation des im Zuge des Umbaus der Extrazellulärmatrix akkumulierten Kollagens [123-126]. In kalzifizierten Aortenklappentaschen kommt es zu Mikrofrakturen mit sekundärer Kalzifizierung und zu Neoangiogenese [49, 116]. Die kalzifizierten Läsionen kommen mikroskopisch, zum Beispiel in der Von-Kossa-Färbung [127], aber auch makroskopisch [114] und CT-morphologisch zur Darstellung [112, 128].

#### 1.3.2.5 Therapie der Kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung

Da eine etablierte medikamentöse Therapie fehlt bestehen zur Behandlung der Aortenklappenstenose interventionelle und chirurgische Möglichkeiten mit Einsatz mechanischer Prothesen und Bioprothesen [129-131]. Bioprothesen benötigen im Gegensatz zu mechanischen Prothesen keine lebenslange Antikoagulation [129, 131, 132], die Haltbarkeit ist jedoch eingeschränkt [131, 132]. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Haltbarkeit besteht in der Verwendung von humanen, dezellularisierten Transplantaten anstelle von Xenotransplantaten [133, 134]. Hierfür werden beispielsweise Transplantate aus dem Herz des Empfängers der Herztransplantation verwendet [133].

## 1.4 Ziel der Arbeit und Hypothese

Das Ziel der Arbeit besteht darin, festzustellen, ob ein LVAD zu degenerativen Veränderungen in der Aortenklappe führt und welche Mechanismen zu Grunde liegen. Die Aortenklappen von Patienten, welche eine mechanische Kreislaufunterstützung mittels eines LVAD erhalten haben werden hinsichtlich degenerativer Veränderungen mit Aortenklappen von Patienten ohne LVAD verglichen. Als Reaktion auf das durch den Einbau des LVAD veränderte Strömungsverhalten erwarte ich die Einleitung von Umbau- und Anpassungsprozessen innerhalb der Aortenklappe erwarten. Weiterhin erwarte ich, dass diese den Veränderungen im Zuge der Pathogenese einer kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung ähneln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Herkunft und Gewinnung der Aortenklappen

Gemäß der aktuellen Revision der Deklaration von Helsinki zu „Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen“ lagen für sämtliche humane Proben Einwilligungserklärungen der Patienten vor. Ausschlusskriterien für die Entnahme humanen Materials waren eine lokale Entzündung des Materials, zum Beispiel eine Endokarditis, oder eine Infektion des Patienten mit humanem Immundefizienzvirus und Hepatitis-B- oder -C-Viren. Die Lagerung der Klappentaschen und kryoeingebetteter Klappenteile erfolgte in flüssigem Stickstoff bei einer Zieltemperatur von  $-165^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.1.1 Herkunft der HTx-Proben

Wird vom Universitätsklinikum Düsseldorf ein Organangebot zur Herztransplantation angenommen, wird hierüber auch die Arbeitsgruppe „Experimentelle Chirurgie“ informiert und nach einem für diese Zwecke eingerichteten Dienstplan wird der entsprechende, diensthabende Mitarbeiter informiert. Es wurden nach erfolgter Herztransplantation aus dem entnommenen Herzen von einem der anwesenden Ärzte Gewebeproben entnommen. Als erstes werden hierbei die Taschen der Aortenklappe entnommen, photographisch dokumentiert und kryokonserviert. Während eine der Taschen in steriles PBS überführt wird, werden die anderen Taschen in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt. Die in Kryoröhrchen konservierten Aortenklappentaschen werden für die Untersuchung mittels CT sowie die RNA-Isolation verwendet. Die in PBS überführten Proben werden direkt anschließend an die HTx in vier gleichgroße Stücke präpariert.

Jeweils zwei werden in Formaldehyd zur Parafineinbettung verwendet. Die anderen beiden werden für Gefrierschnitte verwendet. Hierzu wird zunächst ein *Cryomold* mit *CryoCompound* befüllt, das Präparat der Klappe hineingelegt und in mit flüssigem Stickstoff vorgekühltem Isopentan eingefroren. Fällt im Zuge einer Aortenklappenersatz-Operation Gewebe an, so werden die Taschen der entfernten Klappen ebenfalls photographisch dokumentiert und anschließend in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

## 2.2 PCR

### 2.2.1 RNA-Isolation

In 13ml-Reaktionsgefäße mit rundem Boden wurden 1000 µl TRIzol vorgelegt. In jeweils eines der Reaktionsgefäße wurde eine der gefrorenen, humanen Aortenklappentaschen von HTx-Patienten überführt und mit dem Homogenisator für ca. 20 s zerkleinert. Das Homogenisat wurde nun in 2 ml Mikroreaktionsgefäße überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und vermischt, bis keine getrennten Phasen mehr erkennbar waren. Nach ca. 5 min Inkubationszeit wurden die Mikroreaktionsgefäße für 20 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Es bilden sich von oben nach unten eine wässrige Chloroformphase, eine Interphase und eine TRIzolphase. Die wässrige Chloroformphase, wurde vorsichtig abpipettiert und mit dem gleichen Volumen Ethanol 70 % versetzt und in mehreren Läufen bei Raumtemperatur auf jeweils eine *QIAGEN*-Säule pro Probe gegeben. Ab hier erfolgte die weitere Aufreinigung nach Herstellerangaben des *QIAGEN RNeasy Mini Kit* (Protokoll „RNA-Clean up“).

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde unter Einsatz einer photometrischen Extinktionsbestimmung bei 230 nm, 260 nm und 280 nm ermittelt. Für die ersten 8 Proben wurde darüber hinaus eine Bestimmung des RIN-Wertes mittels *Agilent Chip* durch das biologisch-medizinische Forschungszentrum der Universität Düsseldorf vorgenommen, wodurch die Qualität des Isolationsverfahrens kontrolliert wurde und die Erwartungen entsprechender Vorversuche für humane Proben validiert wurden.

### 2.2.2 Abweichungen vom Isolationsprotokoll im Zuge der Vorversuche

Im Zuge der Vorversuche an ovinen Klappen wurden abweichend vom oben beschriebenen Protokoll für humane Proben andere Geräte benutzt:

- Metallmörser: Dieser wurde in flüssigem Stickstoff gekühlt und die gemörserte Klappentasche wurde mit einem ebenfalls gekühlten Spatel in das 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 1000 µl Trizol versetzt
- *Pellet pestle*: Hierbei wurde die Klappe in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß mit 1 ml vorgelegtem Trizol überführt und anschließend auf Eis mit Hilfe des *pellet pestles* innerhalb von 15 Minuten homogenisiert.
- die Kombination aus Metallmörser und anschließend *pellet pestle*

Darüber hinaus wurde das Protokoll dahingehend variiert, dass nach dem ersten Zentrifugationsschritt die wässrige Chloroformphase nicht direkt mit Ethanol versetzt wurde, sondern mit 500 µl Isopropanol versetzt wurde. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bei 11000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet, der überbleibende Bodensatz wurde mit 1 ml Ethanol 75 % gewaschen und anschließend erneut bei 8600 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgeschüttet und der Bodensatz für 2 min antrocknen gelassen und auf Eis gelagert. Nachdem das Sediment in 100 µl RNAse-freiem Wasser gelöst und mit 250 µl Ethanol 100 % und 350 µl RLT+DTT-Puffer aus dem *QIAGEN RNeasy Mini Kit* versetzt wurde konnte es auf die *QIAGEN*-Säule gegeben werden. Ab hier lief die Isolation wie oben beschrieben nach Herstellerangaben ab.

### 2.2.3 Bestimmung der RNA-Integrität

Zur Kontrolle der Qualität der isolierten RNA wurde der Wert der *RNA integrity number* (RIN) bestimmt. Die Analyse des RIN-Wertes wurde durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

### 2.2.4 cDNA-Umschreibung

Die RNA wurde vorbereitend zur PCR nach Herstellerangaben des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde jeweils das Volumen, welches 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben, in 20 µl gelöst und mit 80 µl RNAse-freiem Wasser verdünnt.

## 2.2.5 real time PCR

Bei der Polymerase Kettenreaktion kann anhand der Amplifikationsgeschwindigkeit bestimmter Gene auf die cDNA- und somit RNA-Ausgangskonzentration in der Probe rückgeschlossen werden. Die RNA-Konzentration wird als analog zur Genexpression gesehen. Die Polymerasekettenreaktion wurde mit einem *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System* durchgeführt. Hierzu wurden 96-Loch-Flachbodenplatten (*96 well plate*) sowie der *GoTaqR qPCR Master Mix* der Firma Promega verwendet. In jeder Kavität (*well*) wurden 10 µl mit dem passiven Referenzfarbstoff ROX versetzter qPCR Mastermix, 7,4 µl RNase-freies Wasser, 0,3 µl Vorwärtsprimer (*forward primer*) und 0,3 µl Rückwärtsprimer (*reverse primer*) vorgelegt und 2 µl der jeweiligen Probe hinzugefügt. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Für jedes Primerpaar waren zwei Negativkontrollen pro Platte vorhanden bei denen statt einer Probe 2 µl RNase-freies Wasser zugegeben wurden. Darüber hinaus wurde auf jeder Platte eine Vergleichsprobe mitgezogen um die einzelnen Platten bei Auffälligkeiten besser miteinander vergleichen zu können. Hierbei handelte es sich als Probe um ein Isolat aus humanem Myocard und als Primer um den Primer des sogenannten *housekeeping*-Gens. Das *housekeeping*-Gen stellt ein nach Möglichkeit nicht oder nur wenig reguliertes Gen dar, welches somit die allgemeine Genexpression des Gewebes repräsentiert und mit den regulierten Genen, die untersucht werden sollen, in Relation gesetzt werden kann um das Ausmaß der Regulation anzuzeigen. Aufgrund vorhergehender Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe wurde zu diesem Zweck das Ribosomale Protein L13A (RPL13A) verwendet, welches Teil der 60S-Untereinheit des Ribosoms ist und als solches ubiquitär exprimiert wird.

Als Marker für entzündliche Prozesse wurden diese Primer verwendet:

- Interleukin 1β (**IL1β**):  
*forward*-Sequenz 5'-AGCTGATGGCCCTAACAGA-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-GGAGATTCGTAGCTGGATGC-5'
- Tumornekrosefaktor α (**TNFα**):  
*forward*-Sequenz 5'-CTGCTGCACTTTGGAGTGAT-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-5'
- Interferon γ (**IFNγ**):  
*forward*-Sequenz 5'-GAGTGTGGAGACCATCAAGGA-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-GCGTTGGACATTCAAGTCAG-5'

Als Marker für Gewebeumbau wurden diese Primer verwendet:

- Transforming growth factor  $\beta$ 1 (**TGF $\beta$ 1**):  
*forward*-Sequenz 5'-CTGAACCCGTGTTGCTCTC-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-GAGGTATCGCCAGGAATTGT-5'
- Matrixmetalloprotease 2 (**MMP2**):  
*forward*-Sequenz 5'-GCTCAGATCCCGTGGTGAGAT-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-GGTGCTGGCTGAGTAGATCC-5'
- Matrixmetalloprotease 9 (**MMP9**):  
*forward*-Sequenz 5'-ACGCAGACATCGTCATCCAG-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-CAGGGACCACAACCTCGTCAT-5'

Als Marker für chondro-osteogene Differenzierung wurden diese Primer verwendet:

- Osteopontin (**OPN**):  
*forward*-Sequenz 5'-TTGCAGTGATTTGCTTTTGC-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-GCCACAGCATCTGGGTATTT-5'
- Alkalische Phosphatase (**ALP**):  
*forward*-Sequenz 5'-CTACCTGTGTGGGGTGAAGG-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-GGTCACAATGCCACAGATT-5'
- Osteocalcin (**OCN**):  
*forward*-Sequenz 5'-GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-CTCCCAGCCATTGATACAGG-5'

Als Referenzmarker wurde der folgende Primer verwendet:

- Ribosomales Protein L13A (**RPL13A**):  
*forward*-Sequenz 5'-GTACGCTGTGAAGGCATCAA-3';  
*reverse*-Sequenz 3'-GTTGGTGTTTCATCCGCTTG-5'

Am PCR-Gerät wurde der Denaturierungs-Hybridisierungs-Elongations-Zyklus nach Herstellerangaben durchgeführt und die relative Genexpression nach  $\Delta\Delta$ CT-Methode bestimmt [135].

## 2.3 Histologie

Von den kryoeingebetteten Proben wurden mit dem Kryostat 5  $\mu$ m dünne Schnitte durch Spitze und Basis der Aortenklappentaschen angefertigt und pro Objektträger wurden 2 konsekutive Schnitte fixiert. Die so

angefertigten Gefrierschnitte wurden sowohl für die Histologie als auch für die Immunhistochemie verwendet.

### 2.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)

Die HE-Färbung besteht aus einer Färbung azidophiler Zellbestandteile mit dem roten Farbstoff Eosin und einer Gegenfärbung basophiler Zellteile, zum Beispiel des Kerns, mit bläulich-schwarzem Hämatoxylin.

Das Färbeprotokoll lautete:

- 1 min in Hämatoxylin
- 1 min in Aqua dest.
- 1 min in 5 % Essigsäure (frisch angesetzt)
- 1 min in Aqua dest.
- 2 min in fließendes Leitungswasser
- 1 min in 70 % Ethanol
- 15 min in Eosin B (bestehend aus 1 g Eosin, 100 ml Aqua dest., 100 ml 100 % Ethanol, 200 µl konzentrierte Essigsäure)
- aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 96 %, 2x 99 % Ethanol, 2x Xylol) für jeweils 1 min

Die Schnitte werden mit *RotiHistokit* eingedeckt. Als Positivkontrolle wurden humane Myokardschnitte mitgeführt.

### 2.3.2 Von-Kossa-Färbung

Die Von-Kossa-Färbung stellt eine indirekte Phosphatfärbung zum Nachweis von Verkalkungen da. In einem ersten Schritt wird Silbernitratlösung auf die Objektträger gegeben. Die Silberionen verdrängen die Kalziumionen aus ihren Phosphaten und Karbonaten. Durch anschließende Belichtung werden die Silberionen reduziert, an das elementare Silber können sich weitere Silberionen anlagern. Durch Natriumkarbonatformaldehyd und Natriumthiosulfat wird die Färbung fixiert und überschüssiges Silber entfernt. Die Bereiche, wo sich vorher Kalziumphosphat oder -karbonat befanden, stellen sich nun braun-schwarz dar, mit Kern-echtrot werden Zellkern und Zytoplasma rot gegengefärbt.

Das Färbeprotokoll lautete:

- 8 min in Aceton bei -20°C

- 5 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug trocknen lassen
- kurz in Aqua dest. tauchen
- 60 min in 5 % Silbernitratlösung (bestehend aus 10 g Silbernitrat, 200 ml Aqua dest.), das Gefäß wird hierbei belichtet, Gefäß und Lampe sind mit Alufolie eingepackt
- 3x 3 min in Aqua dest.
- 2 min in Natriumkarbonatformaldehydlösung (bestehend aus 10 g Natriumcarbonat, 50 ml Formaldehyd, 150 ml Aqua dest.)
- 10 min in fließendes Leitungswasser
- 5 min in Natriumthiosulfatlösung (bestehend aus 10 g Natriumthiosulfat, 200 ml Aqua dest.)
- 15 min in fließendes Leitungswasser
- 3 min in Aqua dest.
- 10 min in Kernechtrotaluminiumsulfat
- 3 min in Aqua dest.
- aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 96 %, 2x 99 % Ethanol, 2x Xylol) für jeweils 2 min

Die Schnitte wurden mit *RotiHistokit* als eingedeckt. Als Positivkontrolle wurde rattine verkalkte Aorta mitgeführt.

### 2.3.3 Movat-Pentachrom-Färbung

Die Movat-Pentachrom-Färbung stellt eine Übersichtsfärbung da, die zwischen mehr Gewebetypen differenzieren kann als die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Zunächst werden basophile Mukopolysaccharide mit Alzianblau blau gefärbt. Anschließend werden Kerne und elastische Fasern mit Weigerts Eisenhämatoxylin schwarz eingefärbt. Brilliant-Crocein-Säurefuchsin färbt acidophile Gewebebestandteile, hauptsächlich Fibrin, Kollagen, Retikulin und das Plasma von Muskelzellen, rot. Kollagen und Retikulin werden mit Phosphorwolframsäure wieder entfärbt um anschließend mit alkoholischem Safran erneut, nunmehr in Gelb, angefärbt zu werden. Bereiche der extrazellulären Matrix stellen sich als Summe aus gelben Kollagen und blauen Glykosaminoglykanen grün dar.

Das Färbeprotokoll lautet:

- Objektträger über Nacht bei 37°C inkubieren
- Bouins Lösung (bestehend aus 300 ml Pikrinsäure, 100 ml 37 % Formaldehyd, 20 ml 100 % Essigsäure) auf 50°C erhitzen
- 5 min in Aqua dest.

- 10 min in 4 % Formaldehydlösung
- 5 min in Aqua dest.
- 10 min in erhitzter Bouins Lösung
- 10 min unter fließendem, kaltem Leitungswasser
- 5 min in 5 % Natriumthiosulfatlösung (bestehend aus 10 g Natriumthiosulfat, 200 ml Aqua dest.)
- Alkalischer Alkohol (bestehend aus 360 ml 96 % Ethanol, 40 ml 30% Ammoniumhydroxid) auf 60°C erhitzen
- 2 min, 2 min und 1 min in Aqua dest.
- 20 min in 1 % Alzianblau (bestehend aus 2 g Alzianblau, 200 ml Aqua dest.)
- 3 min 30 s unter fließendem Leitungswasser
- 10 min in erhitztem alkalischem Alkohol
- 3 min 30 s unter fließendem Leitungswasser
- Weigerts Eisenhämatoxylin (bestehend aus 1,2 g Hämatoxylin, 60 ml 96 % Ethanol, 40 ml Eisenchlorid, 1,2 g Jod, 2,4 g Kaliumjodid, 20 ml Aqua dest.) frisch ansetzen
- 9 min in Weigerts Eisenhämatoxylin
- 1 min unter fließendem, kaltem Leitungswasser
- 2 min, 2 min und 1 min in Aqua dest.
- Brilliant-Crocein-Säurefuchsin (bestehend aus 0,8 g Brilliant-Crocein-R, 0,02 g Säurefuchsin, 0,1 ml 100 % Essigsäure, 99,5 ml Aqua dest.) frisch ansetzen
- 1 min in Brilliant-Crocein-Säurefuchsin
- 2 min, 2 min und 1 min in Aqua dest.
- 5 min in 5 % Phosphorwolframsäure (bestehend aus 25 g Phosphorwolframsäure, 500 ml Aqua dest.)
- 5 min in 1 % Essigsäure
- 2 min, 2 min und 1 min in Aqua dest.
- aufsteigende Alkoholreihe (96 %, 2x 99 % Ethanol) für jeweils 1 min
- 8 min in alkoholischem Safran (bestehend aus 12 g Safran du gatinais, 200 ml, 99 % Ethanol)
- aufsteigende Alkoholreihe abschließen (2x 99 % Ethanol) für jeweils 1 min; (3x Xylol) für jeweils 5 min

Die Schnitte werden mit *RotiHistokit* eingedeckt. Als Positivkontrolle wurde humanes Myokard verwendet.

## 2.3.4 Photographische Auswertung

Die Objektträger wurden bei 50-facher optischer Vergrößerung (5-fach Objektiv und 10-fach Okular) an einem DM2000 Lichtmikroskop (Leica) mit der Software *Leica Application Suite* Version 3.8 aufgenommen. Aus den Einzelbildern wurde eine Abbildung der gesamten Klappentaschen mit Hilfe des *stitching*-Werkzeugs aus *ImageJ 1.51w* rekonstruiert [136].

## 2.4 Immunhistochemie

### 2.4.1 Immunfluoreszenz Standardprotokoll

Bei der Immunfluoreszenz werden die Objektträger nacheinander mit einem Primär- und einem Sekundärantikörper, welcher an ein Fluorophor gekoppelt ist, inkubiert. Zur Darstellung der Kerne erfolgte eine Gegenfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) welches in doppelsträngige DNA interkaliert. Da auf jedem Objektträger zwei konsekutive Schnitte platziert wurden, konnte ein Schnitt ohne Inkubation mit Primärantikörper mit ansonsten gleichbleibendem Färbeprotokoll behandelt werden und als Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper fungieren.

Das Färbeprotokoll lautete:

- 10 min in 4 % Formaldehydlösung
- 3x 1 min in PBS (Aqua dest. mit 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 10 min in 0,25 % Triton X (bestehend aus 100 ml PBS, 250 µl Triton X)
- 3x 1 min in PBS
- 60 min in 5 % BSA-Lösung (bestehend aus 100 ml PBS, 100 µl Tween-20, 5 g BSA)
- 3x 1 min in 0,1 %-Tween-20-Lösung (bestehend aus 100 ml PBS, 100 µl Tween-20)
- 2x 1 min in PBS
- 60 min in Feuchtkammer bei 37°C mit 50 µl Primärantikörperlösung (bestehend aus 1 % BSA-Lösung (bestehend aus 100 ml PBS, 100 µl Tween-20, 1 g BSA) mit gelöstem Primärantikörper) pro Schnitt. Auf den zweiten Schnitt desselben Objektträgers werden 50 µl 1 % BSA-Lösung ohne Primärantikörper gegeben.
- 3x 5 min in 0,1 % Tween-20-Lösung
- 2x 1 min in PBS

- 45 min in Feuchtkammer bei 37°C mit 50 µl Sekundärantikörperlösung (bestehend aus 1 % BSA-Lösung mit gelösten Sekundärantikörpern) pro Schnitt
- 10 min in Feuchtkammer mit 50 µl DAPI (bestehend aus 0,1 % DAPI in PBS)
- 3x 5 min in PBS
- 1 min in Aqua dest.
- Kurz in 99,5 % Ethanol eintauchen

Die Schnitte wurden mit wässrigem Leica Eindeckmedium eingedeckt.

## 2.4.2 CD3/CD68-Doppelfärbung

Die folgenden Antikörper wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet:

- Kaninchen-anti-CD3 von *Sigma* in 1:300-Verdünnung
- Maus-anti-CD68 von *abcam* in 1:200-Verdünnung

als Primärantikörper und

- Ziege-anti-Kaninchen mit dem Fluorophor „Alexa 488“ von *invitrogen* in 1:200-Verdünnung
- Ziege-anti-Maus mit dem Fluorophor „Alexa 546“ von *invitrogen* in 1:200-Verdünnung

als Sekundärantikörper.

Als Positivkontrolle wurde Rattenmilz mitgeführt.

## 2.4.3 Vimentin-αSMA-Doppelfärbung

Die folgenden Antikörper wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet:

- Kaninchen-anti-αSMA von *abcam* in 1:100-Verdünnung
- Meerschweinchen-anti-Vimentin von *Progen* in 1:200-Verdünnung

als Primärantikörper und

- Ziege-anti-Kaninchen mit dem Fluorophor „Alexa 546“ von *life technologies* in 1:200-Verdünnung
- Ziege-anti-Meerschweinschen mit dem Fluorophor „Alexa 488“ von *life technologies* in 1:200-Verdünnung

als Sekundärantikörper.

Als Positivkontrolle wurde humanes Myokard mitgeführt.

## 2.4.4 3,3'-Diaminobenzidin Standardprotokoll

Die 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung gleicht grundsätzlich der Immunfluoreszenz, da die Objektträger auch für die DAB-Färbung mit Primär- und Sekundärantikörper behandelt werden. Der Sekundärantikörper ist in diesem Fall jedoch nicht an einen Fluorophor gekoppelt, sondern an ein Enzym, die Meerrettichperoxidase. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid wird DAB zu einem Hydroperoxid umgesetzt, welches braun gefärbt ist und im entsprechenden Bereich des Präparates präzipitiert. Mit Mayers Hämalaun erfolgt eine Gegenfärbung der Kerne. Da auf jedem Objektträger zwei konsekutive Schnitte platziert wurden, konnte einer ohne Inkubation mit Primärantikörper mit ansonsten gleichbleibendem Färbeprotokoll behandelt werden und als Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper fungieren.

Das Färbeprotokoll lautet:

- 10 min in 4 % Formaldehydlösung
- 3x 1 min in PBS (Aqua dest. mit 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 10 min in 0,25 % Triton X (bestehend aus 100 ml PBS, 250 µl Triton X)
- 3x 1 min in PBS
- 60 min in 5 % BSA-Lösung (bestehend aus 100 ml PBS, 100 µl Tween-20, 5 g BSA)
- 1 min in PBS
- 60 min in Feuchtkammer mit 50 µl Primärantikörperlösung (bestehend aus 1 % BSA-Lösung (bestehend aus 100 ml PBS, 100 µl Tween-20, 1 g BSA) mit gelöstem Primärantikörper) pro Schnitt. Auf den zweiten Schnitt desselben Objektträgers werden 50 µl 1 % BSA-Lösung ohne Primärantikörper gegeben.
- 1 min in PBS
- 10 min in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung
- 3x 5 min in PBS
- 45 min in Feuchtkammer mit 50 µl Sekundärantikörperlösung (bestehend aus 1 % BSA-Lösung mit gelösten Sekundärantikörpern) pro Schnitt
- 3x 5 min in PBS
- 10 min in TB-Puffer (bestehend aus 1 l Aqua dest. und 60,57 g Tris-Aminomethan)
- Inkubation mit DAB (Dauer je nach Antikörper unterschiedlich)
- 5 min in TB-Puffer

- 1 min in Aqua dest.
- 1 min in Mayers Hämalaunlösung
- kurz in Leitungswasser tauchen
- kurz in 1 % HCl-Lösung tauchen
- 5 min unter fließendem Leitungswasser
- 1 min in Aqua dest.
- kurz in 99 % Ethanol eintauchen

Die Schnitte wurden mit *RotiHistokit* eingedeckt.

### 2.4.5 Kollagen Typ 1

Die folgenden Antikörper wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet:

- Ziege-anti-Kollagen Typ 1 von *Millipore* in 1:20-Verdünnung

als Primärantikörper und

- Kaninchen-anti-Ziege mit Meerrettichperoxidase von *Dianova* in 1:500-Verdünnung

als Sekundärantikörper.

Die DAB-Einwirkzeit betrug 5 min. Als Positivkontrolle wurde humanes Myokard mitgeführt.

### 2.4.6 Elastin

Die folgenden Antikörper wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet:

- Kaninchen-anti-Elastin von *Abcam* in 1:50-Verdünnung

als Primärantikörper und

- Ziege-anti-Kaninchen mit Meerrettichperoxidase von *Dianova* in 1:500-Verdünnung

als Sekundärantikörper.

Die DAB-Einwirkzeit betrug 6 min. Als Positivkontrolle wurde humanes Myokard mitgeführt.

## 2.4.7 Biglykan

Die folgenden Antikörper wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet:

- Kaninchen-anti-Biglykan von *LF* in 1:500-Verdünnung

als Primärantikörper und

- Ziege-anti-Kaninchen mit Meerrettichperoxidase von *Dianova* in 1:500-Verdünnung

als Sekundärantikörper.

Die DAB-Einwirkzeit betrug 6 min. Als Positivkontrolle wurde humanes Myokard mitgeführt.

Es wurde ein zu Beginn abweichendes Protokoll mit einem Chondroitinase-Verdau verwendet:

- 10 min in 4 % Formaldehydlösung
- 3x 1 min in PBS (Aqua dest. mit 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 60 min in Feuchtkammer mit 50 µl Chondroitinase-Lösung (bestehend aus ABC-Puffer (bestehen aus 100 ml Aqua dest. mit 51 mM NaCl, 97,7 mM Natriumacetat-Trihydrat und 0,6 g Tris-Aminomethan sowie 100 mg BSA bei einem pH-Wert von 8) mit gelöster Chondroitinase [1:100-Verdünnung]) pro Schnitt.
- 3x 1 min in PBS
- 60 min in Blockierlösung (bestehend aus 100 ml Aqua dest., 20 ml 10x TBS (bestehend aus 1 l Aqua dest. mit 1400 mM NaCl und 24,2 g Tris-Aminomethan bei einem pH-Wert von 7,6), 20 ml fetales Kälberserum und 1 g BSA
- 1 min in PBS
- 60 min in Feuchtkammer mit 50 µl Primärantikörperlösung (bestehend aus 1 % BSA-Lösung (bestehend aus 100 ml PBS, 100 µl Tween-20, 1 g BSA) mit gelöstem Primärantikörper) pro Schnitt. Auf den zweiten Schnitt desselben Objektträgers werden 50 µl 1 % BSA-Lösung ohne Primärantikörper gegeben.
- 1 min in PBS

Ab hier wurde wieder dem Standardprotokoll gefolgt.

## 2.4.8 MMP2

Die folgenden Antikörper wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet:

- Kaninchen-anti-MMP2 von *Abcam* in 1:500-Verdünnung

als Primärantikörper und

- Ziege-anti-Kaninchen mit Meerrettichperoxidase von *Dianova* in 1:500-Verdünnung

als Sekundärantikörper.

Die DAB-Einwirkzeit betrug 6 min. Als Positivkontrolle wurde humanes Myokard mitgeführt.

## 2.4.9 Photographische Auswertung

Die Objektträger der DAB-Färbungen von Kollagen Typ 1, Elastin und Biglykan wurden bei 200-facher optischer Vergrößerung (20-fach Objektiv und 10-fach Okular) und die DAB-Färbung von MMP2 wurde bei 400-facher optischer Vergrößerung (40-fach Objektiv und 10-fach Okular) mittels Mikroskopenkamera aufgenommen. Die Aufnahmen der Proben und Negativkontrollen erfolgten unter Verwendung von „*Leica Application Suite*“

## 2.5 Bestimmung des Kalziumgehalts mit kolorimetrischem Assay

Der Kalzium-Assay anhand eines kolorimetrischen Nachweises diente der Bestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts einer Probe. Hieraus kann Rückschluss auf den Kalzifizierungsgrad der entsprechenden Probe gezogen werden. Hierfür wurde der *Calcium Assay Kit* von *Abnova* nach Herstellerangaben verwendet. Zur Normierung wurde der Gesamtprotein-Gehalt der Proben mittels *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* von *ThermoFisher* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte an einem Plattenlesegerät (*Tecan Reader infinite M1000 PRO*) nach Herstellerangaben.

## 2.6 Kalziumbestimmung mittels Computertomographie

Die Computertomographie (CT) stellt ein bildgebendes Verfahren der konventionellen Radiologie dar, bei welchem ein Objekt aus unterschiedlichen Richtungen mit Röntgenstrahlen bestrahlt wird und

Röntgendichtewerte für unterschiedliche Bereiche im Raum berechnet werden, die anschließend in Form von Schnittbildern dargestellt werden können.

### 2.6.1 Agatston-Kalk-Score

Der Agatston-Kalk-Score basiert auf der höheren Röntgendichte kalzifizierter Gefäßareale gegenüber gesunden oder fibrotischen Gewebeanteilen [137]. In der von Arthur Agatston beschriebenen Verwendung bezieht sich der Score auf Koronargefäße. Hierfür ist ein Schwellenwert für die Röntgendichte von 130 Hounsfield units (HU) im am UKD verwendeten Radiologieprogramm *syngo.via* des Herstellers Siemens Healthcare GmbH voreingestellt. Innerhalb einer CT-Schnittbildserie erkennt das Programm alle Voxel mit einer Röntgendichte oberhalb des Schwellenwerts und hebt diese farblich hervor. Die einzelnen dreidimensionalen Gruppen an Voxeln können nun markiert und bis zu 4 Gruppen zugeordnet werden, welche nach den großen Koronargefäßen benannt sind. Durch Markieren aller Areale die in der Bilderserie innerhalb eines jeweiligen Kryoröhrchens liegen, können sämtliche Kalkläsionen innerhalb einer darin befindlichen Klappentasche gruppiert werden. Das Programm errechnet das Volumen der markierten Areale und hieraus proportional die Masse an Kalziumhydroxylapatit und den sogenannten Agatston-Äquivalent-Score aus.

Angelehnt an ähnliche, in der Literatur beschriebene Versuche kam das Verfahren auch mit Schwellenwerten von 450, 1200 und 2000 HU zum Einsatz [128].

## 2.7 Statistik

Die Patientendaten werden im Folgenden als Mittelwert  $\pm$  mittlerem Standardfehler (SEM) angegeben. Bei den Graphiken zu den Daten der PCR oder der CT-Kalziumbestimmung wurde die Darstellung Median  $\pm$  Interquartilsabstand in Analogie zum Testverfahren gewählt. Da die Daten nicht durchgehend normalverteilt waren, wurden zur statistischen Auswertung nicht-parametrische Test verwendet. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde ein Mann-Whitney-u-Test angewendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet und anschließend als *Post-hoc*-Test ein Mehrfachvergleich nach Dunn, welcher die verschiedenen Gruppen einzeln miteinander vergleicht. Beim Vergleich dichotomer Variablen wurde ein Chi-Quadrat-Test verwandt. Angegeben wird das Signifikanzniveau  $p$ , wobei Werte  $<0,05$  als signifikant angesehen wurden

Korrelationen wurden mit Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman analysiert. Angegeben werden der Rangkorrelationskoeffizient  $r$  und das Signifikanzniveau  $p$ .

Für die statistischen Auswertungen im Rahmen der Doktorarbeit wurde das Programm *GraphPad Prism 6* und das Programm *IBM SPSS Statistics 25* verwendet.

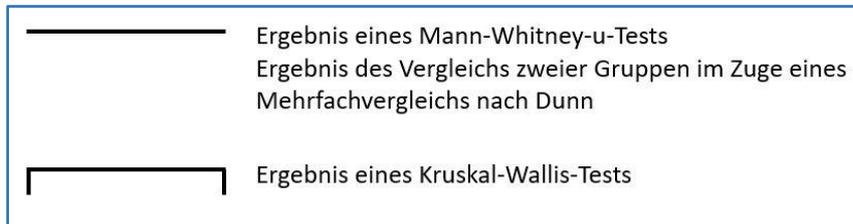


Abbildung 4: Legende zu den Arten von statistischen Test

## 2.8 Eigenanteil der Methodik und Etablierungsarbeit

Die Methodik der Probengewinnung (2.1), Bestimmung der RNA-Integrität (2.2.3), cDNA-Umschreibung (2.2.4), real-time PCR (2.2.5) Histologie (2.3), Immunhistochemie (2.4) und Kalzium-Assay (2.5) waren bereits im Labor etabliert. Die Durchführung erfolgte nach Einweisung durch Postdoktoranden, Doktoranden oder im Labor tätige Studenten der Biologie oder Medizin selbstständig in eigenhändiger Arbeit anhand von Protokollen.

Für die Methodik der RNA-Isolation (2.2.1; 2.2.2) wurden konkurrierende bereits etablierte Protokolle im Zuge einer Vorversuchsreihe hinsichtlich RNA-Ausbeute, RIN-Wert und Handhabung verglichen und anhand der Ergebnisse ein modifiziertes Protokoll etabliert.

Eigens für die Dissertation wurde die CT-Kalziumbestimmung (2.6) innerhalb einer Vorversuchsreihe etabliert und am Probenmaterial durchgeführt.

## 2.9 Materialien

### 2.9.1 Material

Produkt	Hersteller	Ort
Alcianblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland

Ammoniumhydroxid 30 %	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Brilliant Crocein R	Waldeck GmbH & Co. KG	Münster, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Calcium-Assay Kit	Abnova	Taipei City, Taiwan
Chlorophorm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Dako-Pen	DAKO GmbH	Jena, Deutschland
DAPI	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labor- technik GmbH	Edermünde, Deutschland
DNAse Verdau	QUIAGEN GmbH-Germany	Hilden, Deutschland
DTT	QUIAGEN GmbH-Germany	Hilden, Deutschland
Eindeckmedium RotiHistokit II	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70 %, 96 %, 99,5 %	Zentralapotheke UKD	Düsseldorf, Deutschland
Fetales Kälberserum Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Formalin 4 %	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
GoTaqR qPCR Master Mix	Promega GmbH	Mannheim, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
HCl 32-37 %	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
HPLC-grade EtOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland

Jod	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumjodid	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Kaninchen-anti-Biglykan (LF159)	LF	
Kaninchen-anti-CD3 (C7930)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Kaninchen-anti-Elastin (ab21610)	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
Kaninchen-anti-MMP2 (ab37150)	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper mit Meerrettichperoxidase (305-035-003)	Jackson Immuno Research Labs	Baltimore, Vereinigte Staaten
Kaninchen-anti- $\alpha$ SMA (ab5694)	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
Kernechtrot	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Leica Eindeckmedium	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch/ Deutschland
Maus-anti-CD68 (ab31630)	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
Meerschweinchen-anti-Vimentin (GP53)	Progen Biotechnik GmbH	Heidelberg, Deutschland
NaCl	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Natriumacetattrihydrat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Nuclease-Free Water	Promega GmbH	Mannheim, Deutschland

Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	Lauda Königshofen, Deutschland
PCR-Primer (Sequenz siehe Abschnitt PCR)	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Phosphotungstic Acid/Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Pikrinsäure	WWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland; Radnor, Pannsylvania, USA
QuantiTectR Reverse Transcription Kit	QUIAGEN GmbH-Germany	Hilden, Deutschland
RDD Puffer für DNase Verdau	QUIAGEN GmbH-Germany	Hilden, Deutschland
RNAse Away	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
RNAse freies Wasser	Promega GmbH	Mannheim, Deutschland
RNAse freies Wasser	QUIAGEN GmbH-Germany	Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QUIAGEN GmbH-Germany	Hilden, Deutschland
RotiHistokit II	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Safran du Gatinais	Waldeck GmbH & Co. KG	Münster, Deutschland
Säurefuchsin	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
super frost Objektträger	R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen, Deutschland
Tris Hydrochlorid	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Trisaminomethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Trizol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland

Tween 20 Detergent	Merck Millipore	Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Xylol	WWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland; Radnor, Pennsylvania, USA
Xylol	WWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland; Radnor, Pennsylvania, USA
Ziege-anti-Kaninchen mit Alexa 488 (A11070)	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, Verei- nigte Staaten
Ziege-anti-Kaninchen mit Alexa 546 (A11010)	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien, Verei- nigte Staaten
Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper mit Meerrettichperoxidase (111- 035-003)	dianova GmbH	Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Kollagen Typ 1 (AB758)	Merck Millipore	Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ziege-anti-Maus mit Alexa 546 (A- 110330)	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, Verei- nigte Staaten
Ziege-anti-Meerschwein mit Alexa 488 (A-11073)	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien, Verei- nigte Staaten

## 2.9.2 Softwareliste

Programm	Hersteller	Ort
Endnote X8.2	Clarivate Analytics	Philadelphia, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Endnote X9.3.3	Clarivate Analytics	Philadelphia, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
GraphPad Prism 5	GraphPad Software	San Diego, California USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software	San Diego, California USA
IBM SPSS Statistics 25	International Business Machines Corporation	Endicott, New York, Verei- nigte Staaten

ImageJ 1.51w	Wayne Rasband, NIH	Bethesda, Maryland, Vereinigte Staaten
Leica Application Suite V3.7	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch, Deutschland
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation	Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
Microsoft Powerpoint 2019	Microsoft Corporation	Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
Microsoft Word 2019	Microsoft Corporation	Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
StepOne Software v2.3	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Syngo.via	Siemens Healthineers AG	Erlangen, Deutschland

### 2.9.3 Geräteliste

Gerät	Hersteller	Ort
Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Biometra T3000 Thermocycler	Biometra biomedizinische Analytik GmbH	Göttingen, Deutschland
Brand accu-jet pro Stipette	BRAND GMBH + CO KG	Wertheim, Deutschland
Eppendorf Reference 2500 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 10 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 100 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 1000 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 2,5 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 20 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 200 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 5000 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research plus 10 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research plus 100 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research plus 1000 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5804R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Heidolph REAX 2000 Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG	Schwabach, Deutschland
Hettich Universal 16 Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland
Leica CM 1950 Kryostat	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch, Deutschland
Leica DFC 425 C Mikroskopenkamera	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch, Deutschland
Leica DM 2000 Mikroskop	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch, Deutschland
Leica EL 6000 Fluoreszenzlampe	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch, Deutschland

Miccra KT D-8 Homogenisator	MICCRA GmbH	Heitersheim, Deutschland
MS1 Minishaker IKA Vortexer	IKA®-Werke GmbH & CO. KG	Staufen, Deutschland
Tecan Reader, infinite M1000 PRO	Tecan Deutschland GmbH	Männedorf, Schweiz
Thermo Heraeus function line	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Thermo Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA

## 2.10 Berechtigungsnachweise

Die Gewinnung der Aortenklappen von Herztransplantationspatienten erfolgte innerhalb der Studie mit dem Titel „Kurz- und mittelfristiges Outcome nach HTX/Kunstherz in Abhängigkeit von Immunsuppression, Ischämiedauer und Matching unter besonderer Berücksichtigung spezifischer Biomarker“ mit dem Aktenzeichen 4567 der Ethikkommission der hiesigen Medizinischen Fakultät.

Die Gewinnung der Aortenklappen im Zuge eines operativen Aortenklappenersatzes erfolgte innerhalb der Studien mit dem Titel „Rolle des FTO-Risiko-Allels für die Entwicklung humaner degenerativer Herzklappenerkrankungen“ mit dem Aktenzeichen 3428 sowie mit dem Titel „Identifikation zellulärer und extrazellulärer Ursachen für die Entwicklung humaner degenerativer Herzklappenerkrankungen sowie myokardialer Adaptationsmechanismen mit dem Aktenzeichen 4412R der Ethikkommission der hiesigen Medizinischen Fakultät.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vorversuche RNA-Isolationsmethode

Aus ovinen Aortenklappentaschen wurde RNA anhand von unterschiedlicher Protokolle isoliert. Insgesamt wurden acht Klappentaschen mit dem Homogenisator, vier mit dem Mörser, zwei mit Mörser und *pellet pestle* sowie vier ausschließlich mit dem *pellet pestle* bearbeitet. Anschließend wurde eine wie unter „Material und Methoden“ beschriebene RNA-Isolation durchgeführt. Abweichend wurde bei vier mit dem Homogenisator und vier mit dem Mörser bearbeiteten Proben die RNA zusätzlich einmal in Isopropanol gefällt und später resuspendiert. Dies ist in Tabelle x zusammengefasst.

<b>Isolationsmethode</b>	Homogenisator	Mörser	Mörser + <i>pellet pestle</i>	<i>pellet pestle</i>
--------------------------	---------------	--------	-------------------------------	----------------------

Anzahl (mit Durchführung einer Isopropanolfällung)	8 (4)	4 (4)	2 (0)	4 (0)
Anzahl mit verwertbarem RIN-Wert	4 (3)	3 (3)	2 (0)	4 (0)

Tabelle 1: Anzahl an Replikaten pro Methode

Mit Vorbereitung und anschließender Reinigung der Geräte dauert Mörsern pro Probe ca. 10 Minuten, das *pellet pestle* benötigt 20 Minuten pro Probe und der Homogenisator etwa 3 Minuten. Hinsichtlich des Ertrags gab es die besten Ergebnisse bei Einsatz des Homogenisators, die zweitbesten durch die Kombination aus Mörser und *pellet pestle*. Bei der Auswertung nach und Bestimmung des RIN-Wertes führte der Einsatz des Mörsers zu deutlich niedrigeren Werten als die Alternativmethoden. Die Abweichung hinsichtlich der Probenanzahl kommt zustande, da in der automatisierten Analyse nicht zu jeder Probe ein RIN-Wert herausgegeben wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 zusammengefasst

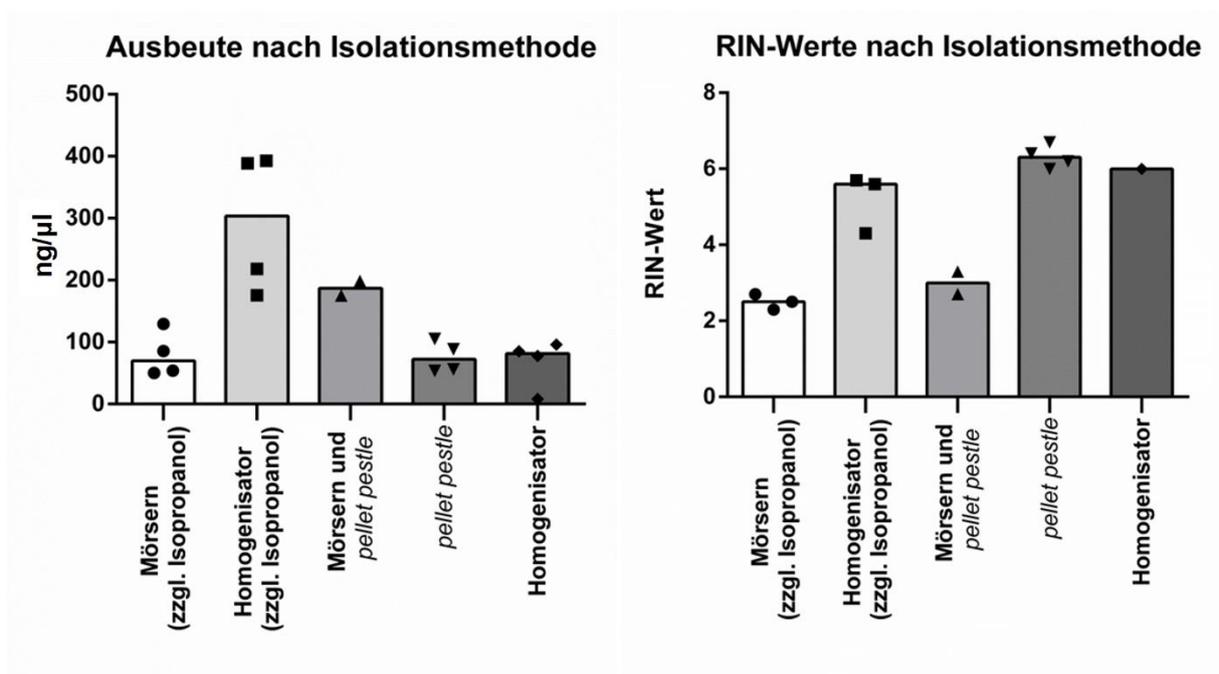
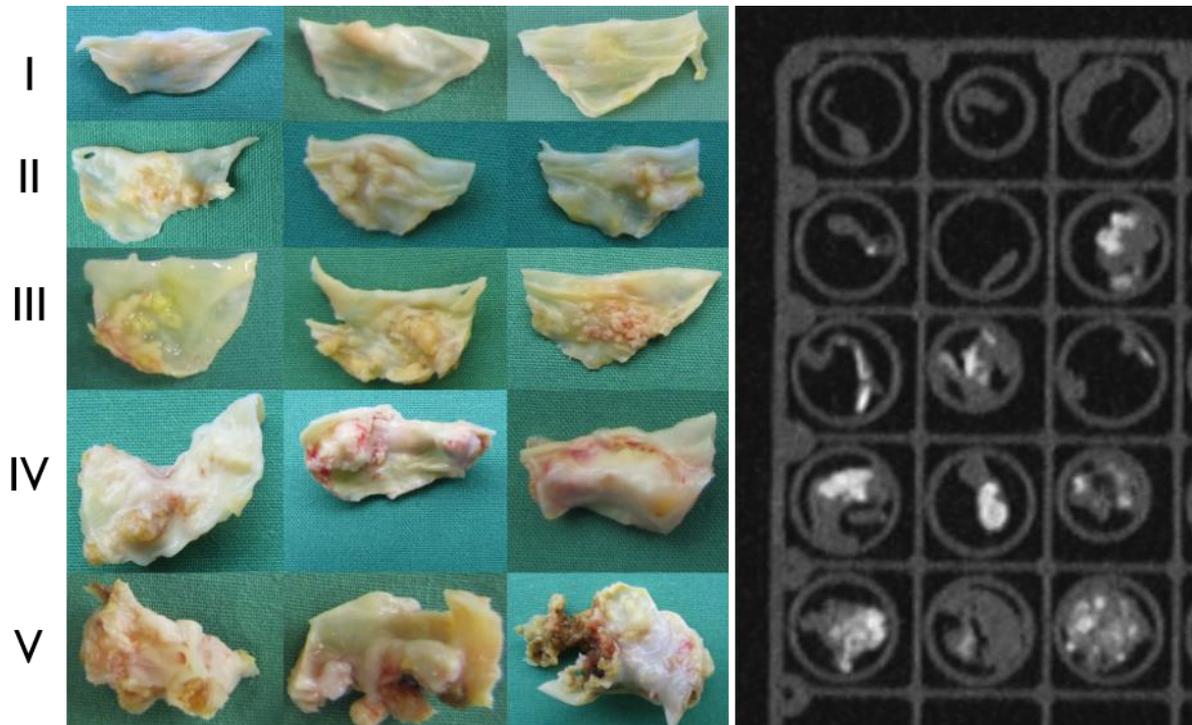


Abbildung 5: Ergebnis der Vorversuche zur RNA-Isolationsmethode. Dargestellt ist die Ausbeute in ng/µl (links) und der RIN-Werte (rechts) nach Isolationsmethode. Scatterplot mit Median. RIN: RNA integrity number

### 3.2 Vorversuche CT-Kalziumbestimmung

Aus der Aortenklappenbank wurden 15 Aortenklappen mit makroskopisch fünf unterschiedlich ausgeprägten Verkalkungsgraden ausgewählt. Mittels des CTs wurden Schnittbilder angefertigt und anschließend ein

Kalzium-Assay und ein Protein-Assay durchgeführt. Photographien im OP der 15 ausgewählten Klappen sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Klappen wurden zunächst noch in Kryoröhrchen im CT mittels des Felsenbeinprogramms und des Programms *syngo.via* untersucht. Exemplarisch sind die Klappen einmal graustufenkodiert in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Unterschiedlich stark kalzifizierte Aortenklappentaschen.** links: Photographien von 15 humanen Aortenklappentaschen geordnet von wenig kalzifiziert (oben) nach stark kalzifiziert (unten). Die Einteilung erfolgte subjektiv anhand der Photographien. rechts: Dieselben Aortenklappentaschen in derselben Anordnung in Kryoröhrchen in einer Plastikbox. Graustufenkodierte CT-Aufnahme. Kalksuspekte Areale erscheinen aufgrund der größeren Röntgendichte weiß.

Die vom Programm errechneten Werte für die Masse an Kalzium im markierten Bereich sind in Abbildung 7 nach den untersuchten Gruppen aufgeteilt. Hier kann gezeigt werden, dass sich die 5 Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Innerhalb einzelner Gruppen kann jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



Da sowohl Mittelwerte als auch Standardabweichung innerhalb der Gruppen II und III respektive IV und V jeweils sehr ähnlich sind, sind diese Gruppen auch nochmal zusammengefasst ausgewertet worden. In dieser Zusammenstellung bestehend aus drei Gruppen zeigen sich nun sowohl im CT als auch im Kalzium-Assay signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 9). Darüber hinaus zeigen sich auch im Kalzium-Assay zwischen den Gruppen I und IV-V signifikante Unterschiede. Im CT bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen I und II-III sowie I und IV-V. Die Ergebnisse für die Analyse von 3 Gruppen ist in Abbildung 12 dargestellt.

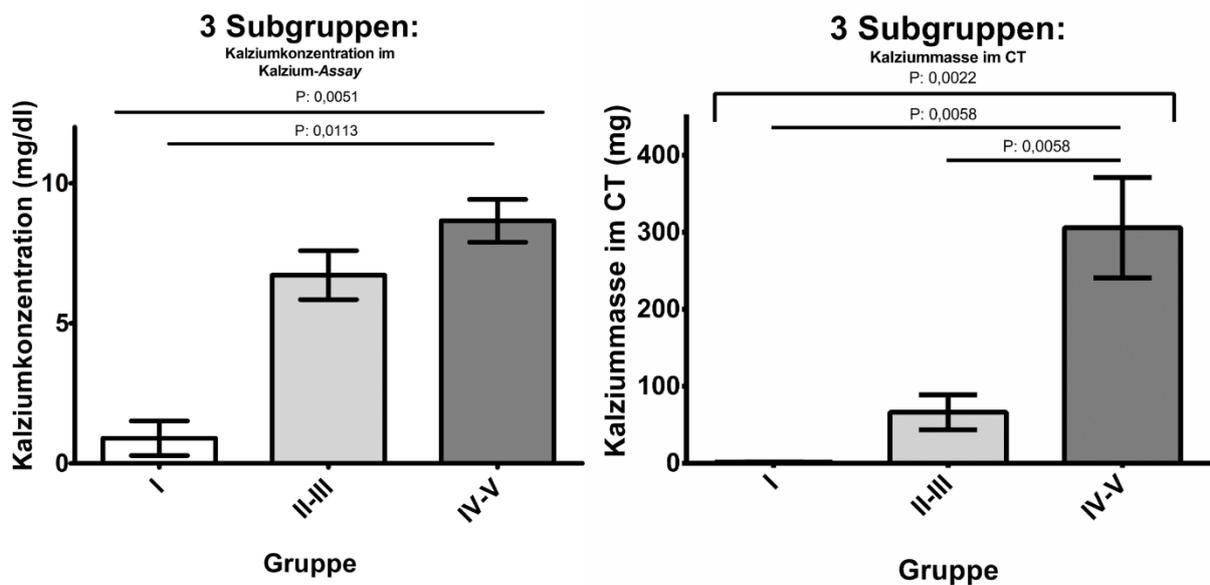
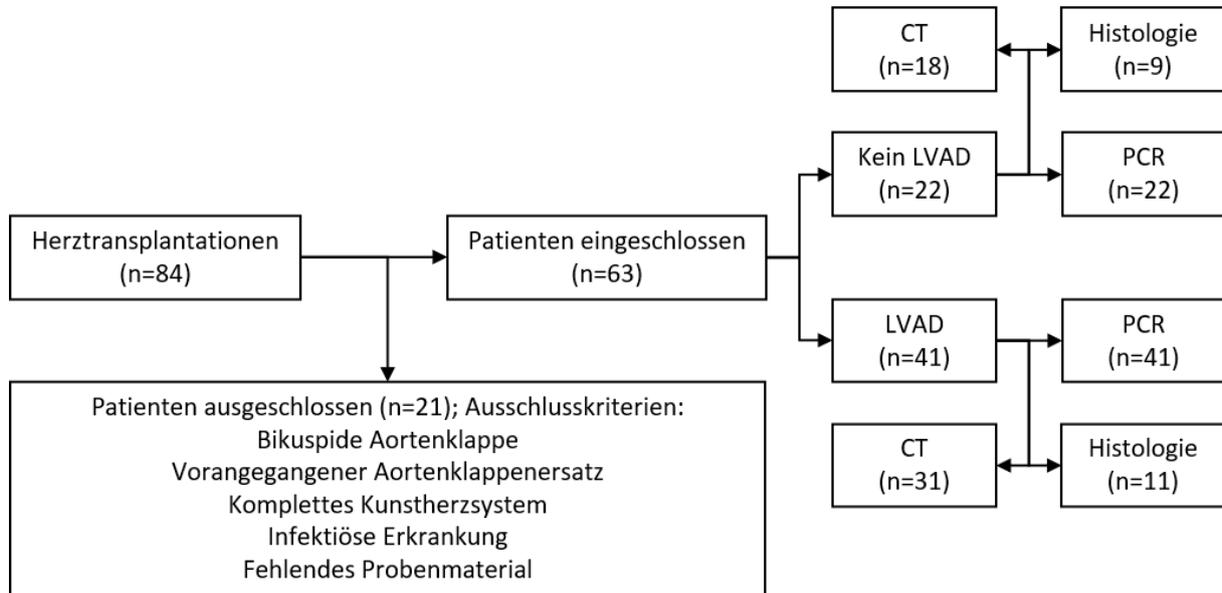


Abbildung 9: Auswertung mit zusammengefassten Gruppen links: Ergebnisse für die Kalziumkonzentration im Kalzium-Assay bei Gliederung in drei Gruppen. Rechts: Ergebnisse der Kalziumhydroxylapatitmassebestimmung mittels CT bei 130 HU-Threshold bei Gliederung in drei Gruppen, Subgruppe I: n=3, Subgruppe II-III und IV-V: n=6; CT: Computertomographie, HU: *hounsfield units*

### 3.3 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs

Insgesamt waren zu Beginn der Hauptversuche seit Beginn der Sammlung von Aortenklappentaschen für Studienzwecke 84 Herztransplantationen am Uniklinikum Düsseldorf durchgeführt worden. Hiervon wurden 21 Patienten ausgeschlossen. Die Ausschlusskriterien waren hierbei Infektionen des Patienten mit Hepatitis- oder Humanen Immundefizienzviren (n=1), vorangegangener Aortenklappenersatz (n=2), Fehlen einer Aortenklappe bei vorheriger Versorgung mit komplettem Kunstherzsystem (n=1) und bikuspidale Aortenklappenanlage (n=3). Außerdem wurden Patienten ausgeschlossen deren Probenmaterial aus anderen Gründen nicht zur Verfügung stand. Insgesamt waren die Aortenklappentaschen von 63 Patienten vor

Durchführung der Versuche vorhanden. Die betreffenden Einschluss- und Ausschlusskriterien wurden im Flussdiagramm in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10: Patientenkohorte** Flussdiagramm mit Darstellung ausgeschlossener Patienten nach Ausschlusskriterien und eingeschlossener Patienten nach Untersuchungsart.

Die deskriptive Statistik der erhobenen Daten vor Herztransplantation der 41 Patienten mit LVAD und der 22 Patienten ohne LVAD-Unterstützung sowie des vollständigen Patientenkollektivs von 63 Patienten ist in Tabelle 1 dargestellt.

	Alle Patienten (n=63)	Mit LVAD (n=22)	Ohne LVAD (n=41)	P-Wert
Geschlecht männlich, n (%)	48 (76)	18 (82)	30 (73)	0,5442
Alter [Jahre]	53 ± 1,4	54 ± 2,2	53 ± 1,9	0,9060
Body mass index [kg/m <sup>2</sup> ]	26 ± 0,6	25 ± 0,7	27 ± 0,9	0,1191
NYHA, n (%)				
I	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
II	5 (8)	3 (14)	2 (5)	0,3327
III	19 (30)	4 (18)	15 (37)	0,1588

IV	39 (62)	15 (68)	24 (58)	0,4523
Primäre Indikation, n (%)				
Primäre DCM	31 (49)	14 (64)	17 (41)	0,1172
ICM	27 (43)	4 (18)	23 (56)	<b>0,0068</b>
Andere	5 (8)	4 (18)	1 (2)	<b>0,0464</b>
Kardiovaskuläre Risikofaktoren, n (%)				
Raucher	14 (26)	3 (14)	11 (27)	0,2892
Arterielle Hypertonie	33 (52)	11 (50)	22 (54)	0,6544
Diabetes mellitus	20 (32)	7 (32)	13 (32)	0,8957
hiervon Insulinpflichtig	2 (3)	1 (5)	1 (2)	0,6063
Dyslipoproteinämie	16 (25)	8 (36)	8 (20)	0,0982
Komorbiditäten, n (%)				
Niereninsuffizienz	38 (60)	14 (64)	24 (59)	0,6932
Koronare Herzkrankheit	25 (40)	5 (23)	20 (49)	0,2140
Extrakardiale arterielle Verschlusskrankheit	10 (16)	4 (6)	0 (0)	4 (10)
Entzündliche Erkrankungen	6 (10)	1 (5)	5 (12)	0,4782
Dauermedikation, n (%)				
Statine	27 (43)	8 (36)	19 (46)	0,5943
Thrombozytenaggregationshemmer	40 (63)	7 (32)	33 (80)	<b>0,0003</b>
ACE-Hemmer	37 (59)	15 (68)	22 (54)	0,2961
PD5-Hemmer	24 (38)	2 (9)	22 (54)	<b>0,0004</b>
Betablocker	56 (89)	17 (77)	39 (95)	<b>0,0449</b>
Kalziumkanalblocker	11 (17)	2 (9)	9 (22)	0,3017
Diuretika	50 (79)	19 (86)	31 (76)	0,5148
Antiarrhythmika	23 (37)	11 (50)	12 (29)	0,1691
Oral Antidiabetika	8 (13)	2 (9)	6 (15)	0,7020

Allopurinol	11 (17)	6 (27)	5 (12)	0,1703
Katecholamine	3 (5)	3 (14)	0 (0)	<b>0,0388</b>
Marcumar	39 (62)	10 (45)	29 (71)	0,0610
Echodaten				
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion präoperativ (%)	23 ± 1,1	26 ± 2,1	22 ± 1,2	0,1327
Laborwerte				
Kreatinin [mg/dL]	1,24 ± 0,052	1,35 ± 0,080	1,19 ± 0,066	0,0895
Thrombozyten [x1000/µL]	237 ± 12,2	235 ± 26,2	237 ± 12,6	0,3761
Leukozyten [x1000/µL]	8,9 ± 0,39	8,6 ± 0,51	9,0 ± 0,54	0,9914
C-reactives Protein [mg/dL]	2,8 ± 0,73	3,1 ± 1,77	2,6 ± 0,66	<b>0,0331</b>
Serum Kalzium [mg/dL]	2,31 ± 0,03	2,29 ± 0,05	2,32 ± 0,04	0,7997
Serum Phosphat [mg/dL]	1,21 ± 0,05	1,19 ± 0,05	1,22 ± 0,08	0,7901
HbA1c [%], n=36	5,9 ± 0,2	5,8 ± 0,2	6,0 ± 0,3	0,6142
Serum Bilirubin [mg/dL]	2,48 ± 0,25	2,33 ± 0,37	2,57 ± 0,33	0,4362

**Tabelle 2: Deskriptive Statistik der Patientenkohorte** inklusive demographischer Daten, Indikation, kardiovaskulärer Risikofaktoren, Begleiterkrankungen, Medikamenteneinnahme, echokardiographischer Daten und Laborwerten, p-Werte dichotomer Variablen wurden mit *Fishers exact test*, die nicht dichotomer Variablen wurden mit *Mann-Whitney u-test* bestimmt. p-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet und sind hervorgehoben. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) angegeben. LVAD: *left ventricular assist device*, NYHA: *New York heart association*, DCM: Dilatative Kardiomyopathie, ICM: Ischämische Kardiomyopathie, ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym, PD5: Phosphodiesterase 5, HbA1c: Anteil glykierten Hämoglobins

Die Patienten unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich des Alters (beide Patientengruppen waren im Durchschnitt 53 Jahre alt), des Geschlechts (jeweils drei Viertel der Patienten sind männlich) und des mittleren BMI (jeweils zwischen 25 und 27 kg/m<sup>2</sup>). Der größte Teil der Patienten ließ sich bezüglich des klinischen Ausmaßes der Herzinsuffizienz den NYHA Stadien III und IV zuordnen.

Die Indikation für die Herztransplantation wurde bei 31 Patienten aufgrund einer primär dilatativen Kardiomyopathie gestellt. 27 Patienten wurden wegen einer ischämischen Kardiomyopathie transplantiert. Die verbliebenen 5 Patienten litten an einer anderen Erkrankung des Herzmuskels.

Bei 8 von 41 Patienten mit LVAD wurde eine Listung zur Herztransplantation nach der höchsten Dringlichkeitsstufe *high urgent* aufgrund einer Infektion des LVAD-Systems vorgenommen.

Bezüglich Komorbiditäten und kardiovaskulären Risikofaktoren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne LVAD.

Die Medikation der Patienten wurde in die Kategorien Einnahme von Statinen, Thrombozytenaggregationshemmer, ACE-Hemmer, PD5-Hemmer, Betablocker, Kalziumkanalblocker, Diuretika, Antiarrhythmika, orale Antidiabetika, Allopurinol, Katecholamine und oralen Antikoagulantien eingeteilt. In der LVAD-Gruppe nahm ein signifikant höherer Anteil Thrombozytenaggregationshemmer (p: 0,003), PD5-Hemmer (p: 0,004) und Betablocker (p: 0,045) ein. Bei oralen Antikoagulantien bestand ein Trend zu einem höheren Anteil bei den LVAD-Patienten (p: 0,061). In der Gruppe ohne LVAD bestand signifikant häufiger eine Katecholaminpflicht (p: 0,039).

Bei Analyse der präoperativ bestimmten Laborwerte zeigten sich im Blutbild, sowie im Kreatinin, Kalzium und Phosphat keine signifikanten Unterschiede. Der systemische Entzündungsmarker CRP war jedoch in der LVAD-Gruppe signifikant erniedrigt (p: 0,033). Echokardiographisch zeigten beide Gruppen eine stark reduzierte linksventrikuläre Ejektionsfraktion von knapp über 20 % ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Innerhalb der Gruppe der LVAD-Patienten kamen am häufigsten die Geräte *Heartware* (n=29) und *Heartmate II* (n=8) zum Einsatz. Die mittlere Einsatzdauer des LVAD betrug 485 Tage und reichte von 11 Tagen bis 1431 Tagen. 29 % der Patienten benötigten weitere Unterstützungssysteme. Bei 81 % der Patienten konnte echokardiographisch eine Öffnung der Klappe festgestellt werden, bei 32 % zeigte sich hier eine Aortenklappeninsuffizienz. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 2 dargestellt.

	LVAD (n = 41)
LVAD-Modell, n (%)	
<i>Heartware</i>	29 (71)
<i>Heartmate II</i>	8 (20)
<i>Heartmate III</i>	3 (7)
<i>HeartReliant HeartAssist5</i>	1 (2)
LVAD-Dauer (Tage)	485 ± 59
LVAD-Dauer minimal (Tage)	11
LVAD-Dauer maximal (Tage)	1431

LVAD-Systeminfekt, n (%)	8 (20)
Nutzung weiterer <i>assist device</i> , n (%)	12 (29)
Öffnung der Aortenklappe, n (%)	26 (81)
Aortenklappeninsuffizienz, n (%)	12 (32)

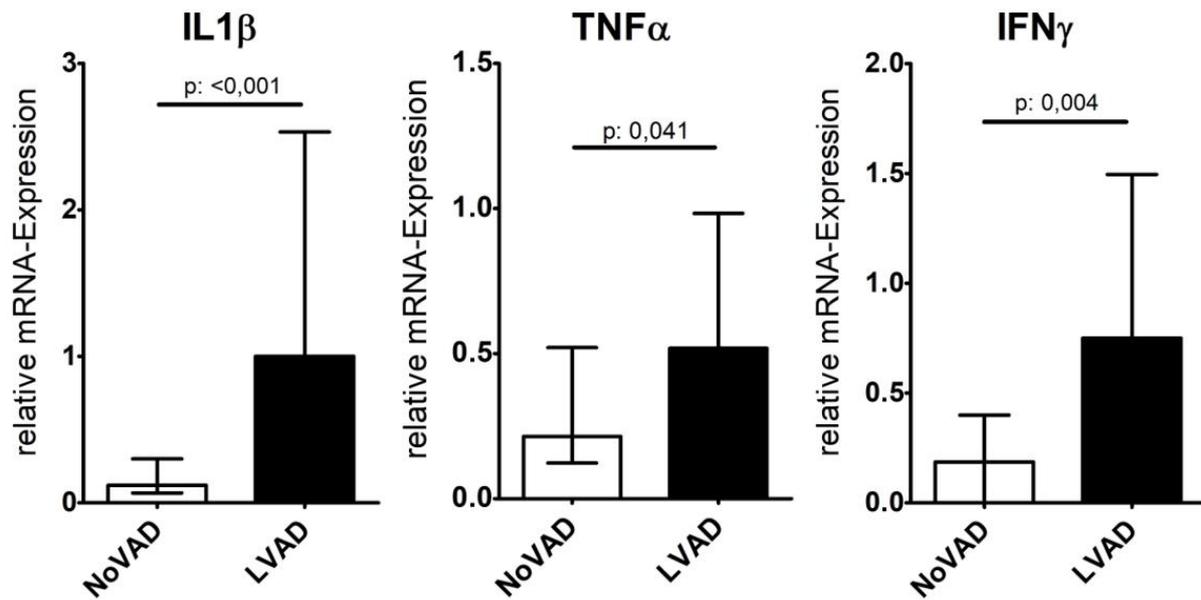
**Tabelle 3: LVAD-spezifische Patientendaten** mit LVAD-Modell, -Einsatzdauer und LVAD-spezifischer Komplikationen und Echodaten. Die LVAD-Dauer ist als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. LVAD: *left ventricular assist device*.

Insgesamt stand nach Anwendung der Exklusionskriterien Probenmaterial von 63 Patienten zur RNA-Isolation zur Verfügung. Von 49 Proben konnte vorher ein CT angefertigt werden. Vom Probenmaterial von 20 Patienten wurden Gefrierschnitte angefertigt, gefärbt und mikroskopiert. Während 11 Aortenklappentaschen von Patienten mit LVAD stammten, waren 9 Proben aus der Gruppe ohne LVAD. Die Kryoblöcke wurden unter Zuhilfenahme einer Nummer von 1-20 pseudonymisiert und somit verblindet bearbeitet und ausgewertet. Die Verblindung wurde erst nach Abschluss aller Färbungen und Auswertungen aufgehoben.

## 3.4 Entzündung und Immunreaktion

### 3.4.1 Vergleich NoVAD vs. LVAD

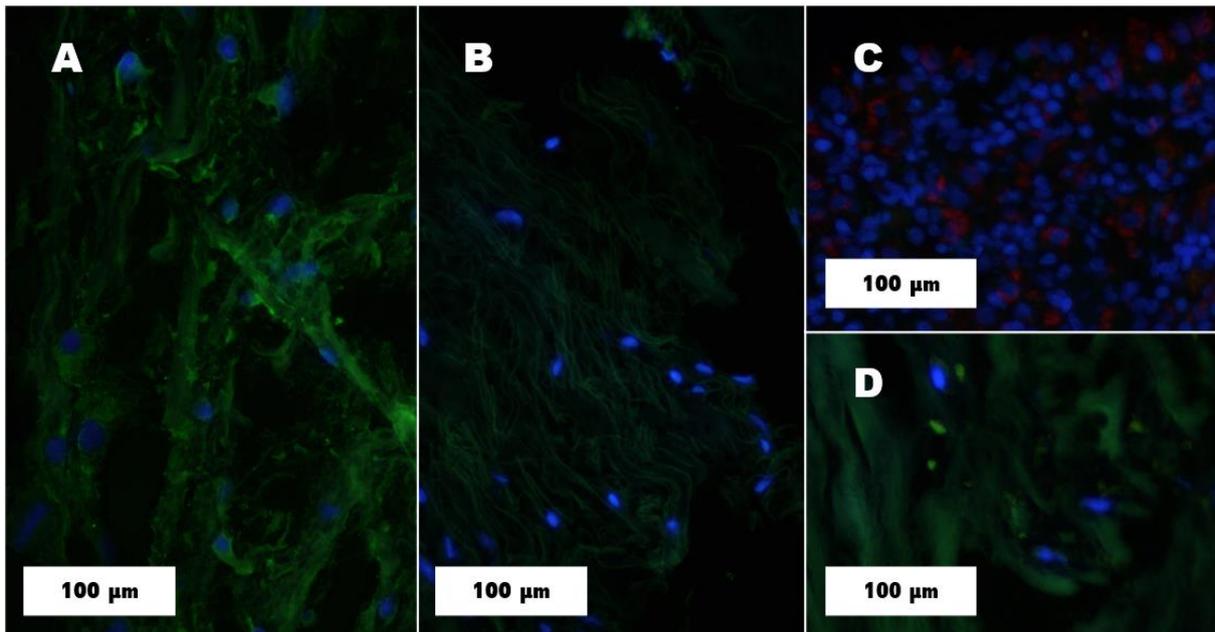
In der PCR wurden die Entzündungsmarker IL1 $\beta$ , TNFa und IFN $\gamma$  untersucht. Hierbei zeigte sich bei Patienten der Gruppe LVAD eine signifikant höhere Genexpression von IL1 $\beta$  (p: <0,001), TNFa (p: 0,040) und IFN $\gamma$  (p: 0,004) als bei den Patienten der Gruppe ohne LVAD. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt [138].



**Abbildung 11: Expression der Entzündungsmarker.** Die Expression von IL1β (links), TNFα (Mitte) und IFNγ (rechts) fiel bei LVAD-Patienten signifikant höher aus. Der p-Wert wurde mit *Mann-Whitney u-test* bestimmt. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. NoVAD: Teil der Kohorte ohne *left ventricular assist device*, LVAD: Teil der Kohorte mit *left ventricular assist device*, IL1β: Interleukin 1β, TNFα: Tumornekrosefaktor α, IFNγ: Interferon γ

Bei der Korrelation der einzelnen Marker miteinander über die gesamte Stichprobe zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Genexpression der Marker IL1β mit TNFα und IFNγ (jeweils  $p: < 0,001$ ). TNFα und IFNγ korrelierten ebenfalls signifikant miteinander ( $p: 0,024$ ). Hierüberhinaus korreliert IL1β signifikant mit OPN ( $p: 0,024$ ), TGFβ1 ( $p: 0,004$ ), und MMP9 ( $p: 0,001$ ). TNFα korreliert mit ALP ( $p: 0,034$ ), TGFβ1 ( $p: < 0,001$ ), MMP2 ( $p: 0,001$ ) und MMP9 ( $p: 0,002$ ). IFNγ korreliert mit OPN ( $p: 0,001$ ), OCN ( $p: 0,023$ ) und MMP9 ( $p: 0,004$ ).

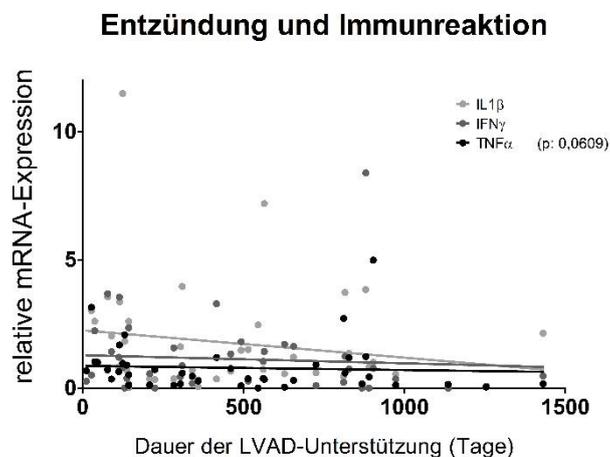
Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Antigen CD3 als T-Lymphozytenmerkmal und CD68 als Makrophagen- und Monozytenmarker konnten keine Unterschiede zwischen den Klappen von Patienten mit und ohne LVAD-Unterstützung festgestellt werden. Insgesamt konnte in keiner Klappe CD3 und lediglich in je einer Klappe aus jeder Gruppe, CD68 dargestellt werden. In der Positivkontrolle, einer Rattenmilz, konnten in denselben Färbedurchgängen jeweils beide Antigene nachgewiesen werden. Diese Färbung ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12: CD68-Darstellung** Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CD3 (rot) und CD68 (grün). Überlagerungsaufnahmen von zwei Aortenklappen aus der NoVAD-Gruppe mit (A) und ohne (B) nachweisbarem CD68 innerhalb der Klappe. Der leichte grüne Farbeindruck in B entspricht der Autofluoreszenz des Kollagens und fand sich ebenso in der Negativkontrolle. Darstellung eines Areales mit CD3 (C) und CD68 (D) in der als Positivkontrolle gefärbten Rattenmilz. Maßstabsbalken: 100 µm, CD: *cluster of differentiation*.

### 3.4.2 Korrelation mit LVAD-Dauer

Innerhalb der Gruppe an Patienten mit mechanischer Unterstützung zeigte sich in der Expression von TNF $\alpha$  ein deutlicher Trend zu einer negativen Korrelation mit der LVAD-Dauer, also der Dauer zwischen LVAD-Implantation und Herztransplantation mit Explantation des LVAD ( $p: 0,061$ ). Die Korrelation der LVAD-Dauer mit IL1 $\beta$  oder IFN $\gamma$  zeigte keinen signifikanten Zusammenhang. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.



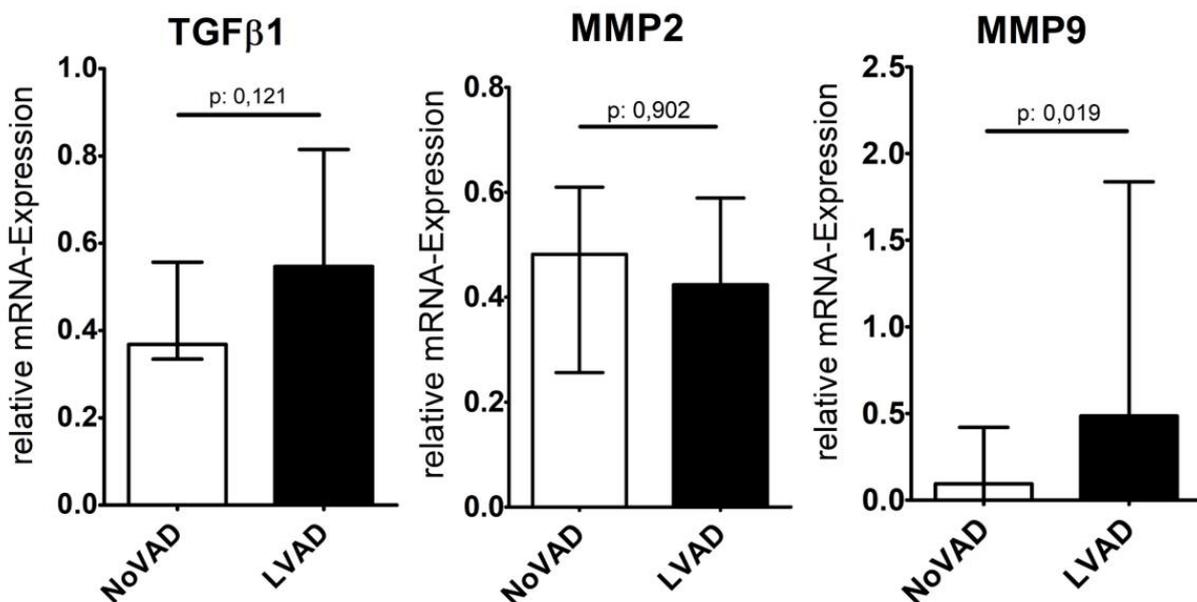
**Abbildung 13: Einfluss der LVAD-Dauer auf die Entzündungsmarker.** Negative Korrelationen der LVAD-Dauer mit den entsprechenden relativen mRNA-Expressionswerten. Der p-Wert wurde mit Spearman-Korrelationskoeffizient bestimmt. LVAD: *left ventricular assist device*, IL1 $\beta$ : Interleukin 1 $\beta$ , TNF $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , IFN $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ .

## 3.5 Umbau der Extrazellulärmatrix

### 3.5.1 Vergleich NoVAD vs. LVAD

Um zu untersuchen, ob ein Umbau der Extrazellulärmatrix unter dem Einfluss eines LVAD auftritt, wurden der Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 und die Matrix-Metalloproteasen MMP2 und MMP9 in ihrer Genexpression untersucht. Histologisch wurden sowohl in den Übersichtsfärbungen Hämatoxylin-Eosin und Movat-Pentachrom als auch in den DAB-Färbungen von Kollagen Typ I, Elastin, Biglycan und MMP9 etwaige Umbauprozesse auf Gewebeebene visualisiert. Außerdem wurden die Marker  $\alpha$ SMA und Vimentin in der Immunfluoreszenz dargestellt, um migrierende Zellen darzustellen.

Die Unterschiede in der Genexpression von TGF $\beta$ 1 ( $p$ : 0,119) und MMP2 ( $p$ : 0,768) waren nicht signifikant hinsichtlich des Vergleichs der Gruppen LVAD und NoVAD. Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression der MMP9 ( $p$ : 0,019) bei Patienten mit LVAD gegenüber der NoVAD-Gruppe. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt [138].

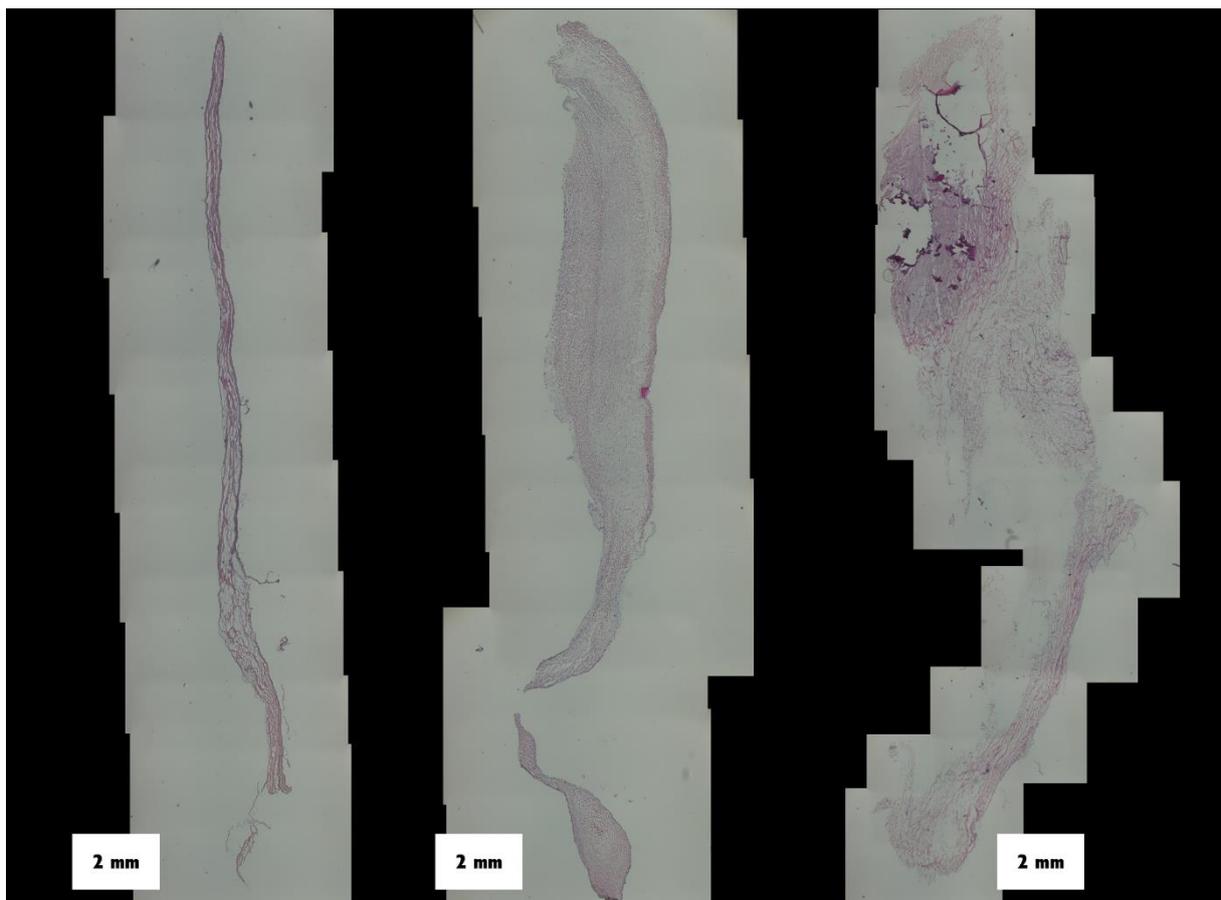


**Abbildung 14: Expression der Marker für Matrixumbau und Remodellierung** Die Expression von TGF $\beta$ 1 (links) und MMP2 (Mitte) fiel bei LVAD-Patienten nicht signifikant höher aus, während MMP9 (rechts) signifikant höher exprimiert wurde. Der p-Wert wurde mit *Mann-Whitney u-test* bestimmt. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. NoVAD: Teil der Kohorte ohne *left ventricular assist device*, LVAD: Teil der Kohorte mit *left ventricular assist device*, TGF $\beta$ 1: *Transforming growth factor  $\beta$ 1*, MMP: Matrixmetalloprotease.

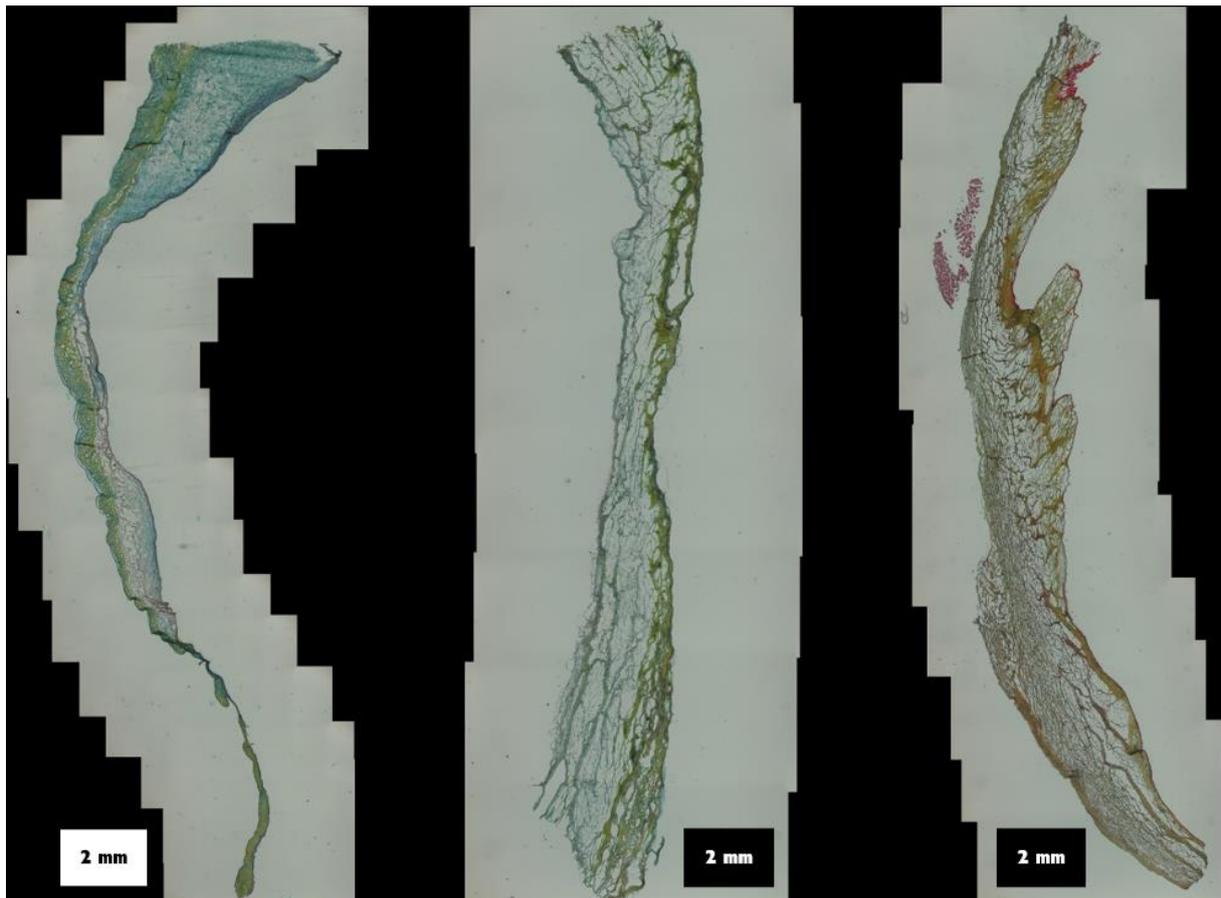
Bei der Korrelation der einzelnen Marker miteinander über die gesamte Stichprobe zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Genexpression von TGF $\beta$ 1 mit allen anderen Markern außer IFN $\gamma$ , also IL1 $\beta$  ( $p$ : 0,004), TNF $\alpha$  ( $p$ : <0,001), OPN ( $p$ : 0,004), ALP ( $p$ : 0,001), OCN ( $p$ : <0,001), MMP2

( $p < 0,001$ ) und MMP9 ( $p < 0,001$ ). MMP2 korreliert signifikant mit TGF $\beta$ 1 ( $p < 0,001$ ), ALP ( $p < 0,001$ ), TNF $\alpha$  ( $p < 0,001$ ) und OCN ( $p < 0,001$ ). MMP9 korreliert signifikant mit OPN ( $p < 0,001$ ), TGF $\beta$ 1 ( $p < 0,001$ ), IL1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ), IFN $\gamma$  ( $p < 0,004$ ) und TNF $\alpha$  ( $p < 0,002$ ).

In den histologischen Färbungen stellten sich die Schnitte der 20 gefärbten Herzklappensegel sehr heterogen dar. Die HE-gefärbten Schnitte wurden nach aufgelockerter und kompakter Struktur des Klappengewebes eingeteilt. Die Gruppen NoVAD und LVAD unterschieden sich jedoch nicht signifikant hinsichtlich dieser Einteilung. Die nach Movat-Pentachrom gefärbten Schnitte zeigten sich variabel hinsichtlich der vorherrschenden Farbe. Während in manchen Klappen das blau angefärbte Elastin dominierte, überwog bei anderen das gelb angefärbte Kollagen. Bei manchen Klappen war die Anfärbung an Kollagen und Elastin ähnlich ausgeprägt, sodass grün als Farbe der Proteoglycane und als Ergebnis der additiven Farbmischung aus blau und gelb hervortrat. Die Gruppen NoVAD und LVAD unterschieden sich jedoch nicht signifikant hinsichtlich der vorherrschenden Farbe und damit der vorherrschenden Matrixbestandteile. Die HE-Färbung ist in Abbildung 15 und die Movat-Pentachrom-Färbung in Abbildung 16 dargestellt.

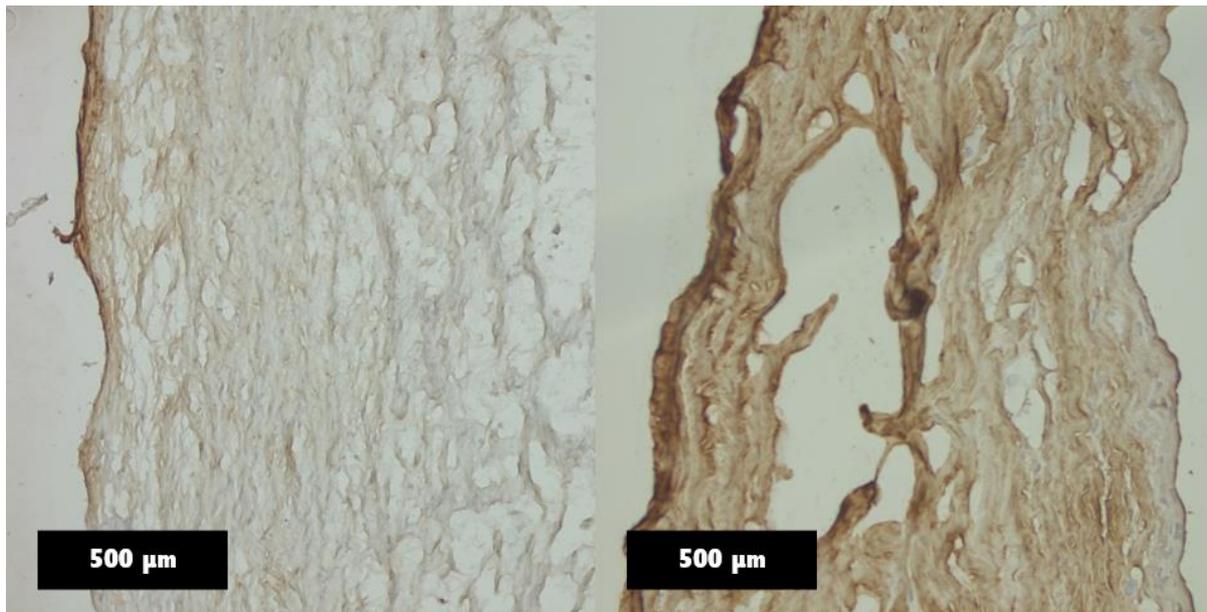


**Abbildung 15: Variabilität der Klappenmorphologie.** Drei nach Movat-Pentachrom gefärbte Aortenklappen mit unterschiedlicher Morphologie hinsichtlich Zellreichtum und Kompaktheit der Matrix, Maßstabsbalken: 2 mm.

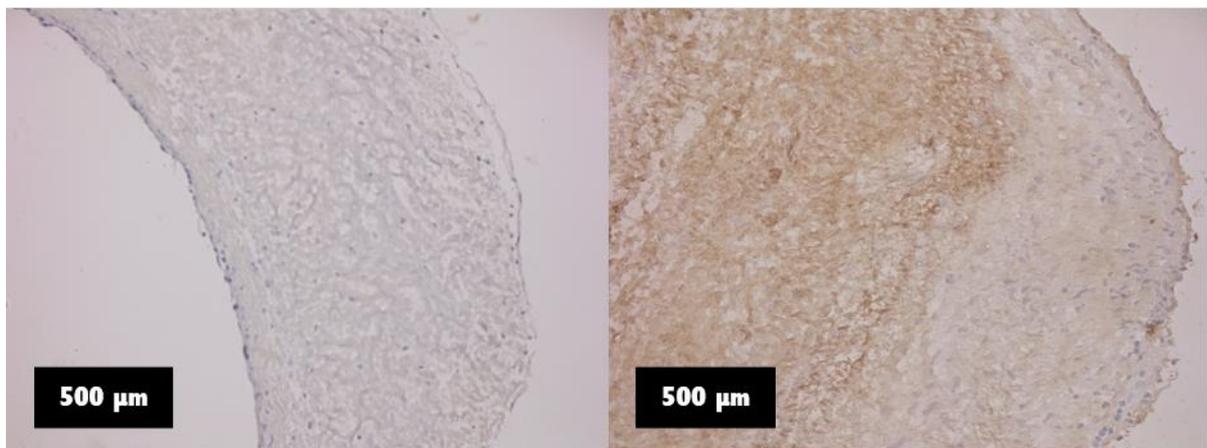


**Abbildung 16: Variabilität der Klappenmorphologie.** Drei nach Movat-Pentachrom gefärbte Aortenklappen mit unterschiedlicher Morphologie und unterschiedlich starkem Vorkommen der differenziert gefärbten Matrixbestandteile, Maßstabsbalken: 2 mm,

Die DAB-Färbungen von Kollagen, Biglycan, Elastin und MMP2 wurden nach der Stärke des DAB-Umsatzes eingeteilt. Hierbei wurde bei Kollagen und Biglycan eine mehrstufige Skala verwendet. Bei Elastin und MMP2 konnte nur unterschieden werden, ob ein Signal auftrat oder nicht. In keiner der DAB-Färbungen unterschieden sich die Gruppen NoVAD und LVAD signifikant. Diese Färbungen sind exemplarisch in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt.

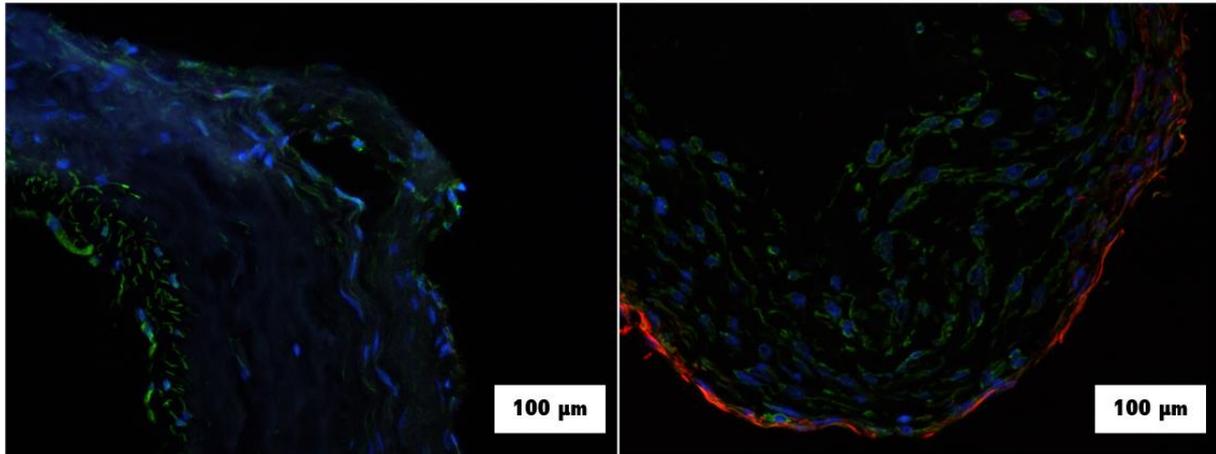


**Abbildung 17: Variabilität der Kollagenexpression.** DAB-Färbung von Kollagen Typ 1, Aortenklappen mit schwacher (links) oder starker (rechts) Anfärbbarkeit, Maßstabsbalken: 500 µm,



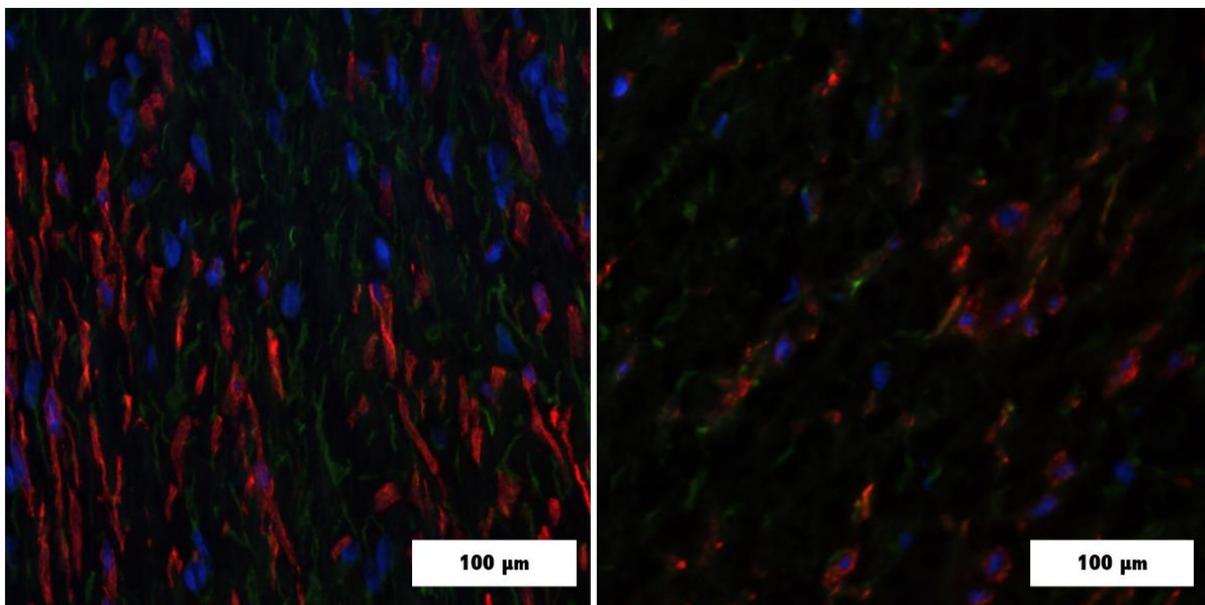
**Abbildung 18: Variabilität der Biglykanexpression.** DAB-Färbung von Biglykan, Aortenklappen mit schwacher (links) oder starker (rechts) Anfärbbarkeit, Maßstabsbalken: 500 µm,

Bei der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von  $\alpha$ SMA und Vimentin wurden beide Ziele getrennt ausgewertet. Die Vimentin-Anfärbung wurde hierbei qualitativ in drei Intensitätsstufen eingeteilt. 16 von 20 Klappen ließen sich jedoch der mittleren Ausprägung zuordnen und auch die Gruppen LVAD und NoVAD unterschieden sich nicht signifikant.  $\alpha$ SMA war bei allen Klappen auf der aortalen Klappenseite endothelseitig der Basalmembran und unmittelbar an diese angrenzend angefärbt. Auch hier war bei den meisten Klappen eine mittlere Ausprägung vorhanden und die Gruppen LVAD und NoVAD unterschieden sich nicht signifikant. Die Spannweite der Unterscheide ist in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: Unterschiedlich starke Darstellbarkeit von αSMA im aortalen Bereich** Immunfluoreszenzdoppelfärbung von αSMA (rot) und Vimentin (grün). Überlagerungsaufnahmen von zwei Aortenklappen mit keinem (links) und viel (rechts) nachweisbarem αSMA an der aortalen Seite der Klappe. Maßstabsbalken: 100 μm, αSMA: α Glattmuskelaktin.

Im Intermediärbereich, das heißt zwischen der Basalmembran auf der aortalen und der Basalmembran der ventrikulären Seite, gab es bei 5 Klappen ein nachweisbares αSMA-Signal. Da alle 5 Klappen zu Patienten der LVAD-Gruppe gehörten, unterschied sich das αSMA-Signal im Intermediärbereich der Klappen somit signifikant im Vergleich zur NoVAD-Gruppe wo kein αSMA im Intermediärbereich nachgewiesen wurde ( $p: 0,020$ ). Beispiele von αSMA im Intermediärbereich sind in Abbildung 20 dargestellt. Auf der ventrikulären Seite konnte bei keiner Klappe αSMA dargestellt werden [138].



**Abbildung 20: αSMA im Intermediärbereich.** Immunfluoreszenzdoppelfärbung von αSMA (rot) und Vimentin (grün). Überlagerungsaufnahmen von zwei der fünf Aortenklappen von LVAD-Patienten mit nachweisbarem αSMA im Intermediärbereich. Maßstabsbalken: 100 μm, αSMA: α Glattmuskelaktin.

### 3.5.2 Korrelation mit LVAD-Dauer

Bezüglich der LVAD-Dauer bestand eine negative Korrelation mit der Expression von MMP2 ( $p: 0,004$ ). Dieser Trend zeigte sich auch bei TGF $\beta$ 1 ( $p: 0,0503$ ). Bei der Expression von MMP9 gab es keine signifikante Korrelation. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 21 dargestellt.

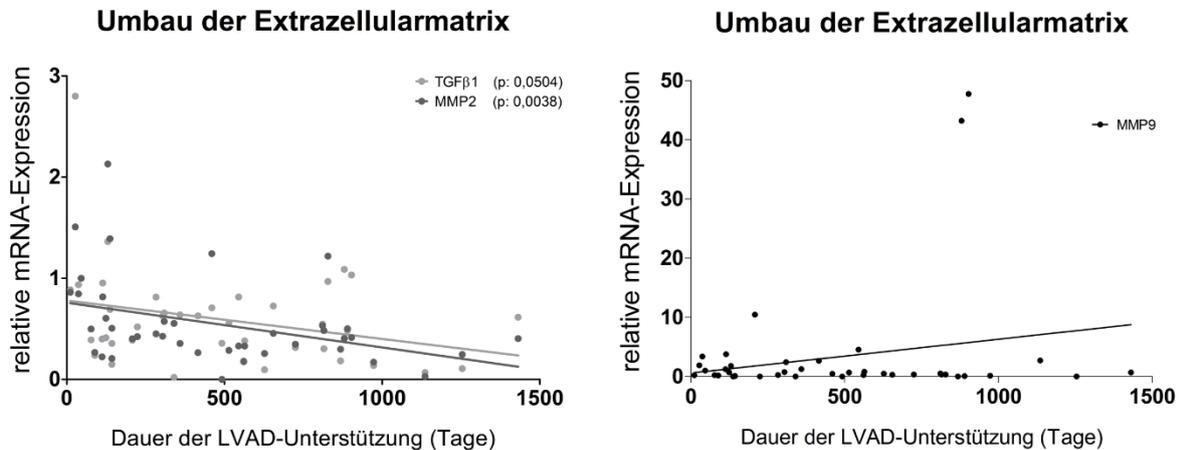


Abbildung 21: Einfluss der LVAD-Dauer auf die Marker zum Umbau der Extrazellulärmatrix. Negative Korrelationen der LVAD-Dauer mit den entsprechenden relativen mRNA-Expressionswerten. Der p-Wert wurde mit Spearman-Korrelationskoeffizient bestimmt. LVAD: *left ventricular assist device*, TGF $\beta$ 1: *Transforming growth factor  $\beta$ 1*, MMP: *Matrixmetalloprotease*.

## 3.6 Chondro-osteogene Differenzierung

### 3.6.1 Vergleich NoVAD vs. LVAD

In der PCR wurden die Marker Osteopontin, Osteocalcin und die alkalische Phosphatase untersucht. Die Genexpression von OPN war in der LVAD-Gruppe signifikant höher als in der NoVAD-Gruppe ( $p: 0,003$ ). Bei der Genexpression von OCN ( $p: 0,097$ ) und ALP ( $p: 0,977$ ) bestand hingegen kein signifikanter Unterschied abhängig vom Vorhandensein eines LVAD. Dies findet in Abbildung 22 Darstellung [138].

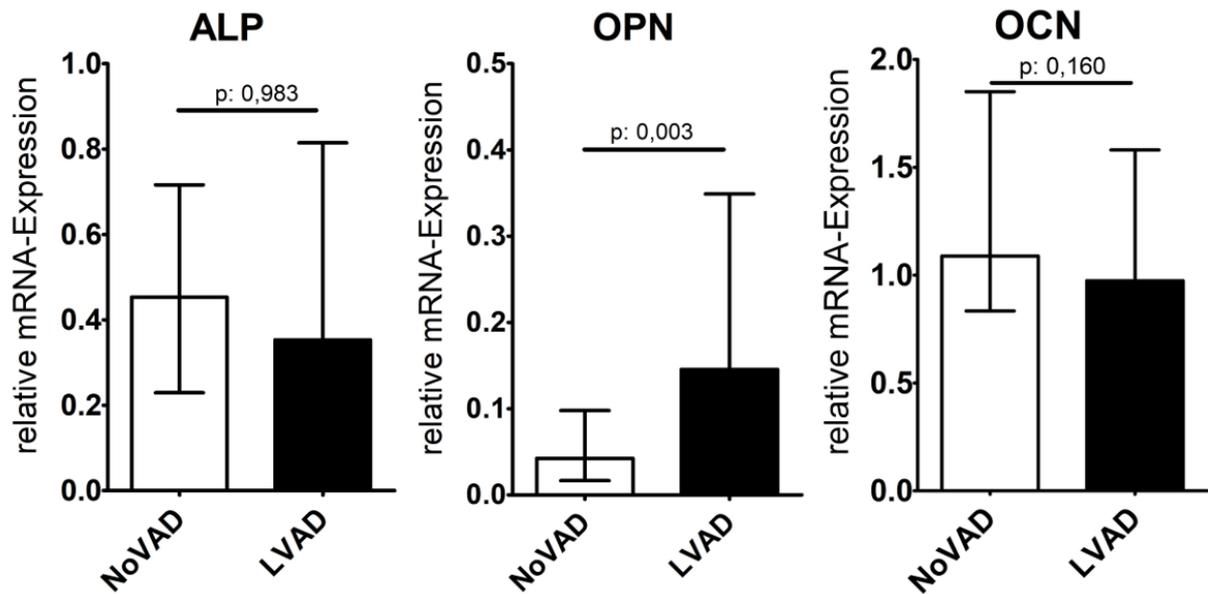
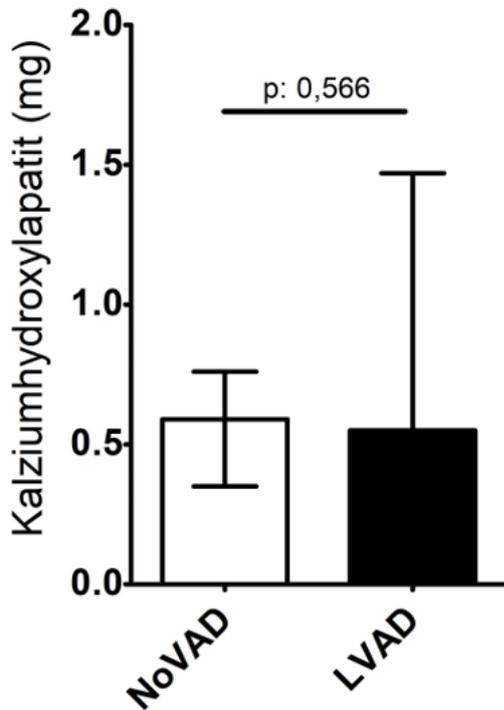


Abbildung 22: Kalzifizierungsmarker: Die Expression von ALP (links) und OCN (rechts) fiel bei LVAD-Patienten nicht signifikant höher aus, während OPN (Mitte) signifikant höher exprimiert wurde. Der p-Wert wurde mit *Mann-Whitney u-test* bestimmt. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. NoVAD: Teil der Kohorte ohne *left ventricular assist device*, LVAD: Teil der Kohorte mit *left ventricular assist device*, ALP: alkalische Phosphatase, OPN: Osteopontin, OCN: Osteocalcin

Beim Vergleich der Marker untereinander zeigte sich eine signifikante Korrelation von OPN mit den Entzündungsmarkern IL1 $\beta$  (p: 0,024) und IFN $\gamma$  (p: 0,001) sowie TGF $\beta$ 1 (p: 0,004) und MMP9 (p: <0,001). OCN korreliert signifikant mit TGF $\beta$ 1 (p: <0,001), IFN $\gamma$  (p: 0,023) und MMP2 (p: <0,001). ALP korreliert signifikant mit TGF $\beta$ 1 (p: 0,001) TNF $\alpha$  (p: 0,034) und MMP2 (p: 0,001).

Beim Vergleich der Klappen, welche im CT untersucht wurden, wurde der Wert für die äquivalente Masse an Kalziumhydroxylapatit in mg verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die gemessene Kalziumhydroxylapatitmasse in der LVAD-Gruppe nicht signifikant von der gemessenen Masse in der NoVAD-Gruppe unterscheidet. Auch eine Niereninsuffizienz oder ein Diabetes mellitus führte nicht zu einer signifikant höheren oder niedrigeren gemessenen Kalziumhydroxylapatitmasse. Patienten, die aufgrund einer ICM transplantiert wurden, zeigten einen Trend zu einer höheren Kalziumhydroxylapatitmasse im CT (p: 0,064) im Vergleich zu den Patienten der Gruppe DCM. Die gemessene Kalziumhydroxylapatitmasse korrelierte positiv mit der relativen Genexpression der Marker TNF $\alpha$  (p: 0,023), IFN $\gamma$  (p: 0,006), TGF $\beta$ 1 (p: 0,001), MMP9 (p: 0,003) und OPN (p: 0,049). Keine Korrelation bestand zwischen der Kalziumhydroxylapatitmasse und der LVAD-Dauer. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 23 zusammengefasst.

## CT-Kalziumbestimmung



## Korrelationen mit CT-Kalziumbestimmung

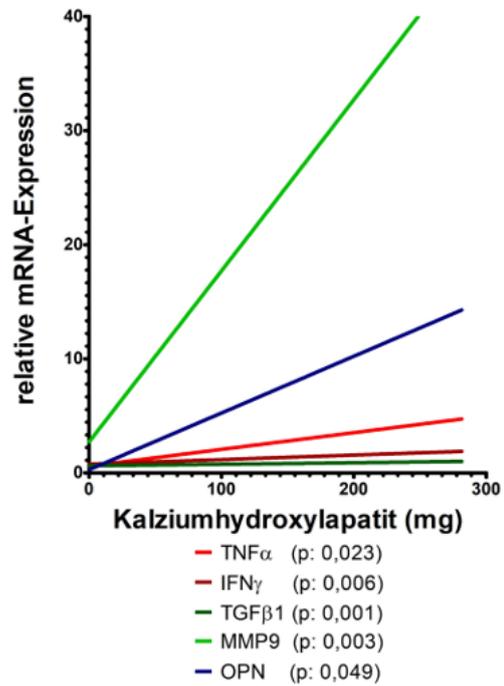


Abbildung 23: Messungen der Kalklast mittels CT. Links: Bestimmung der äquivalenten Kalziumhydroxyapatitmasse im CT von Patienten mit und ohne LVAD zeigte keinen signifikanten Unterschied. Der p-Wert wurde mit *Mann-Whitney u-test* bestimmt. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. Rechts: Korrelationen der äquivalenten Kalziumhydroxyapatitmasse im CT mit den entsprechenden relativen mRNA-Expressionswerten. Der p-Wert wurde mit *Spearman-Korrelationskoeffizient* bestimmt. No-VAD: Teil der Kohorte ohne *left ventricular assist device*, LVAD: Teil der Kohorte mit *left ventricular assist device*, CT: Computertomographie, TNF $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , IFN $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ , TGF $\beta$ 1: *Transforming growth factor  $\beta$ 1*, MMP9: Matrixmetalloprotease 9, OPN: Osteopontin

Mit der Färbung Von-Kossa konnte in 17 der 20 Klappen Kalk nachgewiesen werden. Bei 13 Klappen handelte es sich um Mikrokalk, der erst bei stärkerer Vergrößerung sichtbar wurde. Bei 3 Klappen war der Kalk bereits in der orientierenden Übersichtsaufnahme zu erkennen. Bei einer Klappe konnte eine starke Verkalkung bereits makroskopisch gesehen werden. Exemplarisch wird dies in Abbildung 24 und 25 dargestellt. Beim Vergleich der LVAD- und der NoVAD-Patienten zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der Verkalkung.

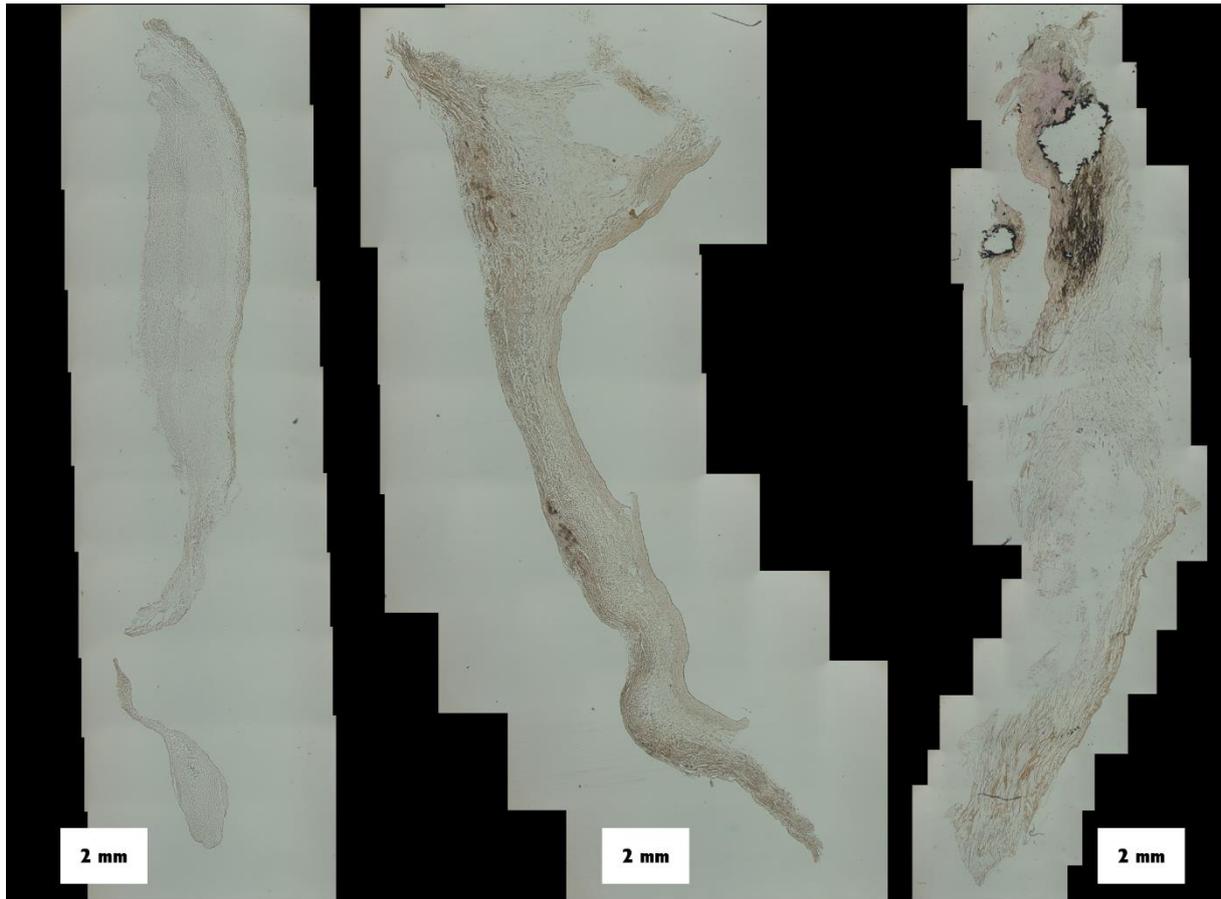


Abbildung 24: Variabilität der Verkalkungen. Drei nach Von-Kossa gefärbte Aortenklappen mit unterschiedlicher Kalklast, Maßstabsbalken: 2 mm

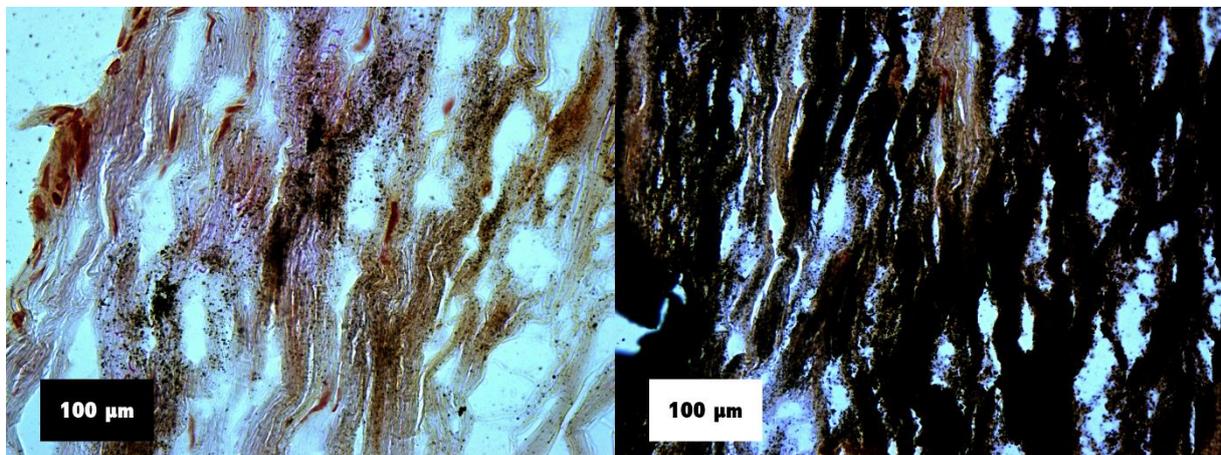


Abbildung 25: Mikrokalk und ausgeprägte Verkalkung. Zwei nach Von-Kossa gefärbte Aortenklappen mit Mikrokalk (links) und ausgeprägter Verkalkung (rechts), Maßstabsbalken: 100 µm

### 3.6.2 Korrelation mit LVAD-Dauer

Zwischen der LVAD-Dauer und der Expression an OPN, OCN und ALP zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (Abbildung 26).

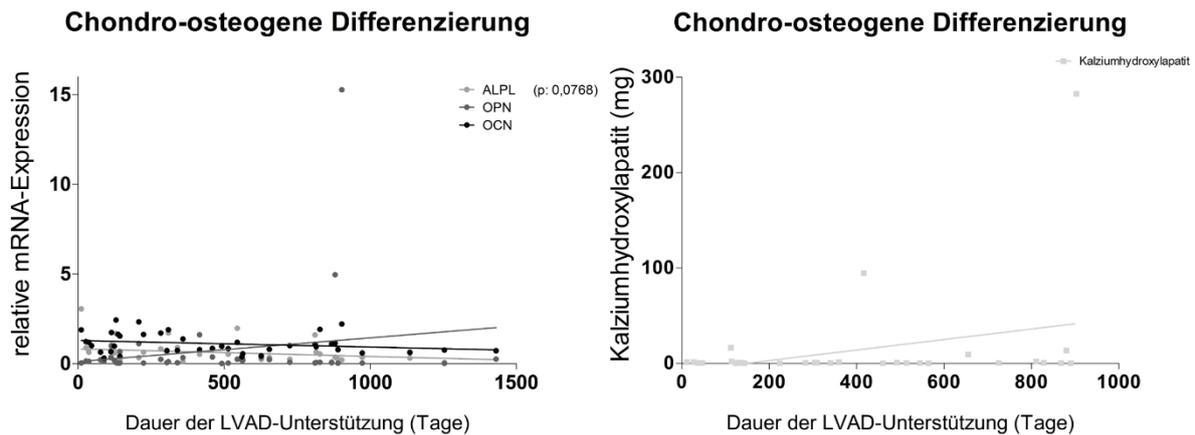


Abbildung 26: Einfluss der LVAD-Dauer auf die Marker für Chondro-osteogene Differenzierung. Negative Korrelationen der LVAD-Dauer mit den entsprechenden relativen mRNA-Expressionswerten. Der p-Wert wurde mit Spearman-Korrelationskoeffizient bestimmt.

## 3.7 Auswertungen hinsichtlich unabhängiger Einflussfaktoren

Wie in der deskriptiven Statistik bereits dargestellt unterschieden sich die Gruppen NoVAD und LVAD nicht hinsichtlich der Häufigkeit einer Niereninsuffizienz oder eines Diabetes Mellitus. Es bestand jedoch ein signifikant höherer Anteil an ICM-Patienten in der Gruppe LVAD ( $p: 0,0068$ ).

### 3.7.1 Einfluss durch die Indikation

Von den 31 Patienten der Gruppe DCM waren 17 Patienten mit LVAD versorgt, während 14 der Gruppe NoVAD zuzuordnen waren. Von den 27 ICM-Patienten waren jedoch 23 mit LVAD versorgt und lediglich 4 ohne LVAD. Von den 5 Patienten mit anderen Grunderkrankungen war lediglich ein Patient mit einem LVAD versorgt. Somit unterscheiden sich die Gruppen LVAD und NoVAD signifikant in ihrer Zusammensetzung hinsichtlich der Indikation. In der LVAD Gruppe befinden sich signifikant mehr Patienten mit ICM ( $p: 0,007$ ) und in der NoVAD Gruppe befinden sich signifikant mehr Patienten mit sonstigen Indikationen ( $p: 0,046$ ).

Zwischen ICM und DCM Patienten zeigen sich Unterschiede in der Genexpression. So ist IL1 $\beta$  bei Patienten mit einer ICM ( $p: 0,037$ ) vermehrt exprimiert. Auch MMP9- ( $p: 0,003$ ) und OPN-Expression ( $p: 0,001$ ) sind bei ICM-Patienten signifikant höher. Dies ist in Abbildung 27 dargestellt. Des Weiteren ließ sich bei diesen Patienten auch mehr Kalk im CT feststellen ( $p: 0,047$ ).

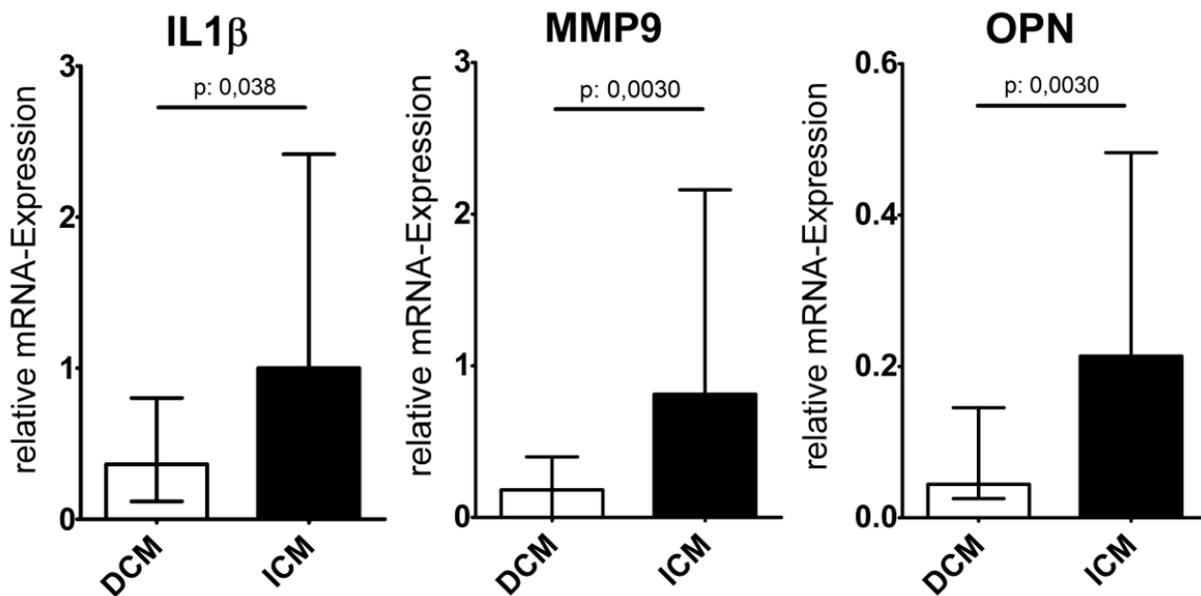


Abbildung 27: Einfluss der Indikation. Die Expression von IL1 $\beta$  (links), MMP9 (Mitte) und OPN (rechts) fiel bei LVAD-Patienten signifikant höher aus. Der p-Wert wurde mit *Mann-Whitney u-test* bestimmt. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. DCM: Teil der Kohorte mit dilatativer Kardiomyopathie, ICM: Kohorte mit ischämischer Kardiomyopathie, IL1 $\beta$ : Interleukin 1 $\beta$ , MMP9: Matrixmetalloprotease 9, OPN: Osteopontin

Da dies somit einen relevanten Störfaktor darstellen kann, man also einen Effekt der vermehrt vorkommenden ICM-Patienten innerhalb der LVAD-Gruppe beobachten und diesen als Folge der mechanischen Kreislaufunterstützung missinterpretieren kann, wurde eine Analyse unter Ausschluss der ICM-Patienten durchgeführt. Das heißt lediglich Patienten mit DCM oder sonstigen Indikationen zur Herztransplantation wurden hinsichtlich des Vorhandenseins eines LVAD aufgeteilt und verglichen.

Hierbei zeigte sich auch in diesem Teil der Patientenkohorte bestehend aus 37 Patienten eine signifikant höhere Expression an IL1 $\beta$  (p: <0,001), TNF $\alpha$  (p: 0,046) OPN (p: 0,013) bei Patienten mit LVAD im Vergleich zur Gruppe NoVAD. MMP9 war jedoch nicht signifikant stärker exprimiert (p: 0,149).

### 3.7.2 Einfluss durch Infektionen des LVAD-Systems

Bei der Listung von Patienten treten die für - mechanische Unterstützungssysteme spezifischen Leistungsgründe LVAD-Pumpthrombose und LVAD-Systeminfekt auf. Beim Vergleich der LVAD-Patienten, welche unmittelbar vor der Herztransplantation einen LVAD-Systeminfekt hatten und daraufhin dringlich transplantiert wurden, mit den Patienten, welche keinen beschriebenen Infekt des LVAD-Systems hatten, zeigten sich keine signifikanten Genexpressionsunterschiede der drei untersuchten Entzündungsmarker (Abbildung 28).

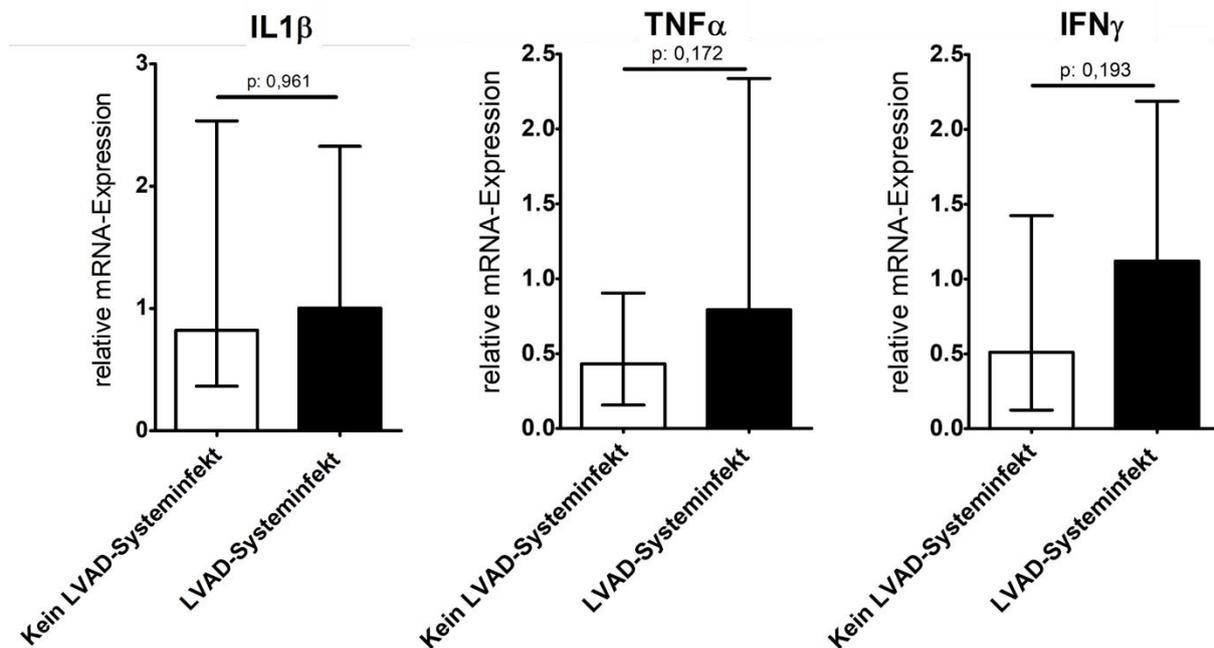


Abbildung 28: Einfluss eines LVAD-Systeminfekts Die Expression von IL1 $\beta$  (links), TNF $\alpha$  (Mitte) und IFN $\gamma$  (rechts) fiel bei vorhandenem LVAD-Systeminfekt nicht signifikant höher aus als bei Patienten ohne diese Komplikation. Der p-Wert wurde mit *Mann-Whitney u-test* bestimmt. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. LVAD: *left ventricular assist device*, IL1 $\beta$ : Interleukin 1 $\beta$ , TNF $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , IFN $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ ,

### 3.7.3 Einfluss durch Medikamenteneinnahme

Hinsichtlich der Medikation unterschieden sich die Gruppen NoVAD und LVAD bei einigen Präparaten. Bezüglich der in der LVAD-Gruppe eingenommenen PD5-Hemmern (p: 0,004) zeigte sich eine höhere Expression an MMP9 (p: 0,047) bei Einnahme. Die ebenfalls häufiger verordneten Betablocker (p: 0,045) hatten keinen Effekt auf die Expression der untersuchten Marker. Auch Thrombozytenaggregationshemmer (p: 0,003) gingen mit einer höheren Expression an MMP9 (p: 0,009) und OPN (p: 0,002) einher. Bei Medikation mit oralen Antikoagulanzen (p: 0,061) waren OCN (p: 0,006) und MMP2 (p: 0,010) weniger stark exprimiert.

In der NoVAD-Gruppe waren die Patienten häufiger katecholaminpflichtig (p: 0,039). Diese Therapie ging mit einer höheren Expression an ALP (p: 0,039) einher.

Bei Einnahme von ACE-Hemmern zeigte sich eine geringere Expression an OPN (p: 0,040). Bei Statinen bestanden keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Patienten mit und ohne Einnahme.

### 3.7.4 Einfluss durch Diabetes mellitus

Beim Vergleich von Patienten mit einem bekannten Diabetes mellitus, insgesamt 20 von 63 Patienten, wobei ausschließlich Diabetes mellitus Typ 2 oder ohne Angabe des Typs beschrieben war, mit Patienten ohne derartige Diagnose bestanden keine signifikanten Expressionsunterschiede der untersuchten Gene. Es ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Differenzen in der mittels CT gemessenen Kalziumhydroxylapatitmenge.

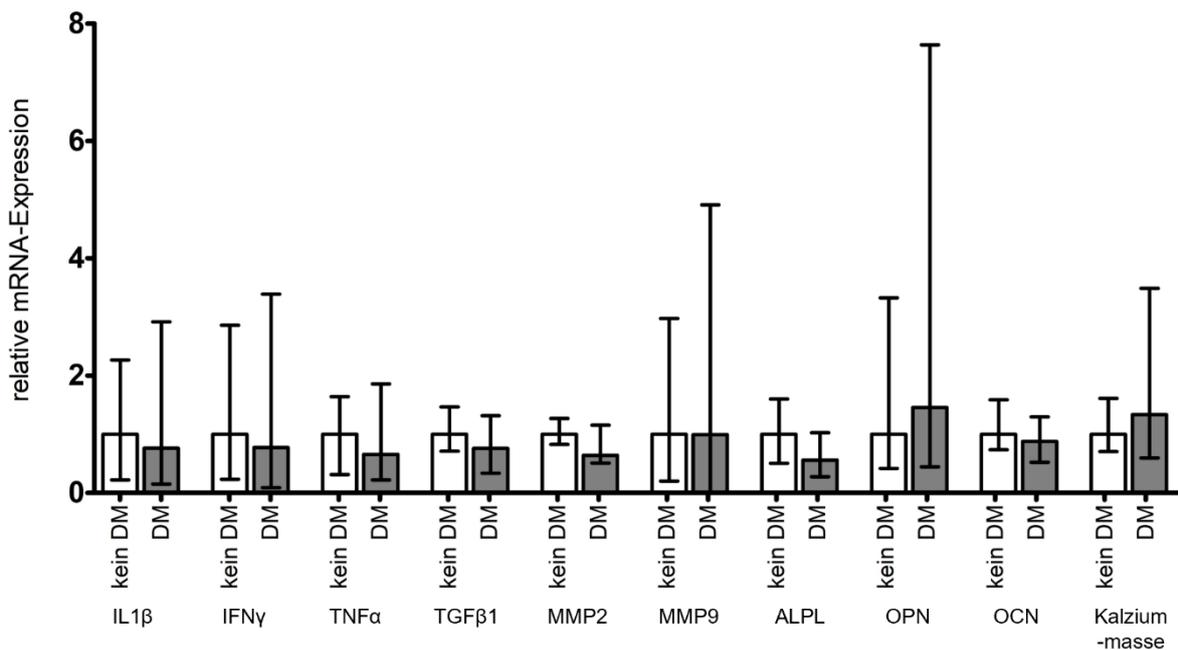


Abbildung 29: Einfluss eines bekannten Diabetes mellitus auf die relative mRNA-Expression der untersuchten Gene und die gemessene Kalziummasse. Es bestanden keine signifikanten Expressionsunterschiede. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. Kein DM: Patienten ohne Nachweis eines Diabetes mellitus, DM: Patienten mit Nachweis eines Diabetes mellitus, IL1β: Interleukin 1β, TNFα: Tumornekrosefaktor α, IFNγ: Interferon γ, TGFβ1: *Transforming growth factor β1*, MMP: Matrixmetalloprotease, ALP: alkalische Phosphatase, OPN: Osteopontin, OCN: Osteocalcin, Kalziummasse: Mittels CT bestimmte äquivalente Kalziumhydroxylapatitmasse.

### 3.7.5 Einfluss durch chronische Niereninsuffizienz

Beim Vergleich von Patienten mit vordiagnostizierter chronischer Niereninsuffizienz, insgesamt 38 von 63 Patienten, mit Patienten ohne derartige Diagnose bestanden keine signifikanten Expressionsunterschiede der untersuchten Gene. Es ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Differenzen in der mittels CT gemessenen Kalziumhydroxylapatitmenge.

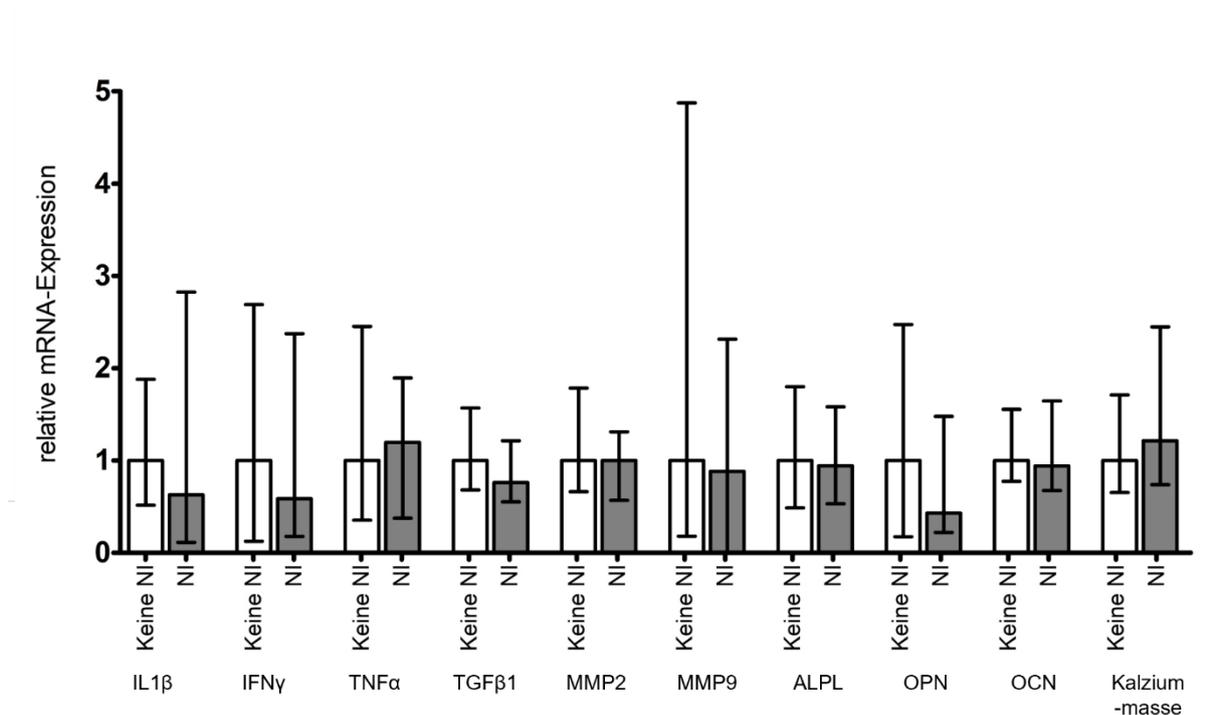


Abbildung 30: Einfluss einer bekannten chronischen Niereninsuffizienz auf die relative mRNA-Expression der untersuchten Gene und die gemessene Kalziummasse. Es bestanden keine signifikanten Expressionsunterschiede. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. Kein NI: Patienten ohne bekannte chronische Niereninsuffizienz, NI: Patienten mit bekannter chronischer Niereninsuffizienz, IL1β: Interleukin 1β, TNFα: Tumornekrosefaktor α, IFNγ: Interferon γ, TGFβ1: *Transforming growth factor β1*, MMP: Matrixmetalloprotease, ALP: alkalische Phosphatase, OPN: Osteopontin, OCN: Osteocalcin, Kalziummasse: Mittels CT bestimmte äquivalente Kalziumhydroxylapatitmasse.

## 4 Diskussion

### 4.1 Auswahl eines RNA-Isolationsverfahrens anhand der Vorversuche

Beim Vergleich der konkurrierenden Verfahren zur Zerkleinerung der Klappen wurde eine hohe Qualität als das wichtigste Ziel angestrebt und eine möglichst hohe Ausbeute als zweite Priorität gewichtet, um mit den aufgrund der limitierten Zahl an Herztransplantationen besonders seltenen Proben, ökonomisch umzugehen. Weitere Kriterien waren die Standardisierung des Ablaufs und der Zeitaufwand, welcher sich auch auf die Qualität der RNA auswirkt. Die Zerkleinerung mit dem Mörser ergab die schlechtesten Werte für die Integrität der RNA, sodass das *pellet pestle* und der Homogenisator aufgrund der höheren Werte zu bevorzugen waren. Beide Verfahren haben den Vorteil, dass die Probe direkt im Medium zerkleinert werden kann. Bezüglich der Ausbeute hatte der Homogenisator mit anschließender Fällung mit Isopropanol das beste Ergebnis. Hinsichtlich der Standardisierbarkeit des Ablaufs kann das *pellet pestle* ohne Reinigung der zerkleinernden Komponenten mit Einmal-Aufsätzen betrieben werden. Der Homogenisierungsprozess

dauert hier jedoch sehr lange, ohne dass eine deutliche Zerkleinerung der Klappe zu sehen ist. Beim Homogenisator ist vor jeder neuen Probe eine Reinigung notwendig. Hier besteht grundsätzlich das Risiko, Teile des vorherigen Probematerials zu verschleppen. Dieses Risiko lässt sich jedoch durch eine Reinigung mit mehreren Spüllösungen aus 70 %igem Ethanol oder RNAse-freiem Wasser reduzieren.

Nach Abwägung der beschriebenen Unterschiede wurde aufgrund des Vorteils bei der Ausbeute bei gleicher Qualität der RNA hinsichtlich des RIN-Werts die Anwendung des Homogenisators vorgezogen.

## 4.2 Untersuchung der Aortenklappen mittels CT

Bei den Genen, deren mRNA-Expression untersucht wurde und deren Zusammenhang mit der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung in der Literatur gezeigt wurde, handelt es sich um Surrogatparameter der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung. Lediglich histologische und immunhistologische Untersuchungen können eine Degeneration der Aortenklappentaschen wie Sklerose, Fibrose und Kalzifizierung direkt darstellen. Diese Untersuchungsverfahren lassen sich jedoch vorrangig qualitativ oder semiquantitativ auswerten. Der Kalkgehalt hingegen stellt einen Parameter dar, welcher sowohl quantitativ bestimmbar ist, als auch direkt einer pathologischen Veränderung der Klappe entspricht.

Eine Möglichkeit besteht hierbei in der Durchführung eines Assays zur Messung der Kalziumionen, welche mit dem Gesamtkalkgehalt korrelieren. Ein photometrischer Assay stellt beispielsweise eine der in der Laboratoriumsmedizin etablierten Methoden zur Kalziumbestimmung in Serum dar [139]. Konkurrierend hierzu bietet eine Untersuchung der Klappentaschen mittels CT und der Identifikation röntgendichtere Areale einige Vorteile. Da hier keine Lyse der Klappe in einem für den Kalziumassay geeigneten Puffer notwendig ist, sondern die CT-Untersuchung nicht invasiv ist, steht die Klappentasche im Anschluss noch für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Nicht nur kann man hierdurch mit weniger Probenmaterial auskommen, sondern es besteht auch die Möglichkeit einer Korrelationsanalyse, da man CT und RNA-Isolation mit denselben Proben durchführen kann. Weiterhin besteht bei dieser Methode der Kalziumbestimmung kein Fehlerrisiko durch die geringe Löslichkeit der Kalziumsalze.

Grundsätzlich sind *in vivo* Verfahren zur Bestimmung der Kalklast eines Gewebes mittels CT bereits etabliert. Klinische Anwendungsbeispiele sind die Knochendichtemessung bei Osteoporose und der Agatston Kalziumscore zur Bestimmung der Kalklast [140] in den Koronargefäßen des Herzens [137, 141]. Auch die Messung der Kalklast der Aortenklappe, zum Beispiel vor einer Intervention, wird mittels CT durchgeführt [112, 128]. In der vorliegenden Arbeit wurden die CT-Untersuchungen der isolierten Aortenklappentaschen

mit den gleichen Verfahren wie bei den Patienten durchgeführt. Da dieser Ansatz mit keiner Strahlenbelastung für einen lebenden Patienten verbunden ist, konnte ein höher auflösendes „Felsenbeinprogramm“ verwendet werden. Eine *ex vivo* Messung des Kalkgehaltes von Aortenklappentaschen unter Verwendung eines hochauflösenden „MicroCT“ wird in der Literatur beschrieben [114].

Die Schwellenwerte in HU wurden analog zur den Jilaihawi et al. gewählt [128]. Visuell unterschiedlich stark verkalkte Klappen wurden in Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen unterschieden sich sowohl im CT als auch im Kalziumassay signifikant, sodass das CT ein geeignetes Werkzeug zur Unterscheidung zwischen nicht, wenig und stark verkalkten Aortenklappentaschen darstellt. Eine Limitation stellt die Auflösung dar, im Fall der in dieser Studie verwendeten Methodik 0,1 mm große Verkalkungen. Weiterhin werden nur röntgendichte Strukturen erkannt, das Verfahren ist somit nicht spezifisch für Kalziumverbindungen. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass auch fibrotische Areale ausreichend röntgendicht sind, um in dieser Untersuchung als falsch-positiv missinterpretiert zu werden.

Hinsichtlich Kühlbarkeit der Proben, Kosten und Aufwand stellte sich das Verfahren als äußerst zweckmäßig dar. Auch zahlreiche Korrelationen zwischen gemessener Kalklast und anhand der Literaturlage ausgewählten Surrogatparametern sprechen für die Eignung des Verfahrens.

### 4.3 Entzündung und Immunreaktion

Entzündliche Veränderungen nehmen eine Schlüsselrolle in der Entstehung der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung ein und beeinflussen auch den Progress durch Umbau der Matrix und Kalzifizierung [48, 53, 82, 116]. Eine durch das Vorhandensein eines mechanischen Unterstützungssystemes vermehrte Entzündungsreaktion innerhalb der Aortenklappe würde somit auf einen degenerativen Prozess hinweisen. Für das Myokard konnte bereits eine vermehrte Aktivität von Entzündungsmarkern wie TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  im Rahmen der LVAD-Nutzung gezeigt werden [14, 15, 142]. Durch LVAD kommt es zu deutlich veränderten Strömungsverhältnissen im Bereich der Herzklappen [11, 12]. Da eine Assoziation von erhöhter Expression entzündlicher Marker bei verändertem Scherstress besteht [83, 95] kann ein LVAD entzündliche Veränderungen auf diesem Wege begünstigen. Ein spezifischer Unterschied in der Expression von TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IFN $\gamma$  bei LVAD-Patienten gegenüber Patienten ohne LVAD wurde vor der vorliegenden Untersuchung in der Literatur noch nicht beschrieben [138]. Auch Stephens et al. zeigten in einer massenspektrometrischen Untersuchung, also einem Vergleich des Proteoms von Herztransplantationspatienten mit und ohne LVAD keine signifikanten Unterschiede im Bereich der Entzündungsmarker [32].

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass alle drei ausgewählten Marker, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IFN $\gamma$ , in Aortenklappengewebe von Patienten mit LVAD signifikant stärker exprimiert werden. TNF $\alpha$  stellt hierbei ein Zytokin dar, welches *in vitro* valvulär interstitielle Zellen (VIC) stimuliert und prokalzifizierend über eine Stimulation der alkalischen Phosphatase wirkt [85, 86, 119]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden, da die Expression von ALP und TNF $\alpha$  miteinander korrelieren. TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  aktivieren beide NF $\kappa$ B und hierüber die Kalziumaufnahme durch Osteoklasten [77, 86]. Auch IL1 $\beta$  wirkt prokalzifizierend [87, 88]. Somit ist ausgehend vom aktuellen Forschungsstand anzunehmen, dass eine Klappe mit erhöhten Spiegeln der betreffenden Zytokine auch vermehrt degenerativ verändert ist.

Hinsichtlich der Einwanderung von Zellen des Immunsystems besteht in kalzifizierten Klappen eine Assoziation zu erhöhten Druckgradienten über der Aortenklappe [84]. Da der arterielle Mitteldruck durch ein LVAD gesteigert wird [20] erhöht sich auch der Druck über der Klappe, sodass man vermehrt Immunzellen in den Aortenklappen von LVAD-unterstützten Herzen erwarten könnte. Hinsichtlich der Nachweisbarkeit von Immunzellen in den Aortenklappen von LVAD-Patienten besteht jedoch eine widersprüchliche Datenlage. Während manche Untersuchungen keine Immunzellen nachweisen konnten [22], zeigten andere Untersuchungen eine erhöhte Anzahl an CD68-positiven Makrophagen [31]. In der vorliegenden Arbeit gelang in 10 % der untersuchten Klappen der Nachweis von CD68-positiven Zellen, es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne LVAD.

Die in der LVAD-Kohorte gegenüber der NoVAD-Kohorte signifikant höheren Spiegel der Zytokine TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IFN $\gamma$ , welche ebenfalls in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden, lassen sich bei diesen Ergebnissen des immunhistochemischen Nachweises von Immunzellen nicht plausibel über eine vermehrte Anwesenheit an Immunzellen erklären. Auch eine systemische Infektion als Ursache dieser Zytokinspiegel erscheint eher unwahrscheinlich, da das gemessene CRP im Blut der LVAD-Patienten signifikant niedriger war als im Blut der Patienten ohne mechanische Unterstützung, ein Befund, welcher sich so mit der Literaturlage deckt [19]. Einige der LVAD-Patienten litten unmittelbar vor der Transplantation an einem LVAD-Systeminfekt und wurden deshalb als besonders dringliche Transplantationspatienten eingestuft. Eine Infektion des LVAD-Systems, vermittelt über einen Biofilm auf der transkutanen Stromversorgungsleitung des LVAD, könnte hypothetisch auch die Ursache von erhöhten Zytokinspiegeln sein, da ein LVAD-Systeminfekt nur bei LVAD-Patienten vorkommen kann und somit ungleich über die Gruppen verteilt wäre. Um diesen Einflussfaktor auszuschließen, wurden innerhalb der LVAD-Gruppe die Patienten mit und ohne LVAD-Systeminfekt vor Transplantation miteinander verglichen. Da sich hierbei keine signifikanten

Genexpressionsunterschiede bei allen drei Entzündungsmarkern TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IFN $\gamma$  zeigte, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die Unterschiede zwischen NoVAD und LVAD-Gruppe hierdurch verursacht wurden.

Eine Sekretion von Zytokinen durch VIC ist *in vitro* [143] und in untersuchten Herzklappen nachgewiesen [97, 102]. Endothelzellen reagieren im Tierversuch auf Scherstress mit einer erhöhten Expression an Zytokinen [83]. Insgesamt kommen als Quelle der Zytokine somit am ehesten diese im Untersuchungsmaterial vorhandenen Zellpopulationen im Rahmen einer Reaktion auf das vorhandene LVAD in Frage. Mechanistisch spielen hier wahrscheinlich die geänderten Strömungsverhältnisse eine Rolle.

Insgesamt wahrscheinlich ist, dass die LVAD-Patienten mit höheren Zytokinspiegeln auch vermehrt von den mit den Markern assoziierten Mechanismen der Aortenklappendegeneration betroffen sind.

#### 4.4 Umbau der Extrazellulärmatrix

Einige morphologische Veränderungen und Umbauprozesse der Aortenklappen von LVAD-Patienten wurden in der Literatur bereits beschrieben. In der zeitweise komplett geschlossenen Klappe kommt es hier zu einer Verwachsung der Kommissuren [11, 21, 22], was jedoch durch van Rijswijk et al. nicht als Folge des Umbauprozesses beschrieben wird [31]. Saito et al. beschreiben ein dünnere Ventrikularis der Aortenklappen von LVAD-Patienten während Spongiosa und Fibrosa keine unterschiedliche Schichtdicke zeigten [30]. Veränderungen der Schichtdicke der Aortenklappentaschen konnten in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden und auch zwischen den einzelnen Schichten zeigten sich keine auffälligen Unterschiede. Als Limitation ist hier zwar anzusehen, dass Strukturen wie die Aortenklappentaschen unterschiedlich dicke Areale aufweisen können und zusätzlich bei der Anfertigung von Schnitten die Schichten nicht immer tangential getroffen werden können. Auch spezifischere Darstellungen der Matrixbestandteile mit der Movat-Pentachrome-Färbung und der DAB-Färbungen zeigten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne LVAD. Es ergaben sich somit hier keine mikroskopisch erkennbaren Veränderungen der Klappen, die sich auf den Einsatz des LVAD zurückführen ließen. Insgesamt stellten sich die Aortenklappentaschen sehr heterogen dar, und sowohl in der LVAD-Gruppe als auch in der NoVAD-Gruppe zeigten sich deutlich degenerierte Klappen mit auffälligem Aufbau.

Die Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 53 Jahren sowie diverse kardiovaskuläre Risikofaktoren. So waren in der gesamten Stichprobe, also unabhängig von LVAD, 46 % Raucher, 57 % litten an arterieller Hypertonie, 54 % an Dyslipoproteinämie und 29 % an Diabetes mellitus. Dies alles sind unabhängige

Risikofaktoren, deren Zusammenhang zur Kalzifizierung der Aortenklappen bereits beschrieben wurde [52-56, 58], bestehen also diese vielen möglichen Einflussfaktoren und Ursachen einer Aortenklappendegeneration von vorneherein, sodass der Einfluss eines LVAD auf die Aortenklappendegeneration in der vorliegenden Arbeit nicht zu signifikant unterschiedlichen Effekten führt. Ein LVAD-Einfluss kann bei einer Überlagerung so vieler unabhängiger Risikofaktoren bei einem subjektiven Verfahren wie der Histologie jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Sehr auffällig war in dieser Arbeit jedoch die Verteilung des  $\alpha$ SMA über die Schichten der Aortenklappe. Während in fast allen Klappen auf der aortalen Seite  $\alpha$ SMA-positive Zellen angefärbt werden konnten, gelang dies im mittleren Bereich der Klappe lediglich bei Proben von LVAD-Patienten. Da  $\alpha$ SMA als Marker für eine Aktivierung der VIC beschrieben ist [98] spricht die Anfärbbarkeit von  $\alpha$ SMA in diesem Klappenbereich für das Vorhandensein von aktivierten VIC.

Aktivierte VIC nehmen eine Schlüsselrolle in Umbauprozessen der Matrix ein [96, 102]. So erhöhen sie die Expression von Matrixmetalloproteasen und ihren gewebeständigen Inhibitoren [101, 102]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikant höhere Expression an MMP9 in den Proben der LVAD-Patienten [138]. In der Literatur wird hingegen keine Expression von MMP9 in gesunden Aortenklappen beschrieben, sondern lediglich die Detektion im Bereich kalzifizierter Läsionen [106, 107]. Sun et al. beschreiben darüber hinaus eine Induktion der MMP9-Expression durch Scherstress [95]. Durch die veränderten Strömungsverhältnisse bei LVAD-Einsatz besteht hier ein mechanistischer Erklärungsansatz für den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Expressionsunterschied [11, 12]. Der durch Lai et al. beschriebene Regulationsmechanismus über Osteopontin und TNF $\alpha$  [105] konnte nachvollzogen werden, da die Expression an MMP9 mit der Expression an OPN und TNF $\alpha$  in der vorliegenden Arbeit positiv korreliert. Da sie überdies auch mit der Expression von IL1 $\beta$  korreliert, ergibt sich die Frage ob auch hier eine wechselseitige oder gemeinsame Regulation besteht, da eine Stimulation von MMP1 und MMP2 durch IL1 $\beta$  in der Literatur beschrieben wurde [67, 104]. Dies konnte jedoch nicht in Form einer Korrelation der Expression von MMP2 und IL1 $\beta$  nachvollzogen werden. Die MMP9-vermittelten Veränderungen an Elastin und Proteoglykanen in einem Patientenkollektiv mit kalzifizierender Aortenklappenerkrankung [108, 109] konnten wie bereits beschrieben ebenfalls nicht nachvollzogen werden. Das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit unterscheidet sich insbesondere dadurch von dem der genannten Studien [108, 109], dass hier der Zeitraum zwischen dem angenommenen Stimulus durch Einbau des LVAD und dem Endpunkt der Beobachtungszeit aufgrund der Herztransplantation begrenzt ist und damit auch die Zeitspanne, die für strukturelle Veränderungen zur Verfügung steht, limitiert ist.

Bezüglich der Wechselwirkungen zwischen aktivierten VIC und TGF $\beta$ 1 ist die Studienlage besonders reichhaltig. So wird sowohl die Sekretion von TGF $\beta$ 1 durch VIC [96, 97] als auch die Stimulation von VIC durch TGF $\beta$ 1 [91, 92] beschrieben, also ein autokriner positiver Feedbackmechanismus. Stephens et al. beschreiben in LVAD-Patienten eine vermehrte Bildung zahlreicher Proteine, welche zum Signalweg von TGF $\beta$ 1 gehören, ohne jedoch vermehrt TGF $\beta$ 1 selbst nachzuweisen [32, 144]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte keine vermehrte Expression von TGF $\beta$ 1 in den Aortenklappen der LVAD-Patienten nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigt sich in der vorliegenden Arbeit ein gemischtes Bild hinsichtlich der Umbauprozesse innerhalb der Klappe. Zwar konnten aktivierte VIC dargestellt und MMP9 nachgewiesen werden. Veränderungen in der Expression des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ 1 konnte jedoch auf mRNA-Ebene genau so wenig nachgewiesen werden wie die Expression von MMP2. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das Bild auf der Ebene der mRNA-Expression am ehesten eine Momentaufnahme des Zuwachses eines Proteins darstellt, dies lässt keine direkten Schlüsse auf die vorhandene Gesamtmenge des Proteinprodukts zu. Hinsichtlich der Proteinexpression ist ein anderes Ergebnis möglich. Auch die durch aktivierte VIC und MMP9 beschriebenen Veränderungen an Kollagen [111], Proteoglykanen [110] und Elastin [109] und daraus resultierende Verdickungen der Klappe [102, 110, 112] zeigten sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Es scheint also in dem untersuchten Kollektiv bei den LVAD-Patienten eine stärkere Aktivierung und Initiierung von Umbauprozessen der Klappenmatrix zu geben, ohne dass dies bereits zu auffälligen morphologischen Veränderungen geführt hätte.

## 4.5 Chondro-osteogene Differenzierung

Für das Krankheitsbild der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung ist der Kalzifizierungsprozess als aktiv regulierte Biomineralisation des im Zuge des Matrixumbau vermehrt vorhandenen Kollagens beschrieben [114]. Eine Kalzifizierung der Aortenklappen durch eine Unterstützung mit einem LVAD ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Getragen wird der Kalzifizierungsprozess von einem Differenzierungsschritt der aktivierten VIC zu VIC mit osteoblastischem Phänotyp [44, 114]. Dieser Schritt wird durch TNF $\alpha$ , dessen Erhöhung in LVAD-Proben in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, und durch TGF $\beta$ 1, dessen verstärkte Signaltransduktion von Stephens et al. [32, 144] gezeigt wurde, stimuliert [117]. Auch ist hinsichtlich der osteogenen Aktivierung der VIC ein Einfluss der Strömungsmechanik beschrieben [118]. Die Grundlagen für diesen

Differenzierungsschritt sind somit bei LVAD-Patienten vorhanden. Osteoblasten produzieren vermehrt OPN und OCN. Diese Proteine sind daher als Marker für Osteoblasten beschrieben [114, 122]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant höhere Expression an OPN in der LVAD-Kohorte gezeigt werden, während sich dies nicht für OCN zeigte [138]. Demnach erwies sich in der vorliegenden Studie nur OPN als Hinweis auf aktivierte VIC von osteoblastischem Phänotyp. Wie Barth et al. dargestellt haben steigt die Expression von OPN in einem Kollektiv mit kalzifizierender Aortenklappenerkrankung stufenweise mit steigender Kalzifizierung, während OCN lediglich bei stark verkalkten Proben nachweisbar war [56]. Somit sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit insgesamt gut vereinbar mit einem beginnenden Kalzifizierungsprozess durch den LVAD-Einsatz. Die Korrelation der Marker OPN und OCN mit TGF $\beta$ 1 konnte nachvollzogen werden, während sich keine Korrelation zu TNF $\alpha$  zeigte.

O'Brien et al. beschrieben eine Ko-Lokalisation von OPN mit Makrophagen [126]. Da in der vorliegenden Arbeit nur wenige Makrophagen im Klappengewebe gezeigt werden konnten, kann diese Aussage nicht direkt nachvollzogen werden. Wenige Makrophagen bedeutet jedoch auch, dass nur wenige davon wie in der Literatur beschrieben zu Osteoklasten, den Gegenspielern der Osteoblasten, differenzieren können [123-125]. Mathieu et al. und andere beschreiben die Abhängigkeit der Biomineralisation von der alkalischen Phosphatase [120, 121] auch beschreiben Barth et al. ALP als sehr frühen Marker für aktivierte VIC [56]. In der vorliegenden Arbeit unterschied sich die ALP-Expression jedoch nicht zwischen den Gruppen LVAD und NoVAD. Eine in der Literatur beschriebene Stimulation von ALP durch TNF $\alpha$  [79, 119] fand in der vorliegenden Arbeit insofern Bestätigung, dass eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expression von ALP und TNF $\alpha$  gezeigt werden konnte

Die histologische Darstellbarkeit von kleinen kalzifizierten Läsionen im Zuge der Biomineralisation mit der Von-Kossa-Färbung wurde bereits durch Puchtler et al. beschrieben [127]. Bemerkenswerter Weise zeigten sich in der vorliegenden Arbeit in 17 der 20 Aortenklappen unabhängig vom LVAD mindestens kleine Mikroverkalkungen. Bei einigen Patienten beider Gruppen zeigte sich sogar eine deutliche Verkalkung der Aortenklappentaschen. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne LVAD, ähnlich wie bereits bei den anderen in dieser Arbeit vorgestellten histologischen Färbungen zur Aortenklappenmorphologie.

In der vorliegenden Arbeit ließen sich Kalkmassen von bis zu 282 mg in einer einzelnen Aortenklappentasche nachweisen. Patienten mit und ohne LVAD unterschieden sich wiederum nicht signifikant.

Ähnlich wie bei der Untersuchung der Umbauprozesse zeigte sich also auch bei der Analyse der Verkalkungen ein heterogenes Bild. So ließen sich auf Ebene der Gentranskription zwar Hinweise für eine vermehrte

osteogene Aktivierung innerhalb der Aortenklappen von LVAD-Patienten finden. Auf Ebene der gemessenen Kalklast oder der histologischen Darstellung des Kalks zeigte sich unabhängig von LVAD bei vielen Patienten eine erhöhte Kalzifizierung, ohne dass sich ein besonderer Unterschied zwischen Patienten mit und ohne LVAD zeigte.

## 4.6 Einfluss der Dauer der mechanischen Unterstützung

Die Verwendung eines LVAD erfolgt meist, um die Wartezeit auf ein geeignetes Transplantat zu überbrücken [10]. Durch die Herkunft der Proben für diese Studie im Rahmen der späteren Herztransplantation wurden nur Patienten mit der Therapie *bridge-to-transplant* inkludiert. Durch die vielen unterschiedlichen Einflussfaktoren auf die Zuteilung eines Transplantates kommt es zu sehr unterschiedlichen Wartezeiten und damit auch zu unterschiedlichen LVAD-Anwendungsdauern [7-9]. Da das Auftreten LVAD-spezifischer Komplikationen zu einer höheren Dringlichkeit der Listung zur Transplantation führt, lässt sich feststellen, dass insbesondere ein komplikationsarmer Verlauf zu einer längeren LVAD-Dauer beitragen kann. Aktuelle Übersichtsartikel deuten an, dass sich eine Erholung der Herzfunktion mit Explantationsmöglichkeit des LVAD im Sinne einer *bridge-to-recovery* eher in der frühen Phase nach LVAD-Implantation einstellt [145] und insgesamt nur bei 1,3 % der Patienten eine solche Verbesserung vorkommt [146]. In der vorliegenden Patientenkohorte variierte die LVAD-Dauer zwischen 11 Tagen und 1431 Tagen.

Für die häufig beschriebene Aortenklappeninsuffizienz als Folge einer LVAD-Therapie wird in der Literatur eine positive Korrelation mit der Nutzungsdauer beschrieben [27]. Eine geschlossene Klappe stellt hierbei einen unabhängigen Risikofaktor dar [27, 28]. Weiterhin konnten Variationen in der Expression profibrotischer und degenerativer Biomarker in Herzmuskelgewebe im Rahmen eines LVAD-Einsatzes gezeigt werden [147]. Für die Expression der ausgewählten Marker für die vorliegende Arbeit sowie für die im CT gemessene Kalklast zeigte sich keine positive Korrelation zur LVAD-Dauer. Die Marker TGF $\beta$ 1 und MMP2 korrelierten negativ mit der LVAD-Dauer, sodass dies nicht auf einen ausgeprägten negativen Einfluss der LVAD-Dauer auf die in der vorliegenden Arbeit zum Zeitpunkt der Herztransplantation festgestellten Veränderungen ergibt. Da in dieser Kohorte für 81 % der Patienten eine adäquate Öffnung der Klappe und für lediglich 32 % der Patienten eine Aorteninsuffizienz beschrieben wurde, scheint der Einfluss dieser Risikofaktoren in dieser Kohorte weniger ausgeprägt.

## 4.7 Bewertung von möglichen Einflussfaktoren

Insgesamt ließen sich die meisten Einfluss- und Störfaktoren, die ebenfalls unabhängig zu einer Aortenklappen degeneration führen könnten, ausschließen, da über das Patientenkollektiv eine Vielzahl an Informationen bekannt war und gezeigt werden konnte, dass sich die LVAD- und die NoVAD-Gruppe bei den meisten Merkmalen nicht unterschieden. Die größte Abweichung der Gruppen bestand darin, dass signifikant mehr Patienten mit ICM mit einem LVAD versorgt waren, während Patienten mit nicht-ischämischer dilatativer Kardiomyopathie seltener mit einem LVAD therapiert wurden. Da sich auch zwischen ICM und DCM ähnliche Unterschiede in der Genexpression zeigten wie zwischen LVAD und NoVAD bestand hier zunächst der Verdacht eines Konfundierungseffektes. Die Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne LVAD ließen sich jedoch auch bei Betrachtung eines reduzierten Patientenkollektives unter Ausschluss der ICM-Patienten für die Marker IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und OPN reproduzieren, sodass dieser Störfaktor für diesen Befund als nicht maßgeblich betrachtet werden konnte. Da MMP9 bei ICM Patienten signifikant stärker exprimiert war, sich dies jedoch nicht in der Kontrolle ohne ICM Patienten zeigte, kann für MMP9 ein Konfundierungseffekt nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise liegt der nicht signifikante Unterschied der MMP9-Expression in der Kontrolle ohne ICM Patienten jedoch auch in der kleineren Kohortengröße von 37 Patienten anstatt 63 Patienten begründet. Jedoch besteht auch eine in der Literatur beschriebene Assoziation zwischen der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung und der Koronaren Herzkrankheit [34, 50] welche wiederum Ursache der ICM ist, sodass eine Assoziation von ICM und Umbauprozessen mit erhöhter MMP9-Expression nicht unwahrscheinlich ist. Insbesondere ist erhöhtes MMP9 mit einem schlechteren Komplikationsrisiko bei Patienten mit ICM verbunden [148].

Ansonsten unterschieden sich beide Patienten lediglich in Bezug auf die verwendeten Medikamente. LVAD-Patienten nahmen deutlich häufiger Thrombozytenaggregationshemmer, PD5-Hemmer oder Betablocker ein, und es zeigte sich ein Trend zur häufigeren Einnahme von oralen Antikoagulanzen. Da Marcumar und ASS zur empfohlenen Begleitmedikation des LVADs gehören [149] ist diese Verteilung nicht überraschend. In der NoVAD-Gruppe wurden signifikant häufiger Katecholamine notwendig. Insgesamt zeigten sich in der vorliegenden Arbeit Veränderungen einzelner Marker wie ALP-Expressionserhöhung bei katecholaminpflichtigen Patienten, ohne dass hierfür ein spezifischer Mechanismus in der Literatur beschrieben wird. Hinsichtlich der viszeralen und renalen Gefäße sind tierexperimentell positive Einflüsse auf die vaskuläre Katecholaminwirkung durch ALP dargestellt worden [150, 151]. Eine MMP9-Expressionserhöhung bei Patienten mit PD5-Hemmereinnahme ist bisher nicht vorbeschrieben. In tierexperimentellen Arbeiten ist hier

in anderen Geweben bisher eine Reduktion beschrieben [152, 153] und weiterhin eine Reduktion entzündlicher Signaltransduktionswege [154].

Während keine etablierte Therapie für eine kalzifizierende Aortenklappenerkrankung beschrieben wird [38, 39], zeigen einige Studien einen Zusammenhang von ACE-Hemmer und Statinen/Abkürz mit niedrigeren im CT detektierbaren Kalklasten [64, 65]. In der vorliegenden Arbeit bestand jedoch kein Zusammenhang zwischen der *ex vivo* Kalklast im CT und der Einnahme von Statinen oder ACE-Hemmern. Die Verwendung von ACE-Hemmern ging aber mit einer signifikant niedrigeren Expression des Kalzifizierungsmarkers OPN einher. Dieser Einfluss von ACE-Hemmern ist sowohl für Herzmuskulatur als auch für im Plasma zirkulierendes OPN beschrieben [155, 156]. Statine und Calciumantagonisten reduzieren im Tiermodell inflammatorische Zytokine [157] ohne dass sich dieser Befund im untersuchten Kollektiv bestätigte. Insgesamt fand sich in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis auf einen deutlichen positiven Einfluss der untersuchten Medikamente hinsichtlich der untersuchten Parameter.

## 4.8 Einordnung der Ergebnisse

Hinsichtlich der ursprünglichen Hypothese einer Induktion oder Verstärkung der Degeneration der Aortenklappen durch die Verwendung eines mechanischen Unterstützungssystems gibt sich ein gemischtes Bild. So ließen sich einerseits weder deutliche Unterschiede in der Morphologie der Aortenklappentaschen von LVAD-Patienten noch Unterschiede in deren Kalklast im Vergleich zur Kontrollgruppe aus Herztransplantationspatienten ohne LVAD zeigen. Andererseits zeigte sich eine signifikant höhere Expression der drei Entzündungsmarker TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IFN $\gamma$ , sowie Hinweise auf Umbau und Kalzifizierung der Matrix durch den Nachweis von aktivierten VIC, der MMP9 und des Osteogenesemarkers OPN bei den LVAD-Patienten.

Insgesamt zeigte das Patientenkollektiv eine Vielzahl von Komorbiditäten und kardiovaskulären Risikofaktoren. Diese Einflussfaktoren waren jedoch unabhängig vom Vorhandensein eines LVAD und traten unabhängig in LVAD-Gruppe und Kontrollgruppe auf. Da die Morphologie der Aortenklappen sehr heterogen war und zum Beispiel fast alle Patienten zumindest Mikrokalzifizierung aufwiesen, könnte es sein, dass die Vielzahl an Risikofaktoren für die gruppenübergreifend gefundenen Indizien für entzündliche und degenerative Prozesse in der Aortenklappe verantwortlich ist. Die Effektstärke der einzelnen, in der Literatur mehrfach beschriebenen Risikofaktoren [52-56, 58] ist schwierig abzuschätzen und könnte in Summe stärker als die Effektstärke durch das LVAD. Dies ließe sich auch darin begründet, dass das LVAD nur eine begrenzte Zeit, durchschnittlich 489 Tage, Einfluss auf die Aortenklappe haben konnte, während die anderen Risikofaktoren

über einen längeren Zeitraum wirken konnten. Somit ist es, insbesondere bei recht subjektiven Methoden wie Histologie, durchaus möglich, dass gegebenenfalls vorhandene morphologische Veränderungen der Aortenklappentaschen durch das LVAD nicht erfasst werden, da sie durch die anderen, stärkeren Veränderungen überlagert werden.

Neben diesen Effekten, die schlecht einer einzelnen Ursache zugeordnet werden können, gibt es auch Veränderungen, die eindeutig an den LVAD geknüpft sind. Die signifikanten Unterschiede in der Genexpression und bei der Darstellbarkeit von VIC sprechen jedoch deutlich für eine Aktivierung degenerativer Prozesse durch das LVAD. Da die Einflüsse der Strömungsmechanik und insbesondere die Einflüsse mechanischer Beanspruchung der aortalen Seite der Aortenklappe auf alle Phasen der Aortenklappenkalzifizierung beschrieben sind [45, 83, 84, 95, 118] und es durch ein LVAD zu massiven Veränderungen der Strömungsmechanik, wie einer dauerhaft geschlossenen Aortenklappe, dem Rückfluss durch eine insuffiziente Klappe und erhöhte Druckbelastung kommen kann [11, 12, 23-26] besteht hier ein plausibler Erklärungsansatz für den Entstehungsmechanismus dieser Veränderungen.

Das Fehlen einer positiven Korrelation der Expression der untersuchten Marker mit der LVAD-Dauer deutet darauf hin, dass die beschriebenen Veränderungen entweder bereits nach kurzer Zeit zustande kommen oder dass die Patienten mit besonders langer LVAD-Anwendungsdauer auch besonders wenige Komplikationen mit guter kardiovaskulärer Funktion und dies den Effekt der LVAD-Dauer gegebenenfalls überlagert.

Auch lassen sich die meisten Einfluss- und Störfaktoren ausschließen. Lediglich bei der MMP9 muss ein Konfundierungseffekt durch eine ICM als Indikation der Versorgung mit einem LVAD und der Herztransplantation vermutet werden.

Bisher sind hauptsächlich Aortenklappeninsuffizienzen und Rückstrom durch die Aortenklappe als pathologische Veränderungen der Aortenklappe durch den LVAD-Einsatz beschrieben worden [12, 23-26]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich jedoch als Hinweis darauf interpretieren, dass zusätzlich auch weitere degenerative Veränderungen, welche mit der Initiationsphase der kalzifizierenden Aortenklappenkrankung vergleichbar sind, durch ein LVAD ausgelöst werden können. Insgesamt würde sich damit die Hypothese vor Beginn der Versuche also bestätigen [138].

## 4.9 Konsequenzen aus der Studie für die Klinik

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse aus Patientensicht auf zwei Punkte zusammenfassen:

1. Ein LVAD induziert oder verstärkt degenerative Veränderungen der Klappe
2. Die Klappen von Herztransplantationspatienten zeigen generell degenerative Veränderungen unabhängig vom Vorhandensein eines LVAD

Somit ergeben sich auch unterschiedliche Konsequenzen für die Praxis. Die Klappen von Herztransplantpatienten sollten nicht generell für gesund gehalten werden und sollten somit nicht als Gesundheitsgruppe für Versuche hinzugezogen werden, ohne dass Maßnahmen angewandt werden um die Klappen auf Degeneration zu testen. Auch für Versuchsansätze im Bereich Prothetik, bei welchen die bei Herztransplantationen anfallenden Klappen zum Beispiel dezellularisiert und danach als Bioprothesen verwendet werden sollen, sollte dies mitbedacht werden.

Patienten mit LVAD könnten weiterhin als Risikogruppe hinsichtlich degenerativer Veränderungen der Aortenklappe betrachtet werden. Das heißt, die bestehenden Verlaufskontrollen, bei welchen aktuell untersucht wird, ob die Klappe öffnet und schließt, könnten zusätzlich genutzt werden, um zu untersuchen, ob es zu einer Stenose der Aortenklappe kommt. Eine Stenose der Aortenklappe sollte identifiziert werden, da sie die bestehende Herzinsuffizienz eines LVAD-Patienten verstärken kann. Auch für aktuelle und zukünftige präventive und prophylaktische Maßnahmen hinsichtlich der Aortenklappenkalzifizierung stellen LVAD-Patienten eine mögliche Zielgruppe dar. Dies gilt insbesondere bei *bridge-to-bridge* und *bridge-to-recovery* Ansätzen. Im Falle von *bridge-to-transplant* ist ein zurückhaltendes Vorgehen angemessener, da die Aortenklappe anders als die Aorta im Zuge der Herztransplantation entfernt wird.

## 4.10 Limitationen der Studie

Insgesamt ergeben sich einige Limitationen der vorliegenden Arbeit. Während im Rahmen der LVAD-Implantation im Bereich des Einfluss- und des Ausflusstraktes Probenmaterial aus Myokard und Aorta gewonnen werden kann und somit ein longitudinales Versuchsdesign mit Vergleich zweier Proben desselben Patienten möglich ist, ist ein derartiger Versuchsansatz bei Aortenklappenmaterial nicht möglich. Somit ist der Vergleich zur Kontrollgruppe der Patienten ohne LVAD notwendig. Da aber beide Gruppen potenziell unter dem Einfluss vielfältiger Faktoren beispielsweise durch unterschiedliche kardiovaskuläre Risikofaktoren, Medikamente oder durch unterschiedlich Begleiterkrankungen stehen, besteht hier die Gefahr einer

Konfundierung. Dies wird zwar durch die für eine derartige Studie mit menschlichem Gewebe große Patientenkohorte abgemildert, allerdings lassen sich solche Effekte nicht ausschließen. Da es sich um eine deskriptive Studie handelt, können lediglich Korrelationen festgestellt werden und über kausale Zusammenhänge kann keine Aussage getroffen werden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), *Herzinsuffizienz, Nationale Versorgungsleitlinie Chronische, Langfassung, 3. Auflage*. 2019.
2. Lip, G.Y., C.R. Gibbs, and D.G. Beevers, *ABC of heart failure: aetiology*. BMJ, 2000. **320**(7227): p. 104-7.
3. Hartupee, J. and D.L. Mann, *Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction*. Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(1): p. 30-38.
4. Lund, L.H., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Heart Transplantation Report-2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant*. J Heart Lung Transplant, 2016. **35**(10): p. 1158-1169.
5. Renz-Polster, H. and B. Bätge, *Basislehrbuch innere Medizin kompakt - greifbar - verständlich*. 2013, München: Elsevier, Urban & Fischer.
6. Mehra, M.R., et al., *The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation listing criteria for heart transplantation: A 10-year update*. J Heart Lung Transplant, 2016. **35**(1): p. 1-23.
7. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
8. Beckmann, A., et al., *German Heart Surgery Report 2018: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Thorac Cardiovasc Surg, 2019. **67**(5): p. 331-344.
9. Foundation, E.I., *Yearly Statistics Overview Eurotransplant, 2017*. 2017.
10. Slaughter, M.S., et al., *Clinical management of continuous-flow left ventricular assist devices in advanced heart failure*. J Heart Lung Transplant, 2010. **29**(4 Suppl): p. S1-39.
11. John, R., et al., *Aortic valve pathophysiology during left ventricular assist device support*. The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation, 2010. **29**(12): p. 1321-1329.
12. Hanff, T.C. and E.Y. Birati, *Left Ventricular Assist Device as Destination Therapy: a State of the Science and Art of Long-Term Mechanical Circulatory Support*. Curr Heart Fail Rep, 2019. **16**(5): p. 168-179.

13. Dandel, M., C. Knosalla, and R. Hetzer, *Contribution of ventricular assist devices to the recovery of failing hearts: a review and the Berlin Heart Center Experience*. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(3): p. 248-63.
14. Bedi, M.S., et al., *Myocardial Fas and cytokine expression in end-stage heart failure: impact of LVAD support*. Clin Transl Sci, 2008. **1**(3): p. 245-8.
15. Birks, E.J., et al., *Increased toll-like receptor 4 in the myocardium of patients requiring left ventricular assist devices*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(2): p. 228-35.
16. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie, 4. vollst. überarb. Aufl.* 2012, Stuttgart, New York: Thieme Google Scholar.
17. Segura, A.M., et al., *Morphologic changes in the aortic wall media after support with a continuous-flow left ventricular assist device*. The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation, 2013. **32**(11): p. 1096–1100.
18. Lee, M., et al., *Vascular inflammation and abnormal aortic histomorphometry in patients after pulsatile- and continuous-flow left ventricular assist device placement*. J Heart Lung Transplant, 2016. **35**(9): p. 1085-91.
19. Ahmad, T., et al., *Effects of left ventricular assist device support on biomarkers of cardiovascular stress, fibrosis, fluid homeostasis, inflammation, and renal injury*. JACC Heart Fail, 2015. **3**(1): p. 30-39.
20. Elmously, A., et al., *Systemic blood pressure trends and antihypertensive utilization following continuous-flow left ventricular assist device implantation: an analysis of the interagency registry for mechanically assisted circulatory support*. J Thorac Dis, 2018. **10**(5): p. 2866-2875.
21. Connelly, J.H., et al., *Acquired commissural fusion of aortic valves in patients with left ventricular assist devices*. J Heart Lung Transplant, 2003. **22**(12): p. 1291-5.
22. Mudd, J.O., et al., *Fusion of aortic valve commissures in patients supported by a continuous axial flow left ventricular assist device*. J Heart Lung Transplant, 2008. **27**(12): p. 1269-74.
23. Rao, S.D., et al., *Treatment With Impella Increases the Risk of De Novo Aortic Insufficiency Post Left Ventricular Assist Device Implant*. J Card Fail, 2020. **26**(10): p. 870-875.
24. Patil, N.P., et al., *De novo aortic regurgitation after continuous-flow left ventricular assist device implantation*. Ann Thorac Surg, 2014. **98**(3): p. 850-7.
25. Hata, H., et al., *Pathological analysis of the aortic valve after long-term left ventricular assist device support*. Eur J Cardiothorac Surg, 2014. **46**(2): p. 193-7.
26. Truby, L.K., et al., *Aortic Insufficiency During Contemporary Left Ventricular Assist Device Support: Analysis of the INTERMACS Registry*. JACC Heart Fail, 2018. **6**(11): p. 951-960.
27. Aggarwal, A., et al., *The development of aortic insufficiency in continuous-flow left ventricular assist device-supported patients*. Ann Thorac Surg, 2013. **95**(2): p. 493-8.
28. da Rocha, E.S.J.G., et al., *Influence of aortic valve opening in patients with aortic insufficiency after left ventricular assist device implantation*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **49**(3): p. 784-7.
29. Noly, P.E., et al., *Continuous-Flow Left Ventricular Assist Devices and Valvular Heart Disease: A Comprehensive Review*. Can J Cardiol, 2020. **36**(2): p. 244-260.
30. Saito, T., et al., *Aortic Valve Pathology in Patients Supported by Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device*. Circ J, 2016. **80**(6): p. 1371-7.

31. van Rijswijk, J.W., et al., *Pathology of aortic valve remodeling after continuous-flow left ventricular assist device support*. J Heart Lung Transplant, 2017. **36**(1): p. 113-116.
32. Stephens, E.H., et al., *Left-Ventricular Assist Device Impact on Aortic Valve Mechanics, Proteomics and Ultrastructure*. The Annals of thoracic surgery, 2017: p. 9.
33. Eveborn, G.W., et al., *The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromso study*. Heart, 2013. **99**(6): p. 396-400.
34. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(3): p. 630-4.
35. Go, A.S., et al., *Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2013. **127**(1): p. 143-52.
36. Makkar, R.R., et al., *Transcatheter aortic-valve replacement for inoperable severe aortic stenosis*. N Engl J Med, 2012. **366**(18): p. 1696-704.
37. Kodali, S.K., et al., *Two-year outcomes after transcatheter or surgical aortic-valve replacement*. N Engl J Med, 2012. **366**(18): p. 1686-95.
38. Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of C., et al., *Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012)*. Eur Heart J, 2012. **33**(19): p. 2451-96.
39. Nishimura, R.A., et al., *2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(22): p. e57-185.
40. Sacks, M.S., W. David Merryman, and D.E. Schmidt, *On the biomechanics of heart valve function*. J Biomech, 2009. **42**(12): p. 1804-24.
41. David Merryman, W., *Mechano-potential etiologies of aortic valve disease*. J Biomech, 2010. **43**(1): p. 87-92.
42. Stephens, E.H., C.K. Chu, and K.J. Grande-Allen, *Valve proteoglycan content and glycosaminoglycan fine structure are unique to microstructure, mechanical load and age: Relevance to an age-specific tissue-engineered heart valve*. Acta Biomater, 2008. **4**(5): p. 1148-60.
43. Schoen, F.J., *Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination*. J Heart Valve Dis, 1997. **6**(1): p. 1-6.
44. Liu, A.C., V.R. Joag, and A.I. Gotlieb, *The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology*. Am J Pathol, 2007. **171**(5): p. 1407-18.
45. Merryman, W.D. and F.J. Schoen, *Mechanisms of calcification in aortic valve disease: role of mechanokinetics and mechanodynamics*. Curr Cardiol Rep, 2013. **15**(5): p. 355.
46. Otto, C.M., et al., *Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies*. Circulation, 1994. **90**(2): p. 844-53.
47. Small, A., et al., *Biomarkers of Calcific Aortic Valve Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(4): p. 623-632.
48. Cote, N., et al., *Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease*. Inflammation, 2013. **36**(3): p. 573-81.
49. Mazzone, A., et al., *Neoangiogenesis, T-lymphocyte infiltration, and heat shock protein-60 are biological hallmarks of an immunomediated inflammatory process in end-stage calcified aortic valve stenosis*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(9): p. 1670-6.

50. Helske, S., et al., *Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process*. *Curr Opin Lipidol*, 2007. **18**(5): p. 483-91.
51. Yutzey, K.E., et al., *Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(11): p. 2387-93.
52. Otto, C.M. and B. Prendergast, *Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(8): p. 744-56.
53. Cho, K.I., et al., *Inflammatory and metabolic mechanisms underlying the calcific aortic valve disease*. *Atherosclerosis*, 2018. **277**: p. 60-65.
54. Katz, R., et al., *Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. *Circulation*, 2006. **113**(17): p. 2113-9.
55. Owens, D.S., et al., *Incidence and progression of aortic valve calcium in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)*. *Am J Cardiol*, 2010. **105**(5): p. 701-8.
56. Barth, M., et al., *Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve*. *Diab Vasc Dis Res*, 2019. **16**(3): p. 254-269.
57. Thanassoulis, G., et al., *Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(6): p. 503-12.
58. Eveborn, G.W., et al., *Assessment of risk factors for developing incident aortic stenosis: the Tromso Study*. *Eur J Epidemiol*, 2014. **29**(8): p. 567-75.
59. Novaro, G.M., et al., *Clinical factors, but not C-reactive protein, predict progression of calcific aortic-valve disease: the Cardiovascular Health Study*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **50**(20): p. 1992-8.
60. Farhat, G.N., et al., *Volumetric BMD and vascular calcification in middle-aged women: the Study of Women's Health Across the Nation*. *J Bone Miner Res*, 2006. **21**(12): p. 1839-46.
61. Hak, A.E., et al., *Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(8): p. 1926-31.
62. Teo, K.K., et al., *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*, 2011. **27**(6): p. 800-8.
63. Rossebo, A.B., et al., *Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(13): p. 1343-56.
64. Shavelle, D.M., et al., *HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium*. *Lancet*, 2002. **359**(9312): p. 1125-6.
65. O'Brien, K.D., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors and change in aortic valve calcium*. *Arch Intern Med*, 2005. **165**(8): p. 858-62.
66. Guauque-Olarte, S., et al., *RNA expression profile of calcified bicuspid, tricuspid, and normal human aortic valves by RNA sequencing*. *Physiol Genomics*, 2016. **48**(10): p. 749-761.
67. Kaden, J.J., et al., *Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis*. *Cardiovasc Pathol*, 2005. **14**(2): p. 80-7.

68. Wallby, L., T. Steffensen, and M. Broqvist, *Role of inflammation in nonrheumatic, regurgitant heart valve disease. A comparative, descriptive study regarding apolipoproteins and inflammatory cells in nonrheumatic heart valve disease.* Cardiovasc Pathol, 2007. **16**(3): p. 171-8.
69. Li, G., et al., *The shift of macrophages toward M1 phenotype promotes aortic valvular calcification.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2017. **153**(6): p. 1318-1327 e1.
70. Raddatz, M.A., M.S. Madhur, and W.D. Merryman, *Adaptive immune cells in calcific aortic valve disease.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019. **317**(1): p. H141-H155.
71. Olsson, M., et al., *Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves.* J Am Coll Cardiol, 1994. **23**(5): p. 1162-70.
72. Mosch, J., et al., *Histopathological assessment of calcification and inflammation of calcific aortic valves from patients with and without diabetes mellitus.* Histol Histopathol, 2017. **32**(3): p. 293-306.
73. Steiner, I., et al., *Calcific aortic valve stenosis: Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate.* Pathol Res Pract, 2012. **208**(4): p. 231-4.
74. Winchester, R., et al., *Circulating activated and effector memory T cells are associated with calcification and clonal expansions in bicuspid and tricuspid valves of calcific aortic stenosis.* J Immunol, 2011. **187**(2): p. 1006-14.
75. Wu, H.D., et al., *The lymphocytic infiltration in calcific aortic stenosis predominantly consists of clonally expanded T cells.* J Immunol, 2007. **178**(8): p. 5329-39.
76. Shimoni, S., et al., *Circulating regulatory T cells in patients with aortic valve stenosis: Association with disease progression and aortic valve intervention.* Int J Cardiol, 2016. **218**: p. 181-187.
77. Nagy, E., et al., *Interferon-gamma Released by Activated CD8(+) T Lymphocytes Impairs the Calcium Resorption Potential of Osteoclasts in Calcified Human Aortic Valves.* Am J Pathol, 2017. **187**(6): p. 1413-1425.
78. Parra-Izquierdo, I., et al., *Lipopolysaccharide and interferon-gamma team up to activate HIF-1alpha via STAT1 in normoxia and exhibit sex differences in human aortic valve interstitial cells.* Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(9): p. 2168-2179.
79. Li, X., et al., *Protective Role of Smad6 in Inflammation-Induced Valvular Cell Calcification.* J Cell Biochem, 2015. **116**(10): p. 2354-64.
80. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.* Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
81. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati, *Macrophage polarization comes of age.* Immunity, 2005. **23**(4): p. 344-6.
82. Mathieu, P., R. Bouchareb, and M.C. Boulanger, *Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease.* J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 851945.
83. Sucosky, P., et al., *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, 2009. **29**(2): p. 254-60.
84. Mazur, P., et al., *Lymphocyte and monocyte subpopulations in severe aortic stenosis at the time of surgical intervention.* Cardiovasc Pathol, 2018. **35**: p. 1-7.
85. Tintut, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway.* Circulation, 2000. **102**(21): p. 2636-42.

86. Galeone, A., et al., *The role of TNF-alpha and TNF superfamily members in the pathogenesis of calcific aortic valvular disease*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 875363.
87. Towler, D.A., *Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease*. Circ Res, 2013. **113**(2): p. 198-208.
88. Isoda, K., et al., *Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 708-15.
89. Latif, N., et al., *Characterization of molecules mediating cell-cell communication in human cardiac valve interstitial cells*. Cell Biochem Biophys, 2006. **45**(3): p. 255-64.
90. Weston, M.W. and A.P. Yoganathan, *Biosynthetic activity in heart valve leaflets in response to in vitro flow environments*. Ann Biomed Eng, 2001. **29**(9): p. 752-63.
91. Walker, G.A., et al., *Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease*. Circ Res, 2004. **95**(3): p. 253-60.
92. Cushing, M.C., J.T. Liao, and K.S. Anseth, *Activation of valvular interstitial cells is mediated by transforming growth factor-beta1 interactions with matrix molecules*. Matrix Biol, 2005. **24**(6): p. 428-37.
93. Mebazaa, A., et al., *Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 2): p. H1841-6.
94. Siney, L. and M.J. Lewis, *Nitric oxide release from porcine mitral valves*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(9): p. 1657-61.
95. Sun, L., N.M. Rajamannan, and P. Sucosky, *Defining the role of fluid shear stress in the expression of early signaling markers for calcific aortic valve disease*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84433.
96. Desmouliere, A., et al., *Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 19-30.
97. Li, C., S. Xu, and A.I. Gotlieb, *The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops*. Cardiovasc Pathol, 2013. **22**(1): p. 1-8.
98. Blevins, T.L., et al., *Phenotypic characterization of isolated valvular interstitial cell subpopulations*. J Heart Valve Dis, 2006. **15**(6): p. 815-22.
99. Merryman, W.D., et al., *Correlation between heart valve interstitial cell stiffness and transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H224-31.
100. Jenke, A., et al., *Transforming growth factor-beta1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020. **319**(5): p. H1123-H1141.
101. Durbin, A.D. and A.I. Gotlieb, *Advances towards understanding heart valve response to injury*. Cardiovasc Pathol, 2002. **11**(2): p. 69-77.
102. Singh, S. and M. Torzewski, *Fibroblasts and Their Pathological Functions in the Fibrosis of Aortic Valve Sclerosis and Atherosclerosis*. Biomolecules, 2019. **9**(9).
103. Jian, B., et al., *Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. 457-65; discussion 465-6.

104. Kaden, J.J., et al., *Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis*. *Atherosclerosis*, 2003. **170**(2): p. 205-11.
105. Lai, C.F., et al., *An osteopontin-NADPH oxidase signaling cascade promotes pro-matrix metalloproteinase 9 activation in aortic mesenchymal cells*. *Circ Res*, 2006. **98**(12): p. 1479-89.
106. Perrotta, I., et al., *Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Calcified Human Aortic Valves: A Histopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2016. **24**(2): p. 128-37.
107. Dreger, S.A., et al., *Profile and localization of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in human heart valves*. *J Heart Valve Dis*, 2002. **11**(6): p. 875-80; discussion 880.
108. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. *Circ Res*, 2003. **92**(8): p. 827-39.
109. Perrotta, I., et al., *New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review*. *Histopathology*, 2011. **59**(3): p. 504-13.
110. Hinton, R.B., Jr., et al., *Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves*. *Circ Res*, 2006. **98**(11): p. 1431-8.
111. Eriksen, H.A., et al., *Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis*. *Atherosclerosis*, 2006. **189**(1): p. 91-8.
112. Rajamannan, N.M., et al., *Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update*. *Circulation*, 2011. **124**(16): p. 1783-91.
113. Cosmi, J.E., et al., *The risk of the development of aortic stenosis in patients with "benign" aortic valve thickening*. *Arch Intern Med*, 2002. **162**(20): p. 2345-7.
114. Rajamannan, N.M., et al., *Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype*. *Circulation*, 2003. **107**(17): p. 2181-4.
115. Vattikuti, R. and D.A. Towler, *Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **286**(5): p. E686-96.
116. Mohler, E.R., 3rd, et al., *Bone formation and inflammation in cardiac valves*. *Circulation*, 2001. **103**(11): p. 1522-8.
117. Osman, L., et al., *Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin*. *Circulation*, 2006. **114**(1 Suppl): p. I547-52.
118. Poggio, P., et al., *Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis*. *Cardiovasc Res*, 2013. **98**(3): p. 402-10.
119. Yu, Z., et al., *Tumor necrosis factor-alpha accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis via the BMP2-Dlx5 pathway*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **337**(1): p. 16-23.
120. Mathieu, P., et al., *Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity*. *J Heart Valve Dis*, 2005. **14**(3): p. 353-7.
121. Price, P.A., D. Toroian, and W.S. Chan, *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is required for the calcification of collagen in serum: a possible mechanism for biomineralization*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(7): p. 4594-604.

122. Aubin, J.E., et al., *Osteoblast and chondroblast differentiation*. Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 77S-83S.
123. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
124. Rogers, M.A., M. Aikawa, and E. Aikawa, *Macrophage Heterogeneity Complicates Reversal of Calcification in Cardiovascular Tissues*. Circ Res, 2017. **121**(1): p. 5-7.
125. Colin, S., G. Chinetti-Gbaguidi, and B. Staels, *Macrophage phenotypes in atherosclerosis*. Immunol Rev, 2014. **262**(1): p. 153-66.
126. O'Brien, K.D., et al., *Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions*. Circulation, 1995. **92**(8): p. 2163-8.
127. Puchtler, H. and S.N. Meloan, *Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction*. Histochemistry, 1978. **56**(3-4): p. 177-85.
128. Jilaihawi, H., et al., *A revised methodology for aortic-valvar complex calcium quantification for transcatheter aortic valve implantation*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2014. **15**(12): p. 1324-32.
129. Huygens, S.A., et al., *Contemporary outcomes after surgical aortic valve replacement with bioprostheses and allografts: a systematic review and meta-analysis*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(4): p. 605-616.
130. Vahanian, A., et al., *Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)*. Eur J Cardiothorac Surg, 2012. **42**(4): p. S1-44.
131. Isaacs, A.J., et al., *National trends in utilization and in-hospital outcomes of mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacements*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2015. **149**(5): p. 1262-9 e3.
132. Chambers, J., *Prosthetic heart valves*. Int J Clin Pract, 2014. **68**(10): p. 1227-30.
133. Tudorache, I., et al., *Decellularized aortic homografts for aortic valve and aorta ascendens replacement*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(1): p. 89-97.
134. Takkenberg, J.J., et al., *Allografts for aortic valve or root replacement: insights from an 18-year single-center prospective follow-up study*. Eur J Cardiothorac Surg, 2007. **31**(5): p. 851-9.
135. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
136. Preibisch, S., S. Saalfeld, and P. Tomancak, *Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions*. Bioinformatics, 2009. **25**(11): p. 1463-5.
137. Schmermund, A., *The Agatston calcium score: a milestone in the history of cardiac CT*. J Cardiovasc Comput Tomogr, 2014. **8**(6): p. 414-7.
138. Barth, M., et al., *Degenerative changes of the aortic valve during left ventricular assist device support*. ESC Heart Fail, 2022. **9**(1): p. 270-282.
139. Renz, P.D.m.H., *Praktische Labordiagnostik*  
*Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, Klinischen Chemie und Hämatologie*. 2009, Berlin: Walterde Gruyter GmbH & Co. KG.
140. Narayanan, A., et al., *CT bone density analysis of low-impact proximal femur fractures using Hounsfield units*. Clin Imaging, 2019. **57**: p. 15-20.

141. Abunassar, J.G., et al., *Usefulness of the Agatston score = 0 to exclude ischemic cardiomyopathy in patients with heart failure*. Am J Cardiol, 2011. **107**(3): p. 428-32.
142. Niazy, N., et al., *Altered mRNA Expression of Interleukin-1 Receptors in Myocardial Tissue of Patients with Left Ventricular Assist Device Support*. J Clin Med, 2021. **10**(21).
143. Tsai, C.S., et al., *Eotaxin-2 increased toll-like receptor 4 expression in endothelial cells in vitro and exacerbates high-cholesterol diet-induced atherogenesis in vivo*. Am J Transl Res, 2016. **8**(12): p. 5338-5353.
144. Stephens, E.H., et al., *Left-Ventricular Assist Device Impact on Aortic Valve Mechanics, Proteomics and Ultrastructure*. Ann Thorac Surg, 2018. **105**(2): p. 572-580.
145. Pham, B.N. and S.V. Chaparro, *Left ventricular assist device recovery: does duration of mechanical support matter?* Heart Fail Rev, 2019. **24**(2): p. 237-244.
146. Wever-Pinzon, O., et al., *Cardiac Recovery During Long-Term Left Ventricular Assist Device Support*. J Am Coll Cardiol, 2016. **68**(14): p. 1540-53.
147. Lok, S.I., et al., *Myocardial fibrosis and pro-fibrotic markers in end-stage heart failure patients during continuous-flow left ventricular assist device support*. Eur J Cardiothorac Surg, 2015. **48**(3): p. 407-15.
148. Bajraktari, G., et al., *Plasma metalloproteinase-9 and restrictive filling pattern as major predictors of outcome in patients with ischemic cardiomyopathy*. Eur J Intern Med, 2012. **23**(7): p. 616-20.
149. Willemsen, D., et al., *[Rehabilitation standards for follow-up treatment and rehabilitation of patients with ventricular assist device (VAD)]*. Clin Res Cardiol Suppl, 2016. **11 Suppl 1**: p. 2-49.
150. Jackson, E.K., et al., *Alkaline Phosphatase Activity Is a Key Determinant of Vascular Responsiveness to Norepinephrine*. Hypertension, 2020. **76**(4): p. 1308-1318.
151. Jackson, E.K., Y. Zhang, and D. Cheng, *Alkaline Phosphatase Inhibitors Attenuate Renovascular Responses to Norepinephrine*. Hypertension, 2017. **69**(3): p. 484-493.
152. Abd El Motteleb, D.M., I. Ibrahim, and S.M. Elshazly, *Sildenafil protects against bile duct ligation induced hepatic fibrosis in rats: Potential role for silent information regulator 1 (SIRT1)*. Toxicol Appl Pharmacol, 2017. **335**: p. 64-71.
153. Zhang, R., et al., *N-Acetylcysteine potentiates the haemodynamic-improving effect of sildenafil in a rabbit model of acute pulmonary thromboembolism via the p38 MAPK pathway*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2019. **46**(2): p. 163-172.
154. Zahran, M.H., et al., *Sildenafil activates antioxidant and antiapoptotic genes and inhibits proinflammatory cytokine genes in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury*. Int Urol Nephrol, 2015. **47**(11): p. 1907-15.
155. Kusuyama, T., et al., *Angiotensin blockade inhibits osteopontin expression in non-infarcted myocardium after myocardial infarction*. J Pharmacol Sci, 2005. **98**(3): p. 283-9.
156. Quaglia, M., et al., *Osteopontin circulating levels correlate with renal involvement in systemic lupus erythematosus and are lower in ACE inhibitor-treated patients*. Clin Rheumatol, 2014. **33**(9): p. 1263-71.
157. Lu, J., et al., *Amlodipine and atorvastatin improve ventricular hypertrophy and diastolic function via inhibiting TNF-alpha, IL-1beta and NF-kappaB inflammatory cytokine networks in elderly spontaneously hypertensive rats*. Biomed Pharmacother, 2016. **83**: p. 330-339.

# Danksagung

„*Nanos gigantum humeris insidentes*“ — „Zwerge, die auf den Schultern von Giganten sitzen“

Bernard de Chartres, 1120 nach Christus

Bereits im Hochmittelalter waren sich die Gelehrten bewusst, dass ihre Perspektive und ihre Möglichkeiten nur durch die Vorarbeit vieler Vorgänger möglich wurden. Genauso hatte ich im Kleinen meine „Giganten“ auf deren Schultern mir diese Dissertation möglich war.

Zunächst ist hier Herr Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari zu nennen, der mich als Doktorvater dieser Dissertation mit Rat und Tat unterstützt hat und mich mit seiner Begeisterung für Forschung und dieses Dissertationsprojekt immer zu motivieren wusste.

Ähnlich wichtig war Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth, die als meine Betreuerin immer für meine Fragen zur Verfügung stand und die Tugenden Gründlichkeit und Gewissenhaftigkeit als Grundstein einer guten Forschungsarbeit prägte. Auch gab Mareike mir immer die Chance aus Fehlern zu lernen, weshalb ich viel für meinen wissenschaftlichen Werdegang mitnehme.

Aber auch den anderen Wissenschaftlichen Mitarbeitern, *Postdocs*, Doktoranden und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Experimentelle Chirurgie bin ich in großem Dank verbunden für die kleinen Dinge des Laboralltags, sei es Hilfe bei schwierigen Handgriffen, ein nützlicher Tipp, ein gut geschriebenes Protokoll oder einfach auch nur ein gutes Gespräch beim gemeinsamen Kaffee.

Nicht weniger trug jedoch auch meine Familie bei, durch die ich schon früh für Naturwissenschaften fasziniert wurde und die mir immer alle Möglichkeiten und Freiräume zur Entwicklung bot.