

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

Etablierung eines Kleintiermodells zum Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die
inflammatorische endotheliale Aktivierung im Rahmen der Aortenklappendegeneration

Dissertation

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

vorgelegt von
Laura Alida Jacobi

2023

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: PD Dr. med. Tobias Zeus

Zusammenfassung (deutsch)

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (*degenerative aortic valve disease*, DAVD) ist eine fortschreitende Erkrankung, deren klinische Relevanz aufgrund der alternden Bevölkerungsstruktur steigt. Bisher bestehen nur operative und interventionelle, aber keine medikamentösen Therapieansätze. Zu den zahlreichen bekannten Faktoren, die zur Entstehung der Erkrankung beitragen, gehören unter anderem das metabolische Syndrom, Nierenversagen, das Alter, Nikotinabusus und oxidativer Stress. Zur Untersuchung der Erkrankung im Tiermodell wurden bisher Modelle verwendet, die die Auswirkungen von systemisch appliziertem oxidativem Stress untersuchten. Welche Rolle lokaler oxidativer Stress auf das Aortenklappengewebe hat, ist bisher nur unzureichend bekannt.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Rattenmodells, welches die Folgen einer lokalen Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) an der Aortenklappe näher beleuchtet und mit dem pathophysiologischen Konzept der Aortenklappendegeneration vergleicht.

Die Grundlage des Modells ist die lokale Erzeugung von ROS durch eine photodynamische Reaktion (PDR). Den Ratten wurde der Photosensibilisator Temoporfin injiziert und deren Aortenklappen anschließend in vivo über eine Laserfaser mit einem Rotlichtlaser bestrahlt.

Zunächst wurde die optimale Bestrahlungsdauer ermittelt, welche ein hohes Maß an oxidativem Stress generiert. Verglichen wurden die Ergebnisse mit Daten aus Kontrollgruppen, die entweder keinen Photosensibilisator (Laser-Gruppe) erhielten oder mit Tieren, die keinen Photosensibilisator erhielten und deren Klappen zudem nicht bestrahlt wurden (Sham-Gruppe). Die Analyse der Aortenklappen erfolgte direkt unmittelbar nach der Intervention ($t = 0$ d) und acht Tage nach der Prozedur ($t = 8$ d). Morphologische Veränderungen wurden mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) analysiert. Oxidativer Stress durch ROS wurde indirekt mithilfe einer 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (8-OHdG)-Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Inflammatorisch endotheliale und apoptotische Prozesse wurden immunhistochemisch mithilfe des *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1, Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1) und der *Cleaved Caspase 3* analysiert.

Eine 60-minütige PDR zeigte zum Zeitpunkt $t = 0$ d zum einen ein signifikant höheres Maß an ROS verglichen mit der Sham-Kontrollgruppe, zum anderen aber auch signifikant mehr oxidativen Stress als nach einer 10-minütigen PDR. Die 60-minütige PDR führte zum Zeitpunkt $t = 0$ d verglichen mit der gleichsinnigen Laser-Kontrollgruppe zwar zu einer signifikant erhöhten VCAM-1-Expression, nicht jedoch in höherem Maß als eine Bestrahlungsdauer von 10 Minuten. Acht Tage nach der Intervention verminderte sich sowohl der oxidative Stress als auch die inflammatorische endotheliale Aktivierung an der Aortenklappe. Morphologisch zeigten sich in keiner Gruppe Veränderungen. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine vermehrte Apoptose im Gewebe als Ausdruck von physikalischem Schaden nachgewiesen werden. Auf der Basis dieser Ergebnisse kann in Langzeitversuchen die Entstehung einer manifesten DAVD im dargestellten Modell analysiert werden. Hierdurch kann der Einfluss von oxidativem Stress insbesondere in der Frühphase der Erkrankung genauer untersucht werden. Dies kann auch die Entwicklung medikamentöser Therapieansätze zur Verhinderung einer ausgeprägten DAVD ermöglichen.

Zusammenfassung (englisch)

The degenerative aortic valve disease (DAVD) is a progressive disorder with an increasing clinical relevance in our aging population. So far there are only operative and interventional, but no pharmaceutical therapeutic approaches existing. It is known that many different factors are involved in the process of degeneration. These include but are not limited to the metabolic syndrome, smoking, renal failure, old age and oxidative stress. In current animal models the oxidative stress is applicated systemically and the mere local effect has not been determined yet.

The aim of this work was the development of a new small animal model, which examines the isolated impact of reactive oxygen species (ROS) in the aortic valve and compares it to the current pathophysiological concept of aortic valve degeneration.

The basis of this model is the local generation of ROS through photodynamic reaction (PDR). The photosensitizer Temoporfin was injected in the rats and their aortic valves were irradiated in vivo by a red-light laser.

At first the ideal duration of irradiation was established, in which oxidative stress was generated in a high degree without damaging the aortic valve tissue. The results were compared to control groups, which did not receive any photosensitizer, but radiation (laser-control-group) or neither a photosensitizer nor radiation (sham-control-group). The aortic valves were analysed either directly after intervention (t = 0 d) or eight days post-operative (t = 8 d). Morphologic changes were ascertained by a haematoxylin and eosin stain (HE). Oxidative stress was detected indirectly with an immunofluorescence staining for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Inflammatory endothelial and apoptotic processes were analysed immunohistochemically by vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and cleaved caspase 3.

At the timepoint t = 0 d a 60-minute PDR created a significantly higher degree of oxidative stress compared to the sham-control-group, as well as compared to a 10-minute PDR. At the same timepoint a 60-minute PDR led to a significant higher VCAM-1-expression compared to the laser-control-group, but not in a higher degree than the effect of a 10-minute irradiation. Eight days after the intervention both the oxidative stress and the inflammatory endothelial activation on the aortic valve decreased. No morphological changes were seen in the different treatment groups up until then. An augmented apoptosis in the tissue was not established as a manifestation of physical impairment at any time.

Based on these findings long-term experiments can be conducted to evaluate the development of the DAVD in this model. The impact of oxidative stress can be examined especially in early stages of the disease as a result of this. This may help to provide pharmaceutical therapeutic approaches in early stages of DAVD.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	min	Minute
µg	Mikrogramm	ml	Milliliter
µl	Mikroliter	mTHPC	Meta-tetrahydroxyphenylchlorin
µm	Mikrometer	mW	Milliwatt
µs	Mikrosekunde	NADP	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
·	Ungepaartes Elektron	nm	Nanometer
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff	NO	Stickstoffmonoxid
³ O ₂	Triplett-Sauerstoff	NO ₂ ·	Stickstoffdioxidradikal
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin	Nod	<i>Nodulus valvae semilunaris</i>
Adv	Adventitia	O ₂ ⁻	Superoxid
Ao	Aortal	O ₂ ^{·-}	Superoxidanion
cm ²	Quadratzenimeter	O ₃	Ozon
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	OH·	Hydroxylradikal
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	ONOO	Peroxyinitrit
DAVD	Degenerative Aortenklappenerkrankung (<i>degenerative aortic valve disease</i>)	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	PDR	Photodynamische Reaktion
EZM	Extrazelluläre Matrix	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
h	Stunde	s	Sekunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
HE	Hämatoxylin-Eosin	SOD	Superoxiddismutase
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (<i>intercellular adhesion molecule 1</i>)	t	Explantationszeitpunkt in Tagen
IE	Internationale Einheit	TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
Int	Intima	TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
J	Joule	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
kg	Kilogramm	VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>)
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (<i>low density lipoprotein</i>)	Ve	Ventrikulär
M	Mittelwert	VEC	Valvuläre endotheliale Zelle (<i>valvular endothelial cell</i>)
Med	Media	VIC	Valvuläre interstitielle Zelle (<i>valvular interstitial cell</i>)
mg	Milligramm	W	Watt

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der Aortenklappe und der Aortenwurzel	1
Abb. 2: Operative Laserplatzierung und explantierte Aortenklappe.....	10
Abb. 3: Schnittebene und Definition der Klappenstrukturen	11
Abb. 4: Prozessierung des DAPI-Bildes und Extraktion der Zellkerne	15
Abb. 5: Messung des mittleren Graustufenwertes im Bereich der Zellkerne.....	16
Abb. 6: VCAM-1-Score in Bildern	19
Abb. 7: Evaluierung der Auswertungsmethode der 8-OHdG-Immunfluoreszenzfärbung	22
Abb. 11: Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Bildung von oxidativem Stress.....	24
Abb. 12: Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Bildung von oxidativem Stress.....	25
Abb. 13: Einfluss der Bestrahlungsdauer auf inflammatorische Prozesse	26
Abb. 14: Vergleich der DAB-Anfärbung von VCAM-1 nach einer 60-minütigen Bestrahlung	27
Abb. 15: Apoptose nach 10-minütiger Intervention.....	28
Abb. 16: Apoptose nach 60-minütiger Intervention.....	28
Abb. 17: Oxidativer Stress im Zeitverlauf	30
Abb. 18: Inflammation im Zeitverlauf	32
Abb. 19: Apoptose acht Tage nach einer 60-minütigen Interventionsdauer	33
Abb. 20: Darstellung der Klappenstrukturen in HE-Färbung	34
Abb. 21: Dicke der Taschen.....	35
Abb. 22: Vakuolen in Anulus und Kommissuren in HE-Färbung	36
Abb. 23: Vergleich des generierten oxidativen Stresses in unterschiedlichen Klappenstrukturen	38
Abb. 24: Oxidativer Stress in verschiedenen Klappenstrukturen nach 10-minütiger PDR.....	39
Abb. 25: Oxidativer Stress in verschiedenen Klappenstrukturen acht Tage nach 10-minütiger PDR...40	
Abb. 26: Oxidativer Stress in verschiedenen Klappenstrukturen acht Tage nach 60-minütiger PDR...41	
Abb. 27: Vergleich der endothelialen inflammatorischen Aktivität in verschiedenen	
Klappenstrukturen.....	43
Abb. 28: Interaktionsmechanismen von Laserstrahlung und Gewebe, angelehnt an	
Szaciłowski et al. (44).....	48
Abb. 29: Klappenübersicht der einzelnen Färbungen	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsaufbau	10
Tabelle 2: Unterscheidung der Versuchsgruppen	11
Tabelle 3: Übersicht über die Behandlung der Kontrollobjektträger der 8-OHdG-Färbung	13
Tabelle 4: Definition VCAM-1-Score.....	18
Tabelle 5: Mittlere Graustufenwerte der Positiv- und Negativkontrollen.....	23

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (deutsch).....	I
Zusammenfassung (englisch).....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Aortenklappe.....	1
1.1.1 Aufbau der Aortenklappe	1
1.1.2 Erkrankungen der Aortenklappe.....	2
1.2 Die degenerative Aortenklappenerkrankung	2
1.2.1 Oxidativer Stress im Rahmen der degenerativen Aortenklappenerkrankung.....	3
1.2.2 Inflammatorische endotheliale Aktivierung im Rahmen der degenerativen Aortenklappenerkrankung.....	4
1.2.3 Apoptose im Rahmen der degenerativen Aortenklappenerkrankung	4
1.3 Photodynamische Reaktion.....	5
1.3.1 Eigenschaften des Lasers und Interaktionen mit dem Gewebe	5
1.3.2 Eigenschaften des Photosensibilisators Temoporfin	6
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies	7
1.5 Bisherige Tiermodelle.....	7
1.6 Ziele der Arbeit.....	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Versuchstiere	9
2.2 Operative Prozedur und Versuchsaufbau.....	9
2.3 Aufarbeitung des Klappengewebes.....	11
2.4 Übersichtsfärbung.....	12
2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	12
2.4.2 Auswertung.....	12
2.5 Untersuchung des oxidativen Stresses.....	13
2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung von 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin.....	13
2.5.2 Auswertung.....	14
2.6 Untersuchung von inflammatorischen Prozessen	16
2.6.1 Immunhistochemische Färbung von VCAM-1.....	16
2.6.2 Auswertung.....	17
2.7 Untersuchung der Apoptose.....	20
2.7.1 Immunhistochemische Färbung der <i>Cleaved Caspase 3</i>	20
2.7.2 Auswertung.....	20
2.8 Statistik	20

3	Ergebnisse	22
3.1	Evaluierung der Auswertungsmethode	22
3.2	Einfluss der Bestrahlungsdauer	23
3.2.1	Oxidativer Stress.....	23
3.2.2	Inflammatorische endotheliale Aktivierung	26
3.2.3	Apoptose.....	27
3.3	Effekt im Zeitverlauf	29
3.3.1	Oxidativer Stress.....	29
3.3.2	Inflammatorische endotheliale Aktivierung	31
3.3.3	Apoptose.....	33
3.4	Regionale Unterschiede der Aortenklappen	33
3.4.1	Anatomie und morphologische Unterschiede in der Übersichtsfärbung	33
3.4.2	Oxidativer Stress.....	36
3.4.3	Inflammatorische endotheliale Aktivierung	41
4	Diskussion	44
4.1	Analyse einer nativen Aortenklappe und Einordnung der morphologischen Auffälligkeiten in der Übersichtsfärbung	44
4.2	Oxidative Effekte der photodynamischen Therapie an der Aortenklappe	46
4.2.1	Analyse der Nebenwirkungen der photodynamischen Reaktion im dargestellten Tiermodell	47
4.2.2	Analyse der alleinigen Laserwirkung	47
4.2.3	Analyse des durch PDR generierten oxidativen Stresses	49
4.2.4	Analyse des Einflusses der Bestrahlungsdauer im Rahmen der PDR	50
4.2.5	Evaluierung der Ergebnisse in der kurzfristigen Nachbeobachtung.....	51
4.2.6	Analyse der regionalen Unterschiede	52
4.3	Inflammatorische endotheliale Aktivierung im Zusammenhang mit oxidativem Stress im dargestellten Tiermodell.....	53
4.3.1	Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die inflammatorische endotheliale Aktivierung im dargestellten Tiermodell.....	53
4.3.2	Analyse der VCAM-1-Expression in der kurzfristigen Nachbeobachtung	54
4.3.3	Analyse von regionalen Unterschieden der VCAM-1-Expression	55
4.4	Evaluierung des Tiermodells	56
4.4.1	Wirkung der PDR mit Temoporphin an der Aortenklappe der Ratte.....	56
4.4.2	Abbildung der Pathomechanismen der DAVD durch das beschriebene Tiermodell.....	56
4.4.3	Vergleich mit bisherigen Tiermodellen zur DAVD	57
4.5	Ausblick und Limitationen	57
4.5.1	Ausblick.....	57
4.5.2	Limitationen.....	58
4.6	Schlussfolgerung.....	59
5	Literaturverzeichnis.....	60
6	Anhang	68

1 Einleitung

1.1 Die Aortenklappe

1.1.1 Aufbau der Aortenklappe

Die Aortenklappe ist eine der beiden Taschenklappen des Herzens (1). Sie liegt zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta und verhindert während der Diastole den Rückfluss des Blutes in den Ventrikel (1). Die Aortenklappe gehört makroskopisch zur Aortenwurzel (2). Die Aortenwurzel umfasst neben den drei Taschen, den *Valvulae semilunares*, einen fibrösen Anulus und die Kommissuren, die *Sinus valsalvae*, die *Spatia intervalvulares* und den sinotubulären Übergang (2–5). Die Bezeichnung der einzelnen Taschen erfolgt in Abhängigkeit zur Lage der Koronararterien: *Valvula semilunaris posterior*, *Valvula semilunaris dextra* und *Valvula semilunaris sinistra* (4, 5). Jede der Taschen besitzt einen frei ins Lumen der Aortenklappe ragenden Rand, die *Lunula valvarum semilunarium* (5). Dieser verdickt sich medial zum *Nodus valvae semilunaris*. (2, 5, 6).

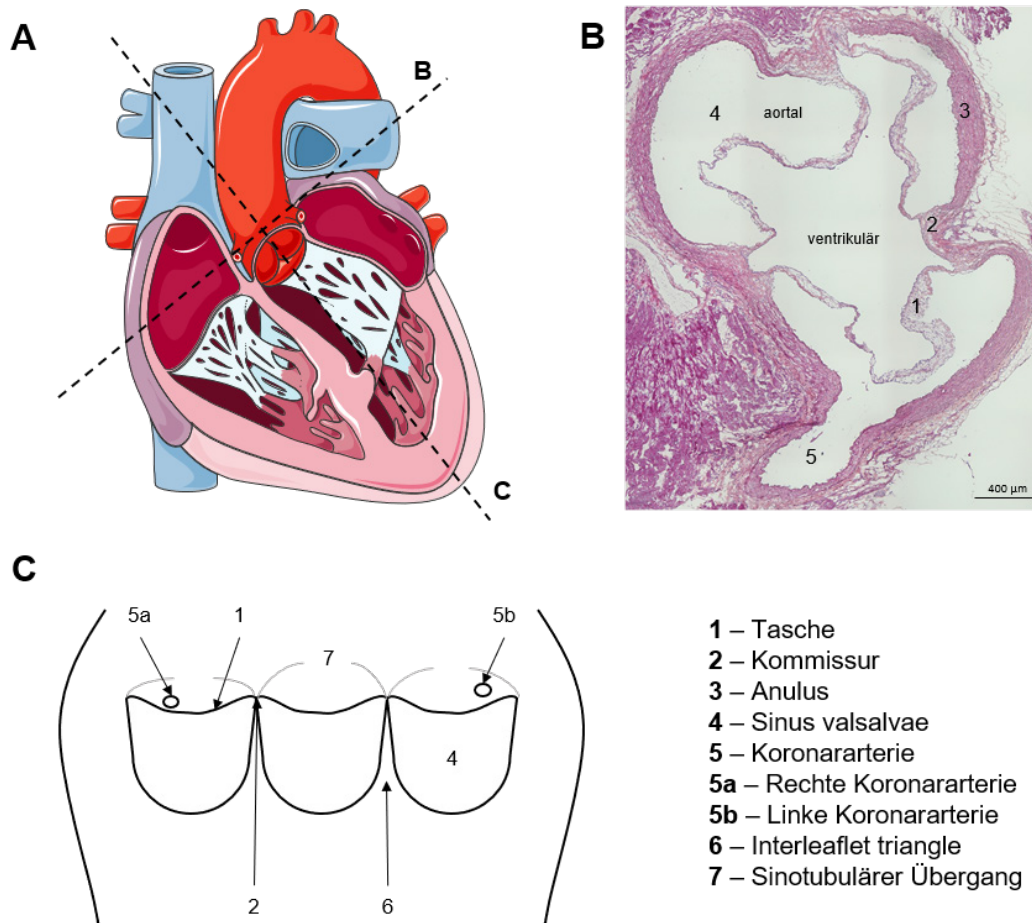


Abb. 1: Aufbau der Aortenklappe und der Aortenwurzel

Die Aortenklappe liegt zwischen linkem Ventrikel und Aorta (A). Die einzelnen Strukturen der Aortenklappe sind mikroskopisch im Querschnitt (B) und schematisch im Längsschnitt durch die Aortenwurzel (C) dargestellt. Die Schnittebenen sind als gestrichelte Linie in A markiert. Der Querschnitt zeigt einen 5 µm dicken Schnitt durch die Aortenklappe in einer HE-Färbung. Zu sehen sind alle drei Taschen (1), die Kommissur (2), der Anulus (3) und die angeschnittenen Koronararterien (5). Markiert sind die aortale und ventrikuläre Seite der Taschen (B). Das *Spatia intervalvularis* und der sinotubuläre Übergang sind nur im Querschnitt der Aortenwurzel zu erkennen (C). (erstellt mit (7))

Mikroskopisch bestehen die Taschen der Aortenklappe aus drei Schichten, welche sowohl auf der ventrikulären, als auch auf der aortalen Seite mit Endothel überzogen sind (2, 8). Das Klappenendothel besteht in Analogie zum Gefäßendothel aus valvulären Endothelzellen (*valvular endothelial cells*, VEC) (8). In den tiefen Schichten der Taschen finden sich valvuläre Interstitialzellen (*valvular interstitial cells*, VIC), welche von extrazellulärer Matrix (EZM) umgeben sind (8). Angepasst an die mechanischen Kräfte, denen die Taschen der Aortenklappe ausgesetzt sind, variiert die Zusammensetzung der EZM von aortal nach ventrikulär (2, 8). Die EZM der aortal gelegenen *Lamina fibrosa* besteht vorwiegend aus Kollagen, während das EZM der ventrikulär gelegenen *Lamina ventricularis* überwiegend Elastin enthält (2, 3, 8). Zwischen der *Lamina fibrosa* und der *Lamina ventricularis* liegt die *Lamina spongiosa*. Diese besteht neben den VICs hauptsächlich aus Glykosaminoglykanen (2, 8).

1.1.2 Erkrankungen der Aortenklappe

Erworbene Herzklappenfehler können sich als Stenose, Insuffizienz oder einer Kombination aus beidem präsentieren (9). Die häufigste Pathologie der Herzklappen ist mit 43 % die Aortenklappenstenose (10). In der Vergangenheit waren rheumatische Erkrankungen die häufigste Ursache für die Entwicklung einer Aortenklappenstenose (10). In der heutigen industrialisierten Gesellschaft drängen jedoch vor allem degenerative Veränderungen als Ursache der Erkrankung in den Vordergrund (10). Während die Prävalenz im Alter von 45 bis 54 Jahren bei 0,1 % liegt, steigt sie ab einem Alter von 75 Jahren auf 2,8 % an (11). Eine manifeste Aortenklappenstenose geht mit einer erhöhten Mortalität einher. Fünf Jahre nach der Diagnose sind nur noch 46 % der Patienten am Leben (12). Diese Zahlen verdeutlichen die gesamtgesellschaftliche Bedeutung der Erkrankung und die Notwendigkeit von neuen Therapieansätzen.

1.2 Die degenerative Aortenklappenerkrankung

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (*degenerative aortic valve disease*, DAVD) beschreibt die pathophysiologischen Mechanismen des klinischen Krankheitsspektrums, welches sich von einer Sklerose der Aortenklappe bis hin zur Stenose bewegt (13). In einem ersten Erkrankungsstadium degeneriert und fibrosiert das Taschengewebe (14). Im weiteren Verlauf verhärten sich die Taschen durch Kalzifizierungsprozesse (14). Je nach Ausmaß kann hieraus eine manifeste und hämodynamisch relevante Stenose resultieren (13, 14).

Die Ursachen der DAVD ähneln denen der Arteriosklerose und sind multifaktoriell (8, 15). Die *Cardiovascular Health Study* zeigte sechs unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung einer DAVD: ein fortgeschrittenes Alter, das männliche Geschlecht, eine Raucheranamnese, arterielle Hypertension und erhöhte Serumwerte von Lipoprotein a und LDL (*low density lipoprotein*, Lipoprotein niedriger Dichte) (15).

Lange wurde davon ausgegangen, dass die Aortenklappen auf veränderte Strömungsbedingungen reagieren und die Entwicklung der DAVD ein rein passiver und mechanischer Prozess ist (16).

Heute ist bekannt, dass die DAVD eine aktive, regulierte und zellbasierte Antwort auf Gewebsschäden und hämodynamische Veränderungen ist (16).

Mechanischer Stress und Gewebsschäden aufgrund von genetischen Prädispositionen und anderen oben genannten Risikofaktoren führen in einem ersten Schritt der Pathogenese der Erkrankung zur Aktivierung von VECs im Klappenendothel (16, 17). Hierbei ist der Scherstress auf der ventrikulären Seite physiologisch höher als auf aortaler Seite (18–20).

Aktivierte VECs exprimieren an ihrer Oberfläche Zelladhäsionsmoleküle wie das *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1) oder das *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1, interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1) (8, 16, 21–23). Diese vermitteln die Adhäsion und Einwanderung von Immunzellen, wie etwa Leukozyten oder Monozyten (16, 17). Aktivierte VECs fördern darüber hinaus die Umwandlung von ruhenden VICs in aktive myofibroblastenähnliche VICs und damit die Fibrosierung des Klappengewebes (16, 21). Aktivierte VICs synthetisieren vermehrt extrazelluläre Matrixmoleküle, migrieren, proliferieren und wandeln sich unter bestimmten Bedingungen in Osteoblasten um (16). Diese Mechanismen führen zum klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung. Histologisch lässt sich eine manifeste DAVD durch vier Hauptkriterien erkennen: eine Verdickung der Taschen, Fibrosierung, inflammatorische Prozesse und Kalziumablagerungen (24, 25).

1.2.1 Oxidativer Stress im Rahmen der degenerativen Aortenklappenerkrankung

Die Auswirkungen von oxidativem Stress auf das Aortenklappengewebe sind erst in den letzten Jahren in den Fokus der Untersuchungen gerückt. Als Basis dienen Kenntnisse aus der Atheroskleroseforschung. Obwohl die Pathophysiologie der Atherosklerose denen der DAVD ähnelt, muss auf einige Besonderheiten in der Wirkung von oxidativem Stress auf die Aortenklappe geachtet werden (26).

Eine Störung der Endothelfunktion ist einer der ersten Mechanismen der DAVD (27). Hierbei führen vor allem eine Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zu oxidativem Stress in VECs (28).

Die entkoppelte eNOS produziert anstelle von Stickstoffmonoxid (NO) vermehrt Superoxide (O_2^-) (29). Diese reagieren wiederum mit NO zu Peroxynitrit (ONOO), einem weiteren Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (30, 31). Darüber hinaus wird O_2^- mithilfe der Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt (31). Eine Unterform der SOD, die SOD1, geht im Rahmen der DAVD auf Seiten der *Lamina fibrosa* verloren, wodurch das Gewebe verstärkt oxidativem Stress ausgesetzt ist (28). Zusätzlich führt TNF- α am Klappenendothel durch ROS, einer verminderten eNOS-Expression und einer erniedrigten NO-Sekretion zu einem Verlust des endotheligen Schutzes, der im physiologischen Zustand Degenerationsprozesse aufhalten würde (28).

In späteren Stadien der Erkrankung tragen ROS zur Fibrosierung und Kalzifizierung des Aortenklappengewebes bei (32). Durch die oben beschriebene Wirkung auf die eNOS kommt es zu einer reduzierten Bioverfügbarkeit von NO (32). Hierdurch proliferieren wiederum VICs im Klappengewebe

und eine bestehende endotheliale Dysfunktion wird verstärkt (31, 32). Oxidativer Stress ist darüber hinaus direkt und indirekt an der Umwandlung von ruhenden in aktivierte VICs beteiligt (32). Modulierend können ROS außerdem die Inflammation beeinflussen und an der Verstärkung prokalzifizierender Signalwege mitwirken (32). Weiterhin zeigten Branchetti et al., dass oxidativer Stress die DNA in humanen Klappen schädigt und die Reparaturmechanismen in VICs erkrankter Klappen nur eingeschränkt funktionieren (33).

Insgesamt spielt oxidativer Stress in der Entwicklung der DAVD eine bedeutende Rolle, obgleich noch nicht alle Mechanismen bis ins Detail ergründet sind.

1.2.2 Inflammatorische endotheliale Aktivierung im Rahmen der degenerativen Aortenklappenerkrankung

Die Degeneration des Aortenklappengewebes ist ein aktiver inflammatorischer Prozess, der bereits in den frühen Stadien der Erkrankung zu beobachten ist (8, 24). Die Kaskade beginnt mit einem geschädigten Endothel. Durch eine Aktivierung der VECs werden Zelladhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin) exprimiert (18, 22, 23). Hierüber gelangen Makrophagen und Lymphozyten vor allem auf Seiten der *Lamina fibrosa* in das Klappengewebe (21). Dies führt zu zwei essentiellen Mechanismen: Zum einen werden proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise TNF- α , freigesetzt, die unter anderem zu einer Fibrosierung führen (34). Zum Anderen akkumulieren Makrophagen durch ROS oxidiertes LDL und wandeln sich so zu Schaumzellen um (35). Diese sterben in den subendothelialen Schichten der Klappe ab, setzen zellulären Debris frei und schütten oxidiertes LDL sowie weitere proinflammatorische Mediatoren aus (21). Oxidiertes LDL fördert wiederum durch eine erneute Immunmodulation die osteogene Differenzierung der aktivierten VICs (13).

1.2.3 Apoptose im Rahmen der degenerativen Aortenklappenerkrankung

Die Apoptose scheint im Rahmen des Kalzifizierungsprozesses der DAVD, ähnlich wie bei der Arteriosklerose, eine Rolle zu spielen (36).

Schon lange ist bekannt, dass der programmierte Zelltod entweder extrinsisch über Zytokine bzw. Immunzellen oder durch die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c über einen intrinsischen Weg eingeleitet werden kann (37). Beide Mechanismen führen zu einer Aktivierung von proteolytischen Enzymen, den Caspasen, die in einer Signalkaskade zur Fragmentierung der Zelle in einzelne Apoptosekörperchen enden (37). Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg führen abschließend zur Spaltung der Procaspase 3 in die aktive Caspase 3 (*Cleaved Caspase 3*) (37).

Bisher konnten zwei Zytokine identifiziert werden, die die Apoptose in erkrankten Klappen über den extrinsischen Weg auslösen können. Jian et al. zeigten, dass der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β , *transforming growth factor β*) in ovinen VICs einen fördernden Effekt auf die Apoptose hat (36). TGF- β begünstigt die Bildung von apoptotischen Knötchen, welche in kalzifizierten Klappen eine gesteigerte alkalische Phosphatase-Aktivität aufweisen (36). Da der Kalzifizierungsprozess in Aortenklappen von der Aktivität der alkalischen Phosphatase abhängig ist, scheint hier eine Verbindung

zwischen der Entwicklung der Erkrankung und apoptotischen Mechanismen zu liegen. (38). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von Caspasen zu einer verminderten Kalzifizierung in ovinen VICs in Kultur führt (36). Galeone et al. konnten ein zweites pro-apoptotisches Zytokin in kalzifizierten Aortenklappen ausmachen: den zu der TNF-Superfamilie gehörenden *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (39). Dieser induziert auf dem extrinsischen Weg die Apoptose (39). TRAIL wird hauptsächlich von T-Zellen und Makrophagen freigegeben, weswegen eine Apoptose direkt durch inflammatorische Infiltrate begünstigt werden könnte (39).

1.3 Photodynamische Reaktion

Bereits im Jahr 1900 zeigte Oscar Raab, dass eine Kombination aus Licht und bestimmten chemischen Substanzen Schaden in Einzellern anrichten kann (40). Heute wird die photodynamische Reaktion (PDR) therapeutisch angewendet, um einige Krebsformen oder degenerative Augenerkrankungen zu behandeln (41).

Für die PDR werden drei Komponenten benötigt: elektromagnetische Wellen in Form von Laserstrahlen, ein Photosensibilisator und Sauerstoff (41). Treffen Laserstrahlen einer bestimmten Wellenlänge auf den Photosensibilisator im nicht angeregten Grundzustand S_0 , so werden Photonen absorbiert und der Photosensibilisator über einen kurzlebigen, angeregten Singulett-Zustand S_1 in einen langlebigen, angeregten Triplett-Zustand T_1 überführt (41, 42). In diesem Triplett-Zustand kann die ursprüngliche Energie des Lasers auf Moleküle in der Umgebung übertragen werden (41, 42). Im Rahmen der Typ I-Reaktion werden entweder Wasserstoff bzw. Elektronen auf größere Moleküle, wie Lipide oder Nukleinsäuren übertragen oder es entstehen freie Radikale. Diese freien Radikale führen in einer sauerstoffreichen Umgebung zur Bildung von ROS (Superoxidanionen $O_2^{\cdot-}$, Hydroxylradikale $OH^{\cdot}$ und H_2O_2) (41, 42). In gleichem Maße kann aber auch eine Typ II-Reaktion ablaufen (42). Hierbei wird Gewebssauerstoff, der natürlicherweise im Triplett-Zustand (3O_2) vorliegt, durch freiwerdende Energie in Singulett-Sauerstoff (1O_2) umgewandelt (41, 42). Diese gehören nicht zu den klassischen Radikalen, sind aber hochreaktiv (41).

Sowohl die Typ I-Reaktionen, als auch die Typ II-Reaktionen führen zu einem Schaden in der Umgebung des Photosensibilisators (42). Dieser ist jedoch lokal sehr begrenzt, da die entstandenen Moleküle (bspw. 1O_2) nach einer Halbwertszeit von weniger als 0,04 μs zerfallen und damit lediglich in einem Umkreis von weniger als 0,02 μm wirken (43). Ob im Rahmen der PDR eher Produkte der Typ I- oder der Typ II-Reaktion anfallen, hängt ab von dem Photosensibilisator selbst, der Anreicherung im Gewebe und dem Vorhandensein von Sauerstoff (41).

1.3.1 Eigenschaften des Lasers und Interaktionen mit dem Gewebe

Treffen Laserstrahlen auf ein Gewebe können sie reflektiert, absorbiert, fortgeleitet oder an der Oberfläche gebrochen werden (44). Die Eindringtiefe ist hierbei abhängig vom vorliegenden Gewebe sowie dessen Bestandteilen und von der Wellenlänge der Laserstrahlen (44). Das im Hämoglobin enthaltene Porphyrin Häm absorbiert beispielsweise Laserstrahlen in Wellenlängen unter 600 nm (44,

45). In der therapeutischen Anwendung der PDR sollten daher Wellenlängen im Bereich des „photodynamischen Fensters“ von 620-850 nm genutzt werden (44).

Die Wirkung im Gewebe ist darüber hinaus abhängig von der Interaktionszeit sowie der Energie- und Leistungsdichte des Lasers (44, 46). Zu unterscheiden sind hierbei vor allem physikalische Effekte, wie die Photodestruktion, die Photoablation, die Vaporisation und die Koagulation von der photochemischen oder auch photodynamischen Reaktion (PDR) (siehe Abb. 25 und (44)). Wird ein Laser mit einer niedrigen Leistungsdichte und einer geeigneten Interaktionszeit verwendet, so kommt es im Gewebe vor allem zu einer photochemischen Reaktion. Gewebeschäden durch eine Ablation, Vaporisation oder Koagulation können vermieden werden (46).

Werden Laserstrahlen von Verbindungen in hohem Maße absorbiert, können diese als Photosensibilisatoren agieren (41, 44, 47). Günstige chemische Eigenschaften haben hier endogen vorliegende Porphyrine, wie Häm oder Cytochrom c (48) oder therapeutisch zugeführte Verbindungen, wie der Photosensibilisator Temoporfin (49).

1.3.2 Eigenschaften des Photosensibilisators Temoporfin

Für die unten beschriebenen Versuche wurde im Rahmen der photodynamischen Reaktion der Photosensibilisator Temoporfin (Meta-tetrahydroxyphenylchlorin, mTHPC) verwendet. Dieser ist seit Oktober 2001 in der Europäischen Union für die kurative oder palliative Behandlung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich zugelassen (41, 50). Temoporfin wird durch Laserstrahlen mit einer Wellenlänge von 652 nm aktiviert (51) und verbleibt länger im Singulett-Zustand S_1 als andere Photosensibilisatoren (49).

Die Pharmakokinetik von Temoporfin wurde aufgrund der klinischen Anwendung vorwiegend im Hinblick auf die Verteilung des Photosensibilisators auf Zellebene, im Plasma, im Tumorgewebe oder in größeren Organsystemen untersucht (52–55).

Die höchste Plasmakonzentration erreicht Temoporfin fünf Minuten nach der Injektion (56). Nach einem initialen Abfall der Temoporfinkonzentration, wurde ein erneuter zweiter Anstieg der Plasmakonzentration beobachtet (56–58). Hopkinson et al. legen nahe, dass das Temoporfin im Plasma zunächst mit einer unbekannten Proteinfraction aggregiert (59). Dieses Aggregat löst sich anschließend temperatur- und zeitabhängig auf und das freiwerdende Temoporfin bindet an Lipoproteine (59). Diese Plasmabindung ist je nach untersuchter Spezies unterschiedlich ausgeprägt, wodurch die Temoporfinplasmakonzentration in Ratten ein bis zwei Stunden nach Applikation erneut ansteigt (56). Inwieweit Temoporfin an der nicht durch Blutgefäße versorgten Aortenklappe wirkt und zu welchem Zeitpunkt die Applikation des Temoporfins für eine ideale Wirkung an der Aortenklappe durchgeführt werden sollte, kann daher auf der Grundlage der oben aufgeführten Erkenntnisse nur abgeschätzt werden.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Zu den ROS gehören radikale und nicht-radikale Verbindungen, die physiologisch in biologischen Systemen vorhanden sind (60).

Radikale besitzen ein ungepaartes Elektron ($\cdot$), welches für die chemische Reaktivität der Radikale verantwortlich ist (60). Wichtige radikale Verbindungen sind $O_2\cdot^-$, $OH\cdot$ und Stickoxide ($NO\cdot$, $NO_2\cdot$) (60). Zu den nicht-radikalen ROS gehören unter anderem H_2O_2 , 1O_2 , $ONOO^-$ und Ozon (O_3). Hierbei handelt es sich um stabilere Oxidantien (60).

Die verschiedenen ROS können in biologischen Systemen enzymatisch oder nichtenzymatisch ineinander umgewandelt werden (31, 60, 61). Bedeutende Enzyme der Redoxhomöostase sind die SOD oder die Nicotinamadenin dinukleotidphosphat-Oxidasen (NADP-Oxidasen) (31, 61).

ROS liegen in biologischen Systemen in niedrigen Konzentrationen vor und dienen physiologischerweise als Signalmoleküle (60–62). Die jeweilige Wirkung der einzelnen ROS ist dabei abhängig von ihren chemischen Eigenschaften. $O_2\cdot^-$ kann Zellmembranen nur schlecht passieren und wirkt daher vorwiegend lokal im produzierten Zellkompartiment, indem es mit Proteinen oder anderen chemischen Substanzen reagiert (31). Im Gegensatz dazu ist H_2O_2 besser membrangängig, weniger reaktiv und hat einen größeren Aktionsradius (31). Liegt in der Zelle ein Überschuss an ROS vor, so ist die Balance zwischen oxidativen und antioxidativen Molekülen im System gestört und der Zellmetabolismus wird aufgrund ihrer chemischen Reaktivität gestört (60, 61).

1.5 Bisherige Tiermodelle

Es sind bereits viele pathophysiologische Mechanismen der DAVD bekannt. Untersucht wurden bisher aber vorwiegend die späten Phasen der Erkrankung, in denen bereits funktionelle Einschränkungen und morphologische Auffälligkeiten an der Aortenklappe bestehen.

Daher ist es umso wichtiger geeignete Modelle für die DAVD zu entwickeln, die dabei helfen die komplexe Pathophysiologie der Erkrankung zu verstehen und therapeutische Ansatzpunkte zu entwickeln. Die bisher angewandten Tiermodelle von Maus, Kaninchen und Schwein untersuchten vorwiegend den Einfluss des Stoffwechsels auf die Krankheitsentstehung. Im Vordergrund stand hier der Fett- und Phosphatstoffwechsel (63–74), aber auch genetische Prädispositionen wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen am Mausmodell analysiert (75–77). Neuere Modelle arbeiten mit einer mechanischen Schädigung der Aortenklappe. Besonders hervorzuheben sind hier die Arbeiten von Honda et al. und Niepmann et al., in deren Modellen sich wichtige Charakteristika der Erkrankung widerspiegeln (25, 78).

Bei allen Kleintiermodellen ist zu beachten, dass sich sowohl die Physiologie als auch die Pathophysiologie der Aortenklappen in einigen Punkten von der humanen unterscheidet. Die Aortenklappe in Mäusen und Ratten ist, anders als beim Menschen, Schweinen oder Kaninchen, nicht dreischichtig aufgebaut (67, 79). Vielmehr bestehen die Taschen der Aortenklappe in Ratten aus dichten Arealen, welche der humanen *Lamina fibrosa* entsprechen und aus aufgelockerten Bereichen, die der *Lamina spongiosa* zugeordnet werden können (79). Darüber hinaus entwickeln Wildtyp-Mäuse ähnlich

wie Ratten unter einer normalen Diät in der Regel keine DAVD oder andere atherosklerotische Veränderungen (67, 80–82). Unter anderem ist dies auf Unterschiede im Lipidstoffwechsel zurückzuführen (67, 82). Daher müssen in diesen Kleintiermodellen zusätzliche prokalzifizierende Bedingungen durch eine Cholesterin- und Phosphat-reiche Ernährung geschaffen werden (80).

Rattenmodelle werden insgesamt seltener verwendet, um die Aortenklappendegeneration zu untersuchen. Gillis et al. untersuchten die Entwicklung der DAVD bei Nierenversagen und unter dyslipämischen Bedingungen in Ratten (83), während Shuvy et al. die Entwicklung der Erkrankung bei Nierenversagen und unter Hyperphosphatämie analysierten (84).

Bisher gibt es kein Tiermodell, welches lediglich den lokalen Einfluss von oxidativem Stress auf die Entwicklung der DAVD beleuchtet. Minol et al. zeigten in einem Atherosklerosemodell, dass es mithilfe einer photodynamischen Reaktion möglich ist ROS lokal an der Aorta von Wistar-Ratten zu erzeugen und so atherosklerotische Mechanismen in Gang zu setzen (85). Eine Übertragung auf andere kardiovaskuläre Erkrankungen im Tiermodell fand bisher noch nicht statt.

1.6 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es ein Tiermodell zur Untersuchung der DAVD zu entwickeln. Dieses soll in der Lage sein auch die frühen Veränderungen in der Pathophysiologie der Erkrankung zu berücksichtigen und möglichst realitätsnah widerzuspiegeln. Grundlegend ist hierbei die Betrachtung des Einflusses von ROS auf die Frühphase der Erkrankung.

Um lokal an der Aortenklappe ROS zu produzieren, wurde männlichen Wistar-Ratten ein Photosensibilisator systemisch injiziert und deren Aortenklappen anschließend mit einem Laser bestrahlt, um so eine photodynamische Reaktion zu induzieren. Mithilfe einer eigens etablierten Immunfluoreszenzfärbung sollte der entstandene oxidative Stress indirekt in Form von DNA-Schäden an den verschiedenen Klappenstrukturen analysiert werden. Die inflammatorische endotheliale Aktivierung als frühe Veränderung an der Aortenklappe wurde direkt im Anschluss und nach einer kurzen Nachbeobachtungszeit untersucht. Hierbei wurden nicht nur die Taschen der Aortenklappe evaluiert, sondern auch die angrenzenden Gewebestrukturen berücksichtigt. Physikalische Nebenwirkungen der Intervention sollten mithilfe eines Apoptosemarkers und einer Übersichtsfärbung dargestellt werden.

Perspektivisch sollen die Ergebnisse dazu beitragen in Langzeituntersuchungen ein funktionierendes Modell der DAVD in der Ratte zu erarbeiten, an welchem die Pathophysiologie der Erkrankung besser verstanden wird und sowohl pharmazeutische als auch interventionelle Therapiemethoden entwickelt und erprobt werden können. Darüber hinaus kann das Modell genutzt werden, um den Einfluss anderer Risikofaktoren im Zusammenspiel mit oxidativem Stress zu beleuchten.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden auf der Grundlage des genehmigten Tierversuchsantrages nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes mit dem Aktenzeichen 84-02.04.2017.A153 durchgeführt. Für die Versuche wurden erwachsene männliche Wistar-Ratten verwendet. Diese wurden über die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Gehalten wurden die Tiere in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität nach der geltenden Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2010 gemäß Anhang III. Die Tiere erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Bei der Fütterung der Ratten kam ein Härtemodell zum Einsatz, welches zur Degeneration und Kalzifizierung des kardiovaskulären Systems der Tiere beiträgt (80). Dieses bestand aus Standard-Pellets, welche mit 2 % Cholesterin und 1,5 % Phosphat angereichert wurden (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, S3544-SO12 SMR/M-H) (80).

2.2 Operative Prozedur und Versuchsaufbau

Die Interventionen und Operationen wurden im Tierversuchsoperationssaal des Labors der experimentellen Chirurgie freundlicherweise durchgeführt von Herrn Yuki Haru Sugimura. Zunächst wurde der Photosensibilisator Temoporfin (biolitec Pharma, Jena, Deutschland, Zulassungsnummern: EU/1/01/197/003 EU/1/01/197/004 EU/1/01/197/005) mit einer Konzentration von 0,3 mg/kg Körpergewicht in die Schwanzvene der Ratten injiziert. Anschließend wurden die Tiere vor Licht geschützt. Präoperativ wurde subkutan 0,05 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Animalcare Limited, York, Vereinigtes Königreich, Art.-Nr.: 401045.00.00) und Carprofen (Norbrook, Newry, Vereinigtes Königreich, vertrieben durch Bayer Vital GmbH, Zulassungsnummer: 401182.00.00) zur Analgesie appliziert. Die Narkose wurde mit Isofluran-Piramal (Piramal Healthcare, Bethlehem, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: 66794-017-25) eingeleitet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit 1-1,5 Vol% Isofluran (Piramal Healthcare, Bethlehem, Vereinigte Staaten). Um eine Thrombenbildung im Bereich der Aortenklappe zu verhindern, wurden die Tiere mit 300 IE/kg Körpergewicht Heparin-Natrium (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, Artikelnummer: 204 7217) heparinisiert. Anschließend erfolgte die einseitige Präparation der *Arteria carotis communis*. Diese wurde mit einer Venenverweilkanüle, welche als Schleuse diente, punktiert. Über den Aortenbogen wurde dann die Laserfaser (Biolitec Pharma, Jena, Deutschland) endovaskulär vor der Aortenklappe platziert (Abb. 2A). Hierbei handelte es sich um einen *Continuous Wave*-Rotlichtlaser (1 mW, 0,1 W/cm²), welcher Laserstrahlen in einer Wellenlänge von 652 nm erzeugt. Vor der Aktivierung des Lasers erfolgte eine sonographische Lagekontrolle.

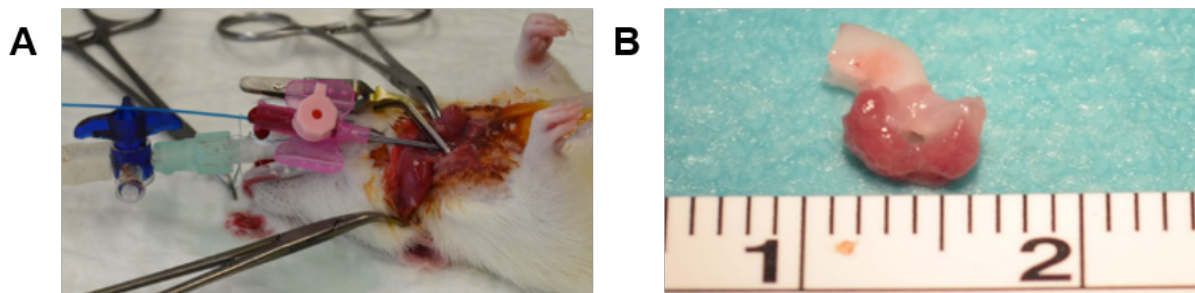


Abb. 2: Operative Laserplatzierung und explantierte Aortenklappe

Dargestellt ist die über eine Venenverweilkanüle eingeführte Laserfaser in blau. Die Arteria carotis communis wurde punktiert und die Laserfaser vor der Aortenklappe platziert. Hier verblieb die Laserfaser über den Zeitraum der Bestrahlung entweder 10 oder 60 Minuten lang (A). Nach null oder acht Tagen wurde die Aortenklappe entnommen und zur weiteren Verarbeitung eingebettet (B).

Anschließend wurde die Aortenklappe entweder 10 oder 60 Minuten mit dem Laser bestrahlt. Das Aortenklappengewebe wurde dann entweder direkt im Anschluss oder acht Tage später entnommen und aufgearbeitet (Tabelle 1). Die so behandelten Tiere wurden der ROS-Gruppe zugeordnet.

Tabelle 1: Versuchsaufbau

Interventionsdauer [min]	10	60	10	60
Beobachtungszeitraum [d]	0	0	8	8
Sham-Gruppe	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7
Laser-Gruppe	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7
ROS-Gruppe	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7

Dargestellt ist der Aufbau der operativen Versuche mit der Interventionsdauer in Minuten, dem Beobachtungszeitraum und der jeweiligen Anzahl der eingeschlossenen Versuchstiere. Je nach Art der Behandlung mit Temoporfin und/oder dem Laser wurden sie einzelnen Untergruppen zugeordnet (Sham, Laser, ROS).

Neben diesen ROS-Gruppen wurden für jeden Versuchsaufbau Kontrollgruppen untersucht (Tabelle 2). Diese erhielten kein Temoporfin, die Laserfaser wurde aber wie oben beschrieben auch hier vor der Aortenklappe platziert. In der Laser-Gruppe wurde der Laser für die Interventionsdauer von 10 bzw. 60 Minuten eingeschaltet und die Aortenklappe bestrahlt. In der Sham-Gruppe verblieb die Laserfaser inaktiviert 10 bzw. 60 Minuten vor der Aortenklappe.

In jede Untersuchungsgruppe wurden sieben Tiere eingeschlossen. (Tabelle 1).

Tabelle 2: Unterscheidung der Versuchsgruppen

	Temoporphinapplikation	Laser aktiviert
Sham-Gruppe	-	-
Laser-Gruppe	-	+
ROS-Gruppe	+	+

Diese Tabelle verdeutlicht die Unterschiede zwischen den ROS- und den Kontrollgruppen. Tieren der ROS-Gruppen wurde Temoporphin injiziert. Die Kontrollgruppen erhielten kein Temoporphin. In den ROS- und Laser-Gruppen wurden die Aortenklappen mit dem Laser bestrahlt. In den Sham-Gruppen verblieb die Laserfaser inaktiviert vor der Aortenklappe.

2.3 Aufarbeitung des Klappengewebes

Nach der Intervention ($t = 0$ d) bzw. nach einem Beobachtungszeitraum von acht Tagen ($t = 8$ d) wurde die Aortenklappe aus dem Herzen der Ratten präpariert (Abb. 2B). Die Klappe wurde anschließend in KP-CryoCompound (Klinipath/VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten, Artikelnummer 1620-C) eingebettet. Diese wurden in 2-Methylbutan (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 3927.2) gegeben, welches mithilfe von flüssigem Stickstoff auf circa -196 °C gekühlt wurde. Gelagert wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C.

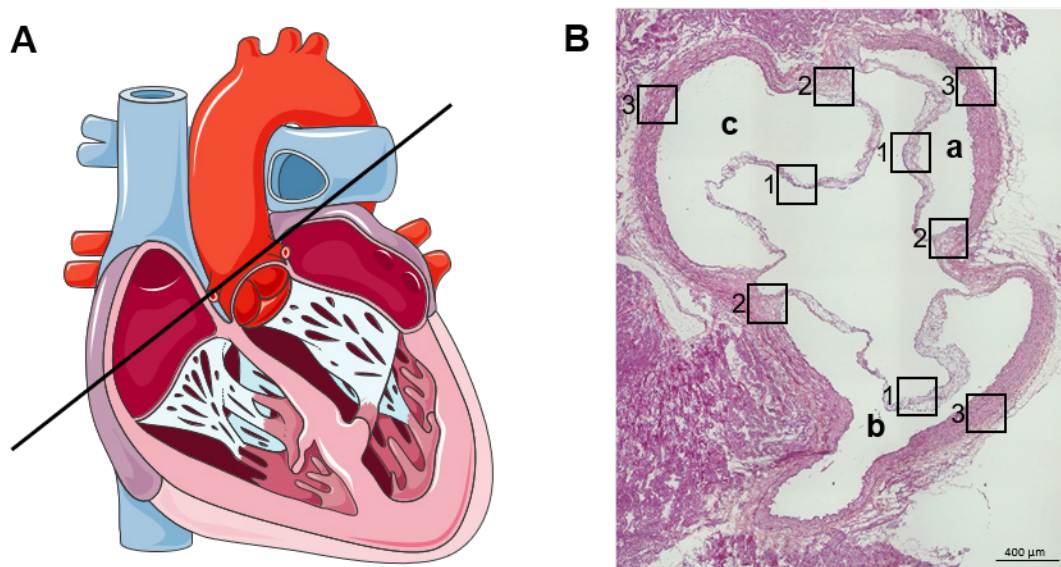


Abb. 3: Schnittebene und Definition der Klappenstrukturen

Es wurden Querschnitte durch die Aortenklappe erstellt (A), auf denen alle drei Taschen (B, a-c) abgebildet waren. Um die Ergebnisse der Färbungen möglichst strukturiert zu beurteilen, wurden anhand einer mit Hämatoxylin und Eosin angefärbten Klappe (B) drei Strukturen innerhalb einer jeden Tasche definiert: Taschengewebe (1), Kommissur (2) und Anulus (3).

Am Gefriermikrotom wurden aus den so gewonnenen Präparaten 5 µm dicke Querschnitte gewonnen. Ziel war hierbei alle drei *Sinus valsalvae* mit den umliegenden Strukturen darzustellen. Es wurden drei Strukturen wie in Abb. 3 gezeigt definiert: Taschengewebe, Kommissur und Anulus. Je nach geplanter

Färbung wurden die Objektträger nach dem Schneiden bei -20 °C bzw. -80 °C bis zu Weiterverarbeitung gelagert.

Das oben beschriebenen Einbetten und das Schneiden der Klappen wurden in Zusammenarbeit mit Rebecca Leona Wunsch durchgeführt.

2.4 Übersichtsfärbung

2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine klassische Übersichtsfärbung. Erstmals beschrieben wurde sie von Wissowzky im Jahr 1877 (86). Das Oxidationsprodukt von Hämatoxylin färbt Zellkerne und Kalk blau an. Eosin färbt das restliche Gewebe, wie das Zytoplasma und Kollagenfasern, rot (87, 88).

Verwendet wurden bei -20 °C gelagerte Gefrierschnitte. Vor Beginn der Färbung wurde eine Eosin-Lösung aus Eosin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: 861006), destilliertem Wasser (Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland), 100 % Ethanol (VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: 85033.360) und 100 %-ige Essigsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 6755.2) hergestellt. Diese wurde ebenso wie das Hämatoxylin (Shandon Gill™ 3 Hematoxylin, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: 6765009) vor Gebrauch filtriert. Nacheinander wurden die Objektträger für eine Minute in Hämatoxylin, destilliertem Wasser, 4-5 %-iger Essigsäure und erneut destilliertem Wasser gegeben. Nach zweiminütiger Spülung unter fließendem Leitungswasser und anschließender Entwässerung in 70 %-igem Ethanol, folgte die Anfärbung mit Eosin für 12 Minuten. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert. Hierbei wurde für jeweils eine Minute 70 %-iges, zweimal 96 %-iges und zweimal 100 %-iges Ethanol verwendet. Zur endgültigen Entfernung von restlichem Wasser wurden die Schnitte danach zweimal für jeweils eine Minute in Xylol (VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: 28975.325) getaucht. Eingedeckt wurden die Objektträger nach ausreichender Trocknung mit dem Roti®-Histokitt II (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: T160.2).

2.4.2 Auswertung

Die gefärbten Objektträger wurden am Durchlichtmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland, Model DM 2000, Seriennummer: 331009-102010) in 50-, 100- und gegebenenfalls 200-facher Vergrößerung einzeln untersucht und strukturelle Auffälligkeiten notiert. Hierbei wurde vorwiegend auf die Dicke der Klappen und morphologische Unterschiede in den einzelnen Taschenabschnitten geachtet.

Es wurde jeweils ein Schnitt pro Versuchstier am Durchlichtmikroskop mithilfe einer Kamera (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland, Typ DFC425 C, Seriennummer: 505374710) und der Leica Software LAS V3.8 in 50- oder 100-facher Vergrößerung fotografiert. Einzelbilder der Klappe wurden mit 20 %-iger Überlappung in Rasterform aufgenommen und anschließend entweder automatisiert

mithilfe der Funktion *Grid/Collection stitching* (89) oder manuell mit der Erweiterung MosaicJ (90) in ImageJ 1.52n (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Vereinigte Staaten) zu einem Übersichtsbild zusammengesetzt.

Die Dicke der Taschen wurden mithilfe von ImageJ gemessen. Hierfür wurden pro Tasche drei Messungen durchgeführt, wobei jeweils die dickste und die dünnste Stelle ausgewählt wurde. Die dritte Messung erfolgte an einer für die gesamte Tasche repräsentativen Stelle. In Excel® (Microsoft®, Seattle, USA) wurden die Messwerte notiert und Mittelwerte für jedes Versuchstier gebildet.

2.5 Untersuchung des oxidativen Stresses

2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung von 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin

8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (8-OHdG) ist ein oxidiertes Derivat des in der DNA und in der RNA vorkommenden Guanosins (91). Es entsteht durch die Anwesenheit von ROS, wie OH[•] und ¹O₂ (91). OH[•] entsteht unter anderem beim Abbau von H₂O₂ (60).

In jedem Färbedurchgang wurden zwei Positivkontrollen mit Schnitten einer gesunden Rattenaortenklappe mitgeführt. Der erste dieser Objektträger wurde sowohl mit dem Primärantikörper (Anti-8-OHdG, monoklonal, anti-Maus, JaICA, Chiyoda, Japan, Artikelnummer: N45.1; 1:20) als auch mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 546 (Ziege anti-Maus, polyklonal, Invitrogen, Carlsbad, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: A-11030; 1:250) behandelt, wobei der erste der beiden Schnitte für 30 Minuten zusätzlich mit 50 µl einer 3 %-igen H₂O₂-Lösung (hergestellt aus 30 % H₂O₂, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 9681.1) behandelt wurde. Auf den zweiten Objektträger wurde als Negativkontrolle nur der Sekundärantikörper gegeben. Auch hier wurde der erste Schnitt für 30 Minuten mit 3 %-H₂O₂ inkubiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die Behandlung der Kontrollobjektträger der 8-OHdG-Färbung

Objektträger		Primärantikörper 1:20	Sekundärantikörper 1:250	H ₂ O ₂ 3 %
Positivkontrolle	1. Schnitt	50 µl	50 µl	50 µl
	2. Schnitt	50 µl	50 µl	-
Negativkontrolle	1. Schnitt	-	50 µl	50 µl
	2. Schnitt	-	50 µl	-

Dargestellt ist das Schema für die Behandlung der Kontrollobjektträger der 8-OHdG-Färbung. Verwendet wurde der Anti-8-OHdG-Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:20 und der Sekundärantikörper Alexa Fluor 546 in einer Verdünnung von 1:250. Als oxidatives Agens wurde 3 %-ige H₂O₂-Lösung hinzugegeben.

Im Anschluss daran wurden die zu untersuchenden Objektträger gemeinsam mit den Kontrollen für 10 Minuten in 4 % Formaldehyd (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: P087.3) fixiert. Danach wurden diese dreimal für jeweils 5 Minuten in *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gewaschen. Unspezifische Epitope wurden 60 Minuten lang mit einem *Goat*-Serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: G9023) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS blockiert.

Anschließend wurde die Zellmembran permeabilisiert. Dazu wurde 0,1 % Triton X verwendet, welches aus Triton X-100 (BioFroxx/NeoFroxx, Einhausen, Deutschland, Artikelnummer: 1139LT001) und PBS hergestellt wurde. Nachdem die Objektträger erneut dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen wurden, wurde der Primärantikörper Anti-8-OHdG auf die Präparate gegeben. Dieser wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml angesetzt und vor Gebrauch auf 1:20 verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger dann zunächst dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Die darauffolgenden Schritte wurden unter Schutz vor direkter Lichteinstrahlung ausgeführt. Der Sekundärantikörper Alexa Fluor 546 wurde auf 1:250 in PBS verdünnt, auf das Präparat gegeben und 30 Minuten lang in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit ausgeschlagen und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 6335.1) für 5 Minuten in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS auf die Schnitte gegeben. Nach einem dreimal 5-minütigen Waschschrift in PBS gefolgt von 1 Minute in destilliertem Wasser wurden die Objektträger kurz in 100 % Ethanol getaucht. Eingedeckt wurden die Objektträger danach mit Leica CV Ultra (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland, Artikelnummer: 070937891) und bis zur Mikroskopie lichtgeschützt getrocknet.

2.5.2 Auswertung

Zur mikroskopischen Beurteilung wurde eine Fluoreszenzlampe (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland, Typ: EL6000) verwendet, deren Intensität für alle Präparate auf die Stufe zwei gestellt wurde. Mithilfe manuell einstellbarer Wellenlängenfilter am Mikroskop wurden Aufnahmen der DAPI-Färbung mit einem Wellenlängenbereich von 340-380 nm und der 8-OHdG-Färbung mit einem Wellenlängenbereich von 515-560 nm angefertigt. Hierbei wurden pro Aortenklappe neun repräsentative Regionen in 400-facher Vergrößerung fotografiert (siehe Abb. 3B). Um eine Quantifizierung der Bilder durchführen zu können, wurden alle Fotos in Graustufen aufgenommen und Einstellungen (Belichtungszeiten, Verstärkung, Gamma-Wert) gleich gehalten.

Zur Prozessierung und Auswertung der Fotos wurde das Programm ImageJ 1.52n mit der Erweiterung BioVoxel (The BioVoxel Image Processing and Analysis Toolbox. Brocher, 2015, EuBIAS-Conference, 2015, Jan5) verwendet. Gemessen werden sollte das 8-OHdG-Signal im Zellkern des Klappengewebes anhand eines 16-bit-Bildes. Hierzu wurde zunächst die DAPI-Aufnahme mithilfe eines eigens angefertigten und auf die Bilder angepassten Makros prozessiert, sodass die Zellkernumrisse extrahiert werden konnten (Abb. 4). Zunächst wurde der Hintergrund mit einem *Rolling Ball*-Radius von 25 Pixeln subtrahiert. Hierdurch wurden einzelne Kernstrukturen klarer voneinander getrennt. Anschließend wurde der *Convolution Filter* „Median“ mit einem Radius von 8 Pixeln angewandt. Dieser führte zu einer Weichzeichnung und es konnten Unebenheiten innerhalb der Kernstrukturen minimiert werden. Durch eine Erhöhung des Gamma-Wertes auf 1,72 wurden unspezifische Anfärbungen aus dem Bild gerechnet. Eine normalisierte Kontrasterhöhung um 1 % der Pixel brachte die Zellkernstrukturen nun wieder in den Vordergrund. Bevor ein automatischer *Threshold* nach der „*Li white*“-Methode

gesetzt werden konnte, musste das Bild in ein 8-bit-Format umgewandelt werden. So entstand ein binäres Bild mit weißen und schwarzen Anteilen. Die weißen Kernanteile konnten selektiert und im *Region-of-Interest-Manager* abgelegt werden.

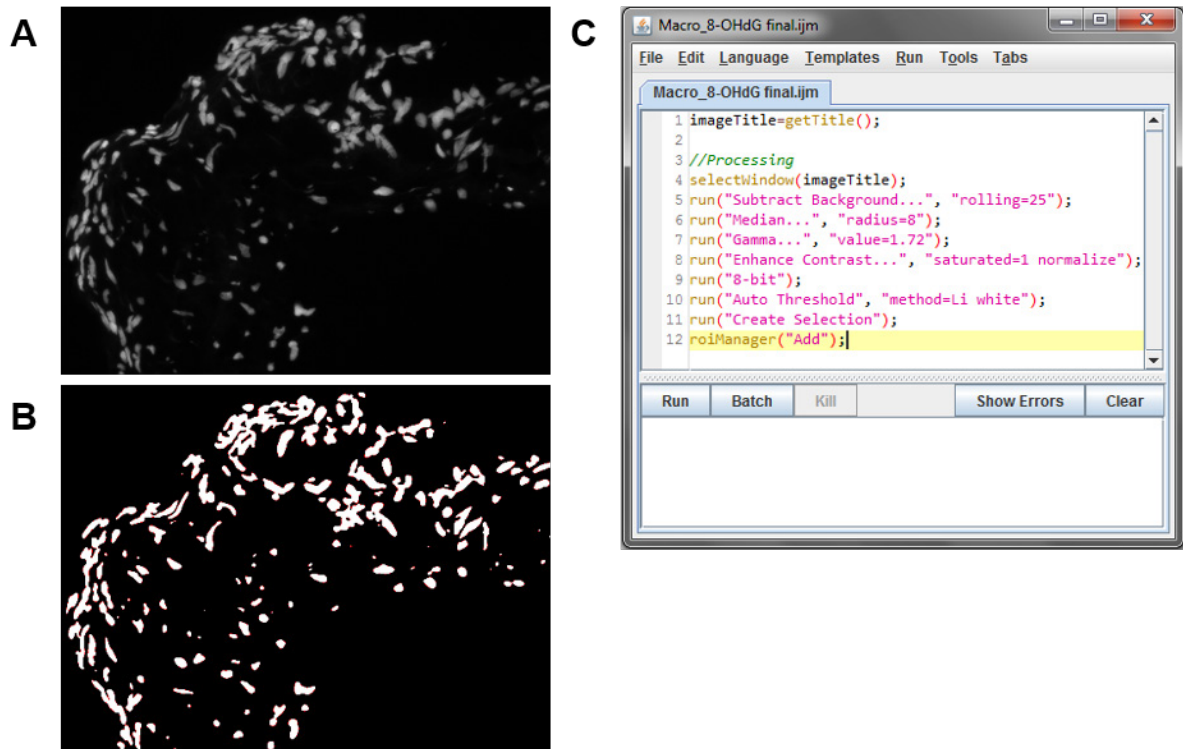


Abb. 4: Prozessierung des DAPI-Bildes und Extraktion der Zellkerne

Um den mittleren Graustufenwert des 8-OHdG-Signals im Zellkern zu messen, wurde das in Graustufen aufgenommene DAPI-Bild (A) in einem ersten Schritt zu einem binären Bild prozessiert (B). Hierzu wurde ein Makro gleichermaßen auf alle Bilder angewandt (C). Mithilfe dieser Prozessierungsschritte wurden die Zellkernstrukturen herausgearbeitet, unspezifisch angefärbte Kollagenfasern in den Hintergrund gerückt und ein binäres Bild erzeugt, welches lediglich die Zellkerne darstellt. Die selektierten Zellkernbereiche konnten dann auf die 8-OHdG-Bilder übertragen werden und der mittlere Graustufenwert zielgerichtet in den Zellkernen gemessen werden.

Die Zellkernselektionen wurden nun auf die zugehörige Rohbildaufnahme der 8-OHdG-Färbung übertragen (Abb. 5). Anschließend wurde der mittlere Graustufenwert des 8-OHdG-Signals im Bereich der Zellkerne gemessen. Mithilfe der ImageJ-Erweiterung *Results to Excel* (Anthony Sinadinos, Brenden Kromhout) wurden die erhobenen Daten in Excel® überführt.

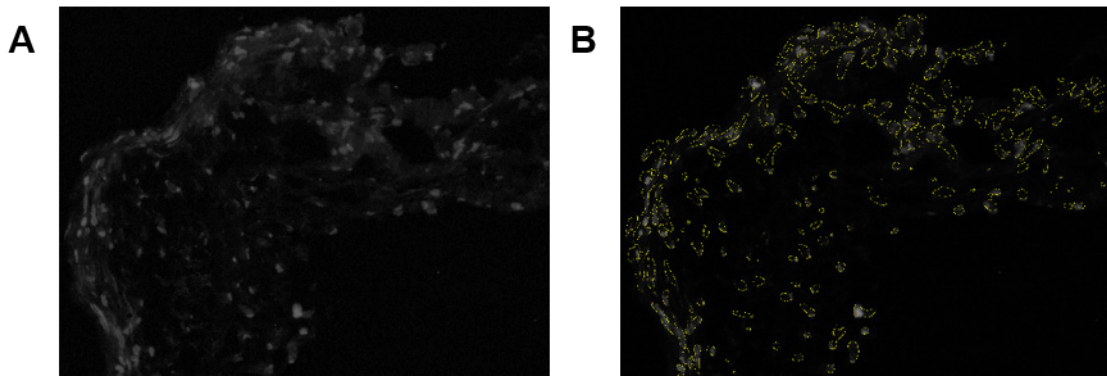


Abb. 5: Messung des mittleren Graustufenwertes im Bereich der Zellkerne

Um die mittleren Graustufenwerte des 8-OHdG-Signals zu messen, wurde das Rohdatenbild der 8-OHdG-Färbung in ImageJ geöffnet (**A**). Über dieses Bild wurden die selektierten Zellkernstrukturen gelegt (**B**). Anschließend konnte der mittlere Graustufenwert im selektierten Bereich gemessen werden.

Diese Messungen wurden mit allen Bildern einer Klappe durchgeführt, sodass sich für jedes Präparat neun Einzelwerte ergaben. Die Mittelwerte einer jeden Klappe wurden auf die Ergebnisse der Positivkontrolle normiert, um Unterschiede in den Intensitäten der einzelnen Färbedurchgänge auszuschließen. Wurden die Ergebnisse der Einzelstrukturen der Aortenklappe dargestellt, so wurde das arithmetische Mittel aus den drei vorhandenen Messwerten berechnet.

Zur übersichtlichen Darstellung der Ergebnisse wurden die Graustufenbilder mithilfe von ImageJ in dieser Arbeit eingefärbt. Hierfür wurden alle Einstellungen gleichermaßen auf alle Bilder angewandt, um eine Vergleichbarkeit untereinander zu gewährleisten. Die DAPI-Signale sind in Blau und die 8-OHdG-Signale in Rot abgebildet.

2.6 Untersuchung von inflammatorischen Prozessen

2.6.1 Immunhistochemische Färbung von VCAM-1

An aktiviertem Endothel ist das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 an der Leukozyten-Endothel-Adhäsion beteiligt und somit ein Marker der ersten Inflamationsprozesse. VCAM-1 wurde mithilfe einer immunhistochemischen Anfärbung durch 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht.

Es wurden bei -20 °C gelagerte Schnitte verwendet. Als Positivkontrolle diente ein Milzpräparat der Ratte.

Die Schnitte wurden 10 Minuten lang mit 4 %-igem Formaldehyd fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte ebenfalls für 10 Minuten mit 0,25 % Triton X. Dieses wurde in einer 1:400-Verdünnung mit PBS und Triton X-100 hergestellt. Unspezifische Epitope wurden mit 5 % Albumin Fraction V (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 8076.3) und 0,1 % Tween-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: P1379) über 60 Minuten lang blockiert. Der Primärantikörper (Anti-VCAM1 [EPR5047], monoklonal, anti-Kaninchen, abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, Artikelnummer: ab134047) wurde in einer Verdünnung von 1:500 in filtriertem PBS gelöst und für eine Stunde auf die Schnitte gegeben. Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu erkennen, wurde auf jedem Objektträger eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese wurde anstelle des

Primärantikörpers mit PBS behandelt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Objektträger jeweils dreimal für eine Minute gewaschen. Danach wurde für 10 Minuten eine H₂O₂-Blockierung durchgeführt. Nach einem dreimal 5-minütigen Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege IgG anti-Kaninchen-HRPO, polyklonal, Dianova, Hamburg, Deutschland, Artikelnummer: 111-035-003) in einer 1:500-Verdünnung. Im Anschluss daran wurden die Objektträger dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Über einen Zeitraum von 10 Minuten wurden die Objektträger in TRIS-Puffer abgestellt. Dieser wurde aus destilliertem Wasser und Trisaminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: SLBQ4845V) hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt. In einem nächsten Schritt erfolgte die Hinzugabe des Chromogens für 10 Minuten, welches aus dem *DAB Substrate Kit* (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland, Artikelnummer: DAB530) lichtgeschützt angesetzt wurde. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Objektträger für 5 Minuten erneut im TRIS-Puffer abgestellt wurden. Nach einem 1-minütigen Waschschrift in destilliertem Wasser wurden die Kerne mit filtrierter Mayers-Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 1.09249.1000) gegengefärbt. Die Hämalaunlösung wurde zuerst grob mit Leitungswasser und anschließend mit 1 %-iger rauchender Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 1003171000) von den Schnitten entfernt. Danach wurde zunächst für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser und anschließend für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Um überschüssiges Wasser von den Objektträgern zu entfernen, wurden die Objektträger für eine Minute in Ethanol getaucht und nach dem Trocknen mit Roti®-Histokitt II eingedeckt.

2.6.2 Auswertung

Die Auswertung der VCAM-1-Färbung erfolgte lichtmikroskopisch mithilfe eines semiquantitativen Scores. Dieser VCAM-1-Score wurde in Anlehnung an den in unserem Institut etablierten Von-Kossa-Score entwickelt (80). Hierbei wurde die Ausprägung der Anfärbung definierter Strukturen in einer 5-rangigen Ordinalskala bewertet.

Diese Bewertung wurde am Lichtmikroskop in 100- beziehungsweise 200-facher Vergrößerung durchgeführt. Wurde keine braune Anfärbung in der Aortenklappe gesehen, wurde ein Punktwert von null vergeben. Waren einzelne punktförmige Bereiche im Gewebe angefärbt, entsprach dies einem VCAM-1-Score von eins. Ein Wert von zwei wurde vergeben, wenn mehrere einzelne größere Flächen braun angefärbt waren. Zeigte sich eine flächige Anfärbung, die einen Anteil von weniger als 50 % der Struktur ausmachte, wurde ein VCAM-1-Score von drei vergeben. War mehr als 50 % der Struktur braun gefärbt, so entsprach dies einem VCAM-1-Score von vier. Eine komplette Anfärbung der Struktur erfüllte die Kriterien für den Wert fünf des Scores (siehe Tabelle 4 und Abb. 6).

Tabelle 4: Definition VCAM-1-Score

VCAM-1-Score	Definition
0	Keine braune Anfärbung
1	Anfärbung von einzelnen punktförmigen Bereichen
2	Anfärbung von mehreren einzelnen größeren Flächen (1-3)
3	Flächige Anfärbung des Gewebes mit einem Anteil von weniger als 50 %
4	Flächige Anfärbung des Gewebes mit einem Anteil von mehr als 50 %
5	Komplette Anfärbung der Struktur

Dargestellt sind die Kriterien für die Vergabe der VCAM-1-Scorewerte anhand einer 5-stufigen Ordinalskala.

Es wurden jeweils alle drei Taschen der Aortenklappe bewertet. Hierbei wurden die drei Strukturen Taschengewebe, Anulus und Kommissur unterschieden (Abb. 3). So ergaben sich für jedes Klappenpräparat neun Einzelwerte. Aus diesen wurde in Excel® das arithmetische Mittel gebildet, welches als Gesamtwert der Klappe in die Analyse einging. Wurden die Ergebnisse der Einzelstrukturen der Klappe dargestellt, so wurde das arithmetische Mittel dieser drei Score-Werte der jeweiligen Struktur dargestellt.

Um zu gewährleisten, dass lediglich die Zielantigene angefärbt wurden, wurden parallel zu der oben beschriebenen Bewertung die Positiv- und Negativkontrollen in die Auswertung einbezogen.

Im Anschluss an die Beurteilung der Färbung wurde jedes Aortenklappenpräparat am Lichtmikroskop mithilfe der Leica Software LAS in 100-facher Vergrößerung fotografiert. Einzelbilder wurden anschließend entweder automatisiert mithilfe der Funktion *Grid/Collection stitching* (89) oder manuell mithilfe der Erweiterung MosaicJ (90) in ImageJ 1.52n zu einem Übersichtsbild zusammengesetzt.

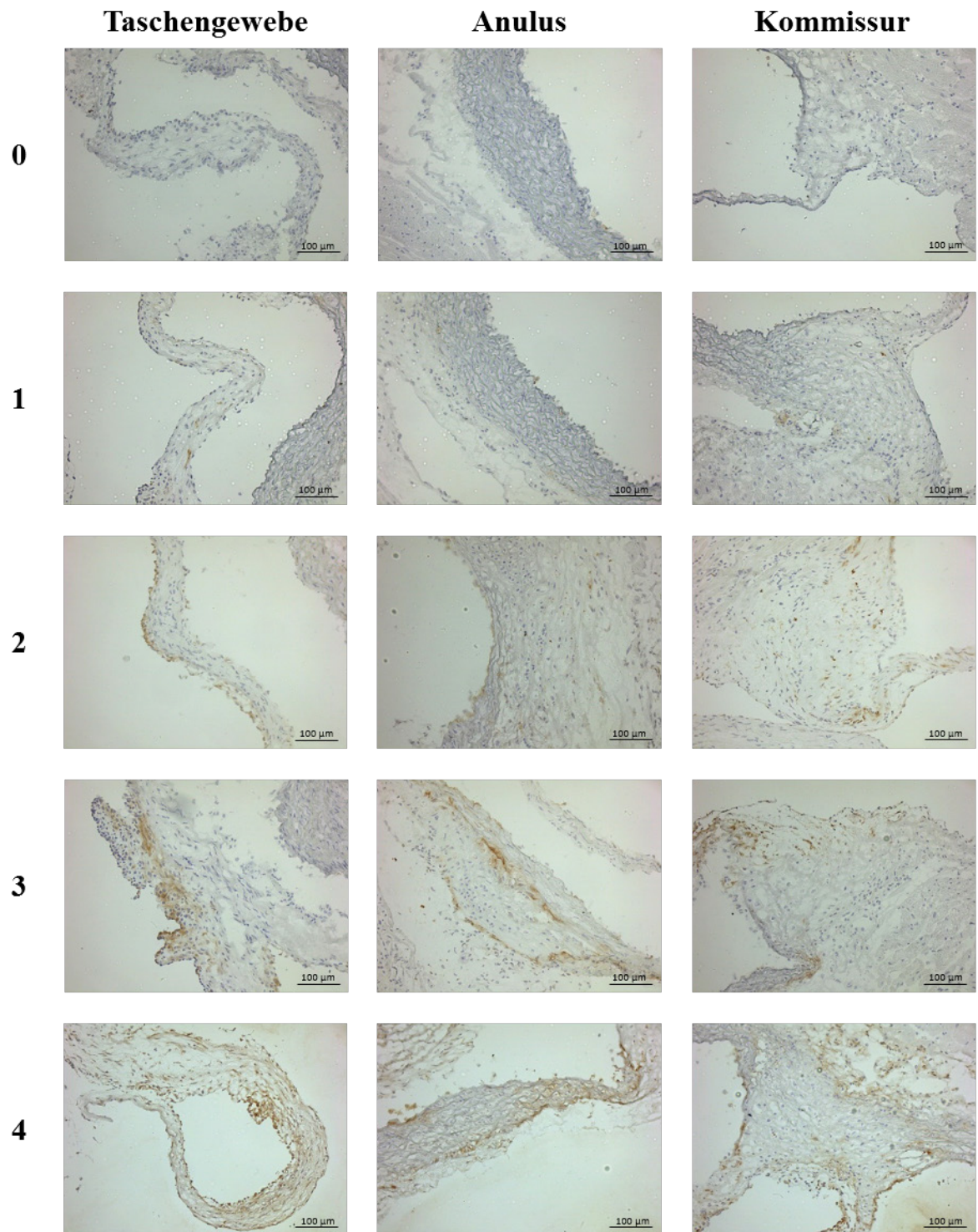


Abb. 6: VCAM-1-Score in Bildern

Für die Score-Werte 0 bis 4 des VCAM-1-Scores sind beispielhaft Abbildungen der Strukturen Taschengewebe, Anulus und Kommissur dargestellt. Ein Score-Wert von 5 ist definiert als die komplette Braunfärbung einer Struktur. Die Fotos wurden lichtmikroskopisch in 200-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.7 Untersuchung der Apoptose

2.7.1 Immunhistochemische Färbung der *Cleaved Caspase 3*

Die Caspase 3 ist eine der letzten Effektorcaspasen im Apoptosesignalweg der Zellen. Erst durch eine Spaltung wird die Caspase aktiv und kann den Zelltod einleiten. Mithilfe der Immunmarkierung durch DAB wurde die aktivierte *Cleaved Caspase 3* angefärbt.

Für die Färbung wurden Schnitte der Aortenklappe verwendet, die bei -80 °C gelagert wurden. Als Positivkontrollen wurden Schnitte des Dünndarms einer gesunden Ratte genutzt.

Die Färbung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die VCAM-1-Färbung. Anstelle des VCAM-1-Primärantikörpers wurde hier die *Cleaved Caspase 3* [Asp175] (monoklonal, anti-Kaninchen, Cell Signaling, Technology, Danvers, Vereinigte Staaten, Artikelnummer: 9664S) in einer Verdünnung von 1:800 verwendet. Der Sekundärantikörper (Ziege IgG anti-Kaninchen-HRPO, polyklonal, Dianova, Hamburg, Deutschland, Artikelnummer: 111-035-003) wurde in einer 1:500-Verdünnung genutzt. Für die Anfärbung der *Cleaved Caspase 3* genügte eine DAB-Inkubationszeit von 8 Minuten.

2.7.2 Auswertung

Die Auswertung der *Cleaved Caspase 3*-Färbung erfolgte lichtmikroskopisch. Zunächst wurde anhand der Positivkontrolle überprüft, ob die Antikörper korrekt gebunden haben. Anschließend wurden die Aortenklappenpräparate systematisch nach braun gefärbten Gewebsregionen untersucht. Wie oben beschrieben (Abb. 3) wurden die Strukturen Taschengewebe, Kommissur und Anulus in allen drei Taschen einzeln analysiert und Besonderheiten notiert. Braunfärbungen wurden auf ihre Spezifität hin überprüft, indem die gleiche Stelle der Negativkontrolle aufgesucht wurde.

Anschließend wurde die gesamte Klappe in Einzelbildern in 50- oder 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Diese Einzelbilder wurden dann entweder automatisiert mit dem *Grid/Collection stitching* (89) oder manuell mit der Erweiterung MosaicJ (90) in ImageJ zu einem Übersichtsbild zusammengefügt.

2.8 Statistik

Die Verwaltung der erfassten Daten und die Berechnungen des arithmetischen Mittels, von Normierungen und Häufigkeiten erfolgte mithilfe von Excel®. Die so gewonnenen arithmetischen Mittelwerte für jedes Versuchstier wurden zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung in GraphPad Prism 6.01 für Windows (GraphPad Software, La Jolla, Vereinigte Staaten, www.graphpad.com) überführt.

Es wurde zweiseitig mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 95 % getestet. Für die Taschendicken in der HE-Färbung und die Messwerte in der 8-OHdG-Färbung wurden verhältnisskalierte Daten verarbeitet. Da in Stichprobengrößen von sieben Tieren pro Gruppe gearbeitet wurde, konnte zu keinem Zeitpunkt von einer Normalverteilung ausgegangen werden, sodass für zweistufige Analysen der Mann-Whitney-Test und für mehrstufige Analysen der Kruskal-Wallis-Test verwendet wurde. Die Score-Werte der VCAM-1-Färbung entsprachen ordinalskalierten Werten. Dennoch wurde hier das

arithmetische Mittel erhoben, da die Daten mit den Rangsummentests analysiert wurden und das arithmetische Mittel die Anschaulichkeit erhöht. Wurden Klappenstrukturen untereinander verglichen, so fand der Friedman-Test Anwendung, da hier die zentrale Tendenz verbundener, mehrstufiger Stichproben untersucht wurde. Ergab sich in der initialen Testung mithilfe der mehrstufigen Kruskal-Wallis- oder Friedmann-Analysen ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Mittelwerten, so wurde der Post-hoc-Test nach Dunn zum Mehrfachvergleich durchgeführt.

In allen erstellten Säulendiagrammen spiegelt jeder Punkt ein Versuchstier wider. Charakterisiert werden die einzelnen Merkmale durch den Mittelwert (M) und den Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM).

3 Ergebnisse

3.1 Evaluierung der Auswertungsmethode

Um die eigens entwickelte Auswertungsmethode der 8-OHdG-Immunfluoreszenzfärbung zu evaluieren, wurden die bildanalytisch gemessenen Graustufenwerte der mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen miteinander verglichen. Beide Kontrollen wurden mit dem Primär- und Sekundärantikörper, wie in 2.5.1 beschrieben behandelt. Zusätzlich dazu wurde die Positivkontrolle mit H_2O_2 inkubiert.

In den insgesamt untersuchten 81 Einzelbildern der neun Positivkontrollen korrelierte ein Großteil des 8-OHdG-Signals mit dem DAPI-Signal und war somit ausschließlich in den Zellkernen zu finden. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den zusammengefügt Bildern aus dem 8-OHdG- und dem DAPI-Signal wider (Abb. 7). Hier zeigen die violett gefärbten Bereiche das 8-OHdG an, welches sich im Zellkern befindet. Lediglich in vier Bildern war das 8-OHdG-Signal nicht vorwiegend im Zellkern zu finden.

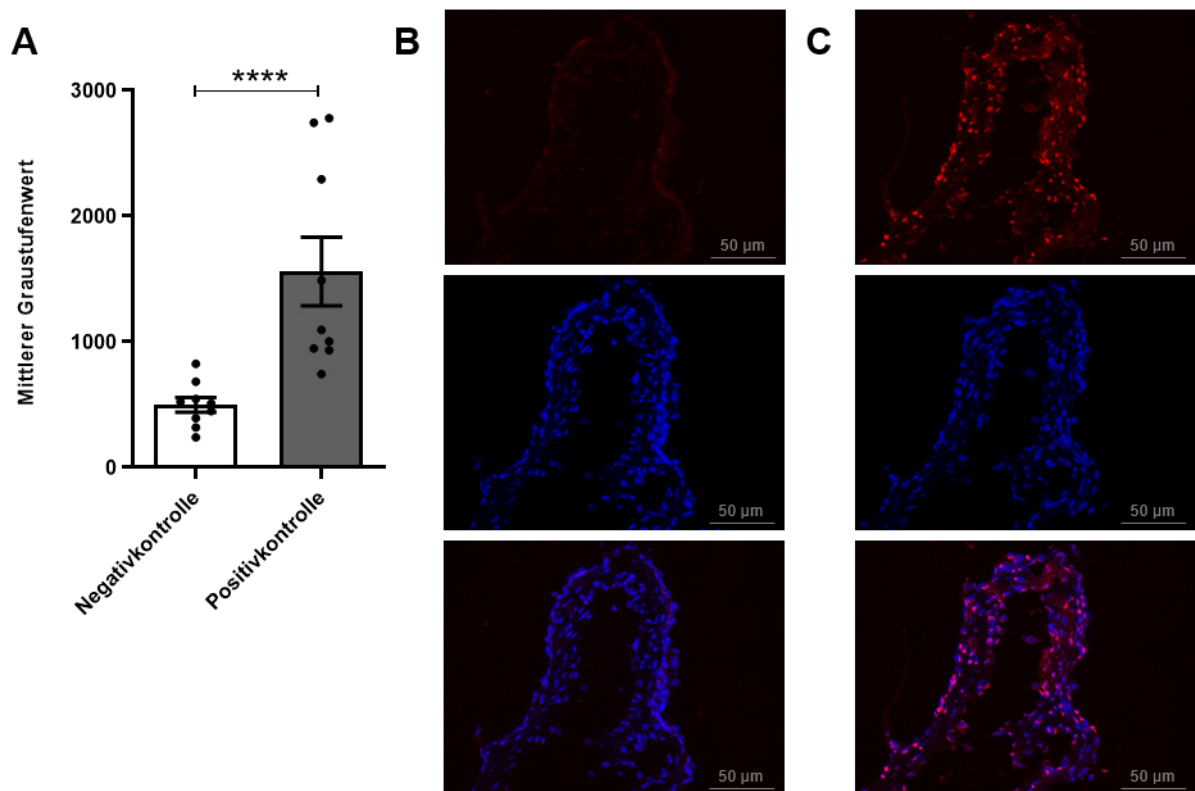


Abb. 7: Evaluierung der Auswertungsmethode der 8-OHdG-Immunfluoreszenzfärbung

Zur Evaluierung der Auswertungsmethode der 8-OHdG-Färbung wurden die bildanalytisch gemessenen Graustufenwerte der Positiv- und Negativkontrollen miteinander verglichen (A). Bei beiden Kontrollen handelt es sich um native Aortenklappenpräparate, welche nach dem Standardprotokoll gefärbt wurden (B). Die Positivkontrolle wurde zusätzlich vor der Färbung mit H_2O_2 behandelt (C). Zur Kerndarstellung erfolgte eine blaue Gegenfärbung mit DAPI (B, C). Dargestellt sind $M \pm SEM$ ($n = 9$), statistisch getestet wurde mit dem Mann-Whitney-Test: **** $p \leq 0,0001$; rot: 8-OHdG, blau: DAPI

Eine Behandlung mit H₂O₂ führte zu einem signifikant höheren 8-OHdG-Signal als die Anfärbung einer nativen Aortenklappe (Abb. 7; $499,095 \pm 59,603$ vs. $1559,130 \pm 273,581$ mit $p \leq 0,0001$). Dieses war im Mittel dreimal höher als das einer nativen Aortenklappe.

Trotz standardisierter Durchführung wiesen die mittleren Graustufenwerte in den einzelnen Färbedurchgängen große Schwankungen auf. Das 8-OHdG-Signal der Positivkontrolle war in Färbedurchgang neun kleiner als der mittlere Graustufenwert der Negativkontrolle in Färbedurchgang acht (Tabelle 5; 745,0 vs. 825,4). Innerhalb eines jeden Färbedurchgangs war der mittlere Graustufenwert der Positivkontrolle dennoch durchgehend größer als in der Negativkontrolle.

Tabelle 5: Mittlere Graustufenwerte der Positiv- und Negativkontrollen

Färbedurchgang	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Positivkontrolle	949,1	932,7	1490,5	1002,7	1095,1	2778,7	2294,6	2743,8	745,0
Negativkontrolle	450,3	319,4	544,9	523,0	394,0	683,2	240,5	825,4	511,1
Differenz	498,8	613,3	945,6	479,7	701,1	2095,5	2054,1	1918,4	233,9

Dargestellt sind die mittleren Graustufenwerte der mitgeführten Kontrollen in jedem der neun Färbedurchgänge und die Differenz der gemessenen Werte der Kontrollen. Der mittlere Graustufenwert ist eine dimensionslose Einheit.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung von nativen Aortenklappen mit 3 % H₂O₂ eine geeignete Positivkontrolle für die 8-OHdG-Immunfluoreszenz darstellt. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Färbedurchgängen trotz der Schwankungen zu gewährleisten, wurden die Messergebnisse in den folgenden Untersuchungen auf den mittleren Graustufenwert der Positivkontrolle des jeweiligen Färbedurchgangs normiert.

3.2 Einfluss der Bestrahlungsdauer

3.2.1 Oxidativer Stress

Um den Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Entwicklung von oxidativem Stress zu untersuchen, wurden die Aortenklappen 10 Minuten und 60 Minuten lang im Rahmen der photodynamischen Reaktion mit einem Rotlichtlaser bestrahlt und anschließend die 8-OHdG-Expression zum Zeitpunkt $t = 0$ d gemessen. Verglichen wurden diese Ergebnisse mit denen der Sham- und Laser-Gruppe.

Eine 60-minütige Bestrahlungsdauer der Aortenklappe führte in der ROS-Gruppe zu einer signifikant höheren Bildung von oxidativem Stress verglichen mit einer 10-minütigen Bestrahlung (Abb. 8A; $1,049 \pm 0,160$ vs. $0,486 \pm 0,038$; $p \leq 0,01$). Diese Unterschiede zeigen sich beispielhaft in den Aufnahmen in Abb. 9A+B.

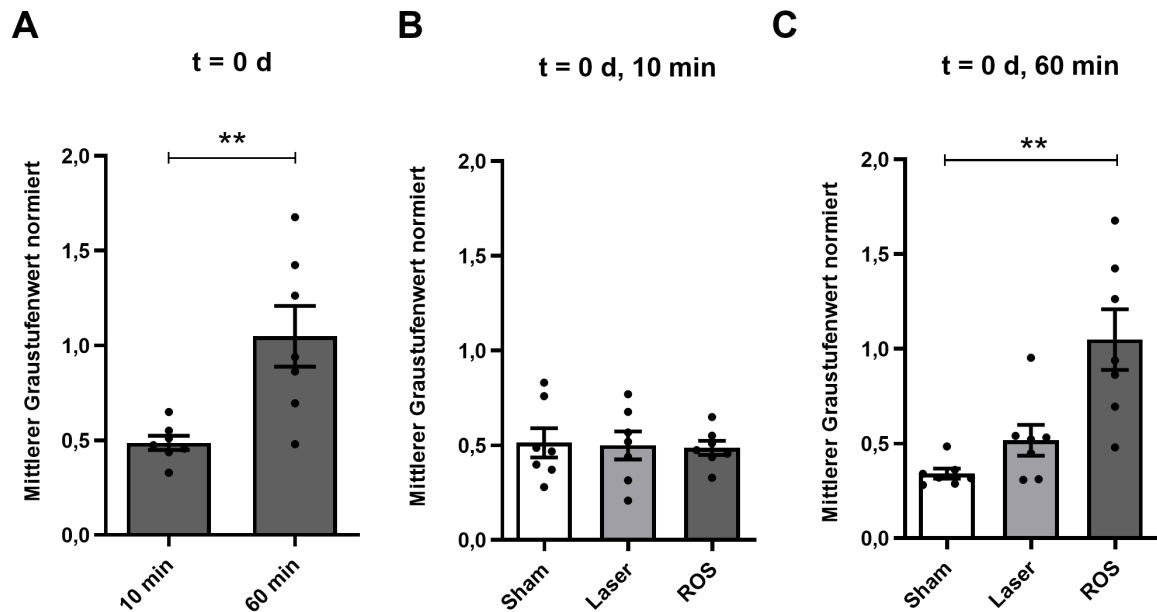


Abb. 8: Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Bildung von oxidativem Stress

Für die indirekte Darstellung von oxidativem Stress wurde die 8-OHdG-Expression nach einer 10- bzw. einer 60-minütigen Bestrahlung mithilfe der mittleren Graustufenwerte gemessen. Gezeigt sind die Ergebnisse der beiden ROS-Gruppen nach einer Bestrahlungsdauer von 10 bzw. 60 Minuten (**A**). Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der ROS-Gruppe mit dem oxidativen Stress in den Kontrollgruppen (Sham- und Lasergruppe) nach einer Interventionsdauer von 10 Minuten (**B**) bzw. 60 Minuten (**C**) miteinander verglichen. Dargestellt sind $M \pm SEM$ ($n = 7$) normiert auf die Positivkontrolle, statistisch getestet wurde mit dem Mann-Whitney-Test: $** p \leq 0,01$ (**A**), dem Kruskal-Wallis-Test: $*** p \leq 0,001$ (**B**, **C**) und *post hoc* mit dem Dunns-Test (**C**): Sham gegen ROS $** p \leq 0,01$.

Nach einer Interventionsdauer von 10 Minuten ergab sich kein Unterschied in der Entwicklung von oxidativem Stress zwischen der Sham-, der Laser- und der ROS-Gruppe (Abb. 8B; $0,513 \pm 0,077$ vs. $0,499 \pm 0,0744$ vs. $0,486 \pm 0,038$).

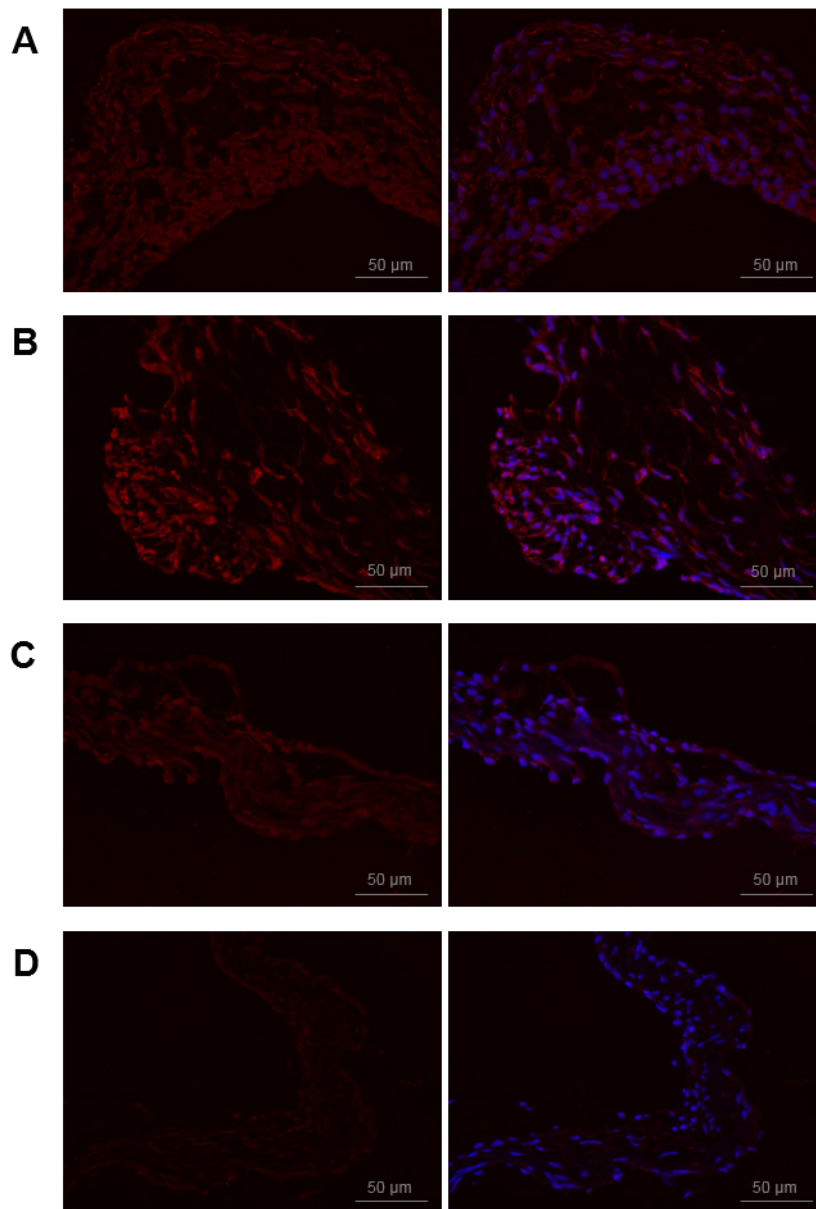


Abb. 9: Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Bildung von oxidativem Stress

In Bezugnahme zu Abb. 8 sind Beispielbilder der Taschen der 8-OHdG-Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Die Aortenklappen der ROS-Gruppen (**A**, **B**) wurden nach Temoporfin-Gabe 10 Minuten (**A**) bzw. 60 Minuten (**B**) lang bestrahlt und anschließend explantiert ($t = 0$ d). Darüber hinaus sind Ergebnisse der Laser- (**C**) und der Sham-Gruppe (**D**) nach 60-minütiger Interventionsdauer, jeweils zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d abgebildet. Die Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Dargestellt sind in der linken Spalte in Rot die Signale der 8-OHdG-Färbung. In der rechten Spalte sind sowohl die 8-OHdG-Signale in Rot als auch die DAPI-Signale in Blau dargestellt. Violett stellt sich hier das 8-OHdG-Signal im Zellkern dar.

Nach einer Interventionsdauer von 60 Minuten zeigte sich eine signifikant höhere ROS-Expression in der ROS-Gruppe verglichen mit der Sham-Gruppe ($1,049 \pm 0,160$ vs. $0,341 \pm 0,026$; $p < 0,01$; Abb. 8C). Die Expression von oxidativem Stress war in der ROS-Gruppe mehr als doppelt so groß. Der Unterschied zwischen ROS- und Laser-Gruppe war ebenso wenig signifikant ($p = 0,158$), wie der Unterschied zwischen der Sham- und der Laser-Gruppe ($p = 0,466$). Auch die Fotos in Abb. 9B-D zeigen beispielhaft Abstufungen in den Intensitäten der 8-OHdG-Färbung.

Folglich führt die Bestrahlung der Aortenklappe über einen Zeitraum von 60 Minuten gemeinsam mit der Temoporfinbehandlung unmittelbar danach ($t = 0$ d) zu einer größeren Bildung von oxidativem Stress als in der Sham-Kontrollgruppe und nach einer Bestrahlungsdauer von 10 Minuten.

3.2.2 Inflammatorische endotheliale Aktivierung

Ziel der Untersuchung war die Frage, welchen Einfluss die Bestrahlungsdauer im Rahmen der PDR auf die inflammatorische endotheliale Aktivierung hat. Hierzu wurden die Aortenklappen 10 Minuten bzw. 60 Minuten lang mit einem Rotlichtlaser bestrahlt und anschließend zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d die VCAM-1-Expression analysiert. Verglichen wurden die Ergebnisse der ROS-Gruppe mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe (Sham- und Laser-Gruppe).

Der direkte Vergleich der VCAM-1-Expression in den ROS-Gruppen nach 10- bzw. 60-minütiger Bestrahlung ergab keinen Unterschied zwischen diesen beiden Behandlungsgruppen (Abb. 10A). In beiden Gruppen lag der mittlere VCAM-1-Score bei 1 bis 2. Dies deckt sich mit der durchschnittlichen Beobachtung von mindestens punktförmigen bis einzeln flächigen Anfärbungen.

Eine Interventionsdauer von 10 Minuten erbrachte keinen signifikanten Unterschied in der VCAM-1-Expression zwischen Sham-, Laser- und ROS-Gruppe (Abb. 10B). In allen drei Gruppen wurden durchschnittlich einzelne punktförmige Ansammlungen von VCAM-1 nachgewiesen, was einem VCAM-1-Score von 1 entspricht.

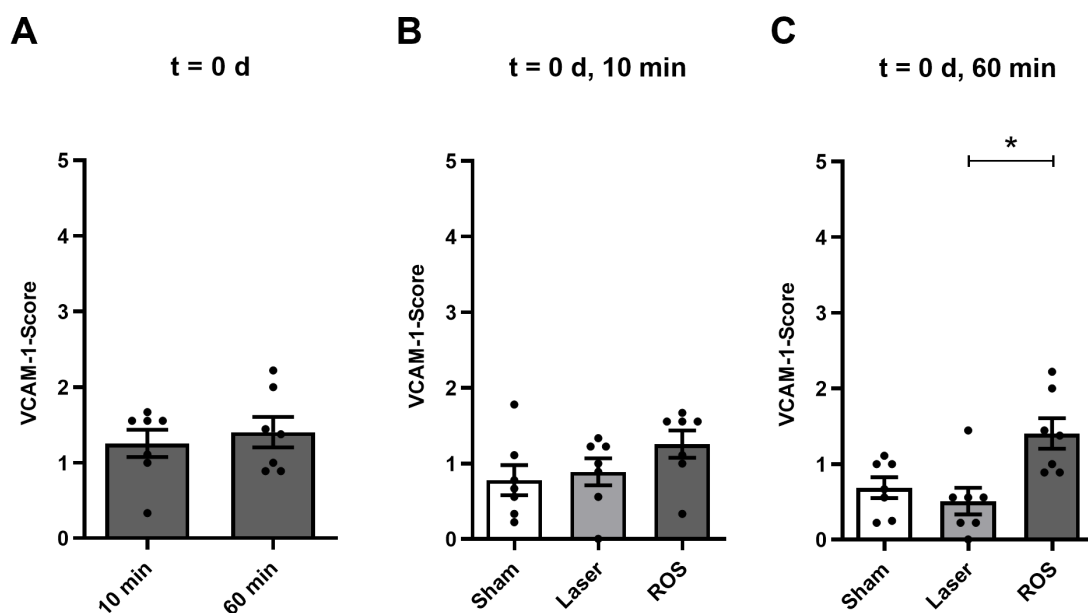


Abb. 10: Einfluss der Bestrahlungsdauer auf inflammatorische Prozesse

Die Aortenklappen wurden 10 bzw. 60 Minuten lang bestrahlt. Anschließend wurde die VCAM-1-Expression mithilfe des VCAM-1-Scores ermittelt (A). Verglichen wurden die Ergebnisse der 10-minütigen (B) bzw. 60-minütigen (C) Bestrahlung mit Kontrollgruppen (Sham- und Laser-Gruppe) zum Zeitpunkt $t = 0$ d. Dargestellt sind $M \pm SEM$ ($n = 7$), statistisch getestet wurde mit dem Mann-Whitney-Test (A), dem Kruskal-Wallis-Test: ** $p \leq 0,01$ (B, C) und *post hoc* mit dem Dunns-Test (C): Laser gegen ROS * $p \leq 0,05$.

Wurde die Aortenklappe im Gegensatz dazu 60 Minuten lang bestrahlt, so zeigte sich in der ROS-Gruppe im Vergleich zur Laser-Gruppe verstärkt inflammatorische Prozesse (Abb. 10C, $p \leq 0,05$). In der ROS-Gruppe wurden durchschnittlich VCAM-1-Score-Werte von 1 bis 2 vergeben, wobei auch mehrere flächige VCAM-1 positive Areale in der Aortenklappe erkennbar waren (entsprechend den Score-Werten 3 und 4). In der Laser-Gruppe waren mehr als 90 % der Score-Werte keiner oder einzelnen punktförmigen Braunfärbungen zuzuordnen.

Beispielhaft sind diese Unterschiede in Abb. 11 dargestellt. In der ROS-Gruppe zeigte sich hier über die komplette Aortenklappe hinweg eine deutliche Braunfärbung (Abb. 11A), wohingegen in der Laser-Gruppe (Abb. 11B) kein positives Signal erkennbar war.

Temoporfin führte in Kombination mit einer 60-minütigen Bestrahlung der Aortenklappe zu einer vermehrten VCAM-1-Expression im Vergleich zur alleinigen 60-minütigen Bestrahlung der Aortenklappe. Eine kürzere Bestrahlungsdauer im Rahmen der PDR resultierte jedoch nicht in einer verminderten inflammatorischen Aktivität.

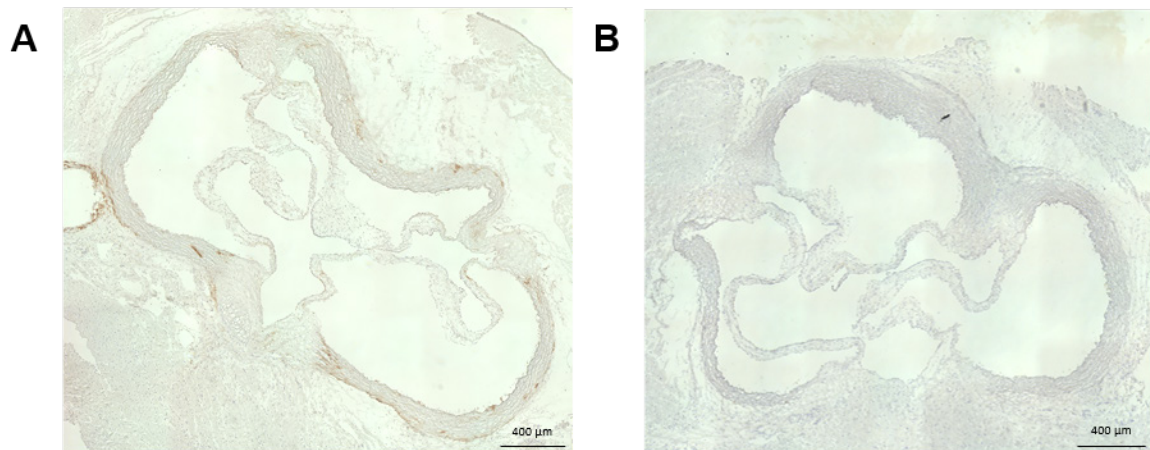


Abb. 11: Vergleich der DAB-Anfärbung von VCAM-1 nach einer 60-minütigen Bestrahlung

Die Bilder zeigen beispielhaft Querschnitte der Aortenklappen von Tieren aus der ROS-Gruppe (A) und Laser-Gruppe (B) zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d. Die Aortenklappen wurde 60 Minuten lang bestrahlt, geschnitten und VCAM-1 mithilfe von DAB angefärbt. Aufgenommen wurden Einzelbilder in 100-facher Vergrößerung.

3.2.3 Apoptose

Um zu untersuchen, ob durch die physikalischen Effekte des Rotlichtlasers apoptotische Mechanismen im Gewebe aktiviert werden, wurde die Expression der *Cleaved Caspase 3* untersucht. Verglichen wurden Tiere der ROS-, Laser- und Sham-Gruppe nach 10- bzw. 60-minütiger Interventionsdauer zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d.

Nach einer Interventionsdauer von 10 Minuten zeigte sich weder in der ROS- noch in der Laser- oder Sham-Gruppe eine vermehrte Aktivität der *Cleaved Caspase 3* (Abb. 12).

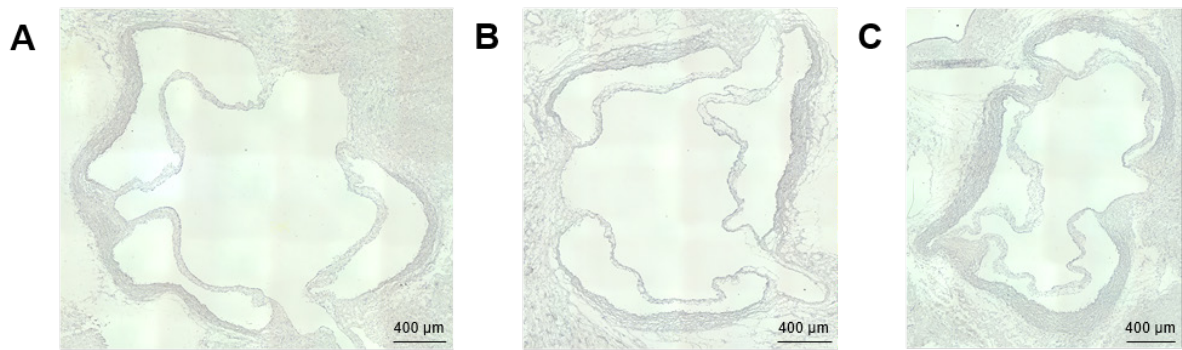


Abb. 12: Apoptose nach 10-minütiger Intervention zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d

Abgebildet sind immunhistochemisch mit *Cleaved Caspase 3* angefärbte Querschnitte der Aortenklappe nach einer 10-minütigen Interventionsdauer. Es wurden die Sham- (A) und Laser-Gruppe (B) mit der ROS-Gruppe (C) verglichen. Aufgenommen wurden Einzelbilder in 100-facher Vergrößerung.

Nach einer 60-minütigen Interventionsdauer zeigte sich ebenfalls kein gravierender Unterschied zwischen den Interventionsgruppen (Abb. 13). In der ROS-Gruppe wiesen vier Strukturen vereinzelte positive Areale auf, wohingegen in der Sham- und in der Laser-Gruppe jeweils nur in einer Struktur punktförmige Braunfärbungen nachgewiesen wurden. In keiner der analysierten Aortenklappen konnte eine massive apoptotische Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 13).

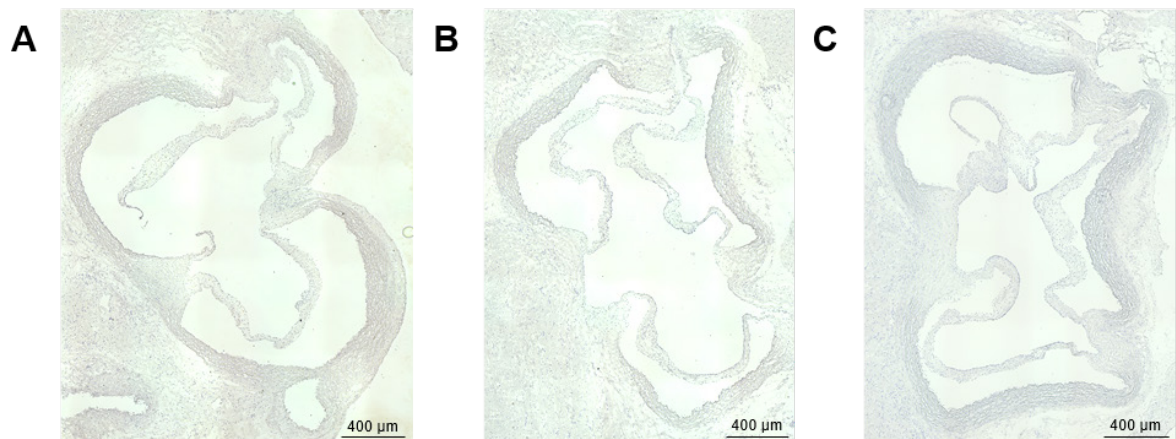


Abb. 13: Apoptose nach 60-minütiger Intervention zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d

Abgebildet sind Querschnitte der Aortenklappen der Sham- (A), Laser- (B) und ROS-Gruppe (C) nach einer 60-minütigen Interventionsdauer und DAB-Färbung mit *Cleaved Caspase 3*. Die Bilder wurden in der Durchlichtmikroskopie mit 100-facher Vergrößerung in Einzelbildern erstellt.

Sowohl eine 10-minütige als auch eine 60-minütige Intervention führte in keiner der Behandlungsgruppen zu einer vermehrten *Cleaved Caspase 3*-Aktivität.

3.3 Effekt im Zeitverlauf

3.3.1 Oxidativer Stress

Um zu untersuchen, wie sich der oxidative Stress nach Temoporfingabe und einer 60-minütigen Laserbestrahlung im Zeitverlauf entwickelt, wurde die ROS-Expression acht Tage nach der Intervention mithilfe von 8-OHdG gemessen und den Ergebnissen zum Zeitpunkt $t = 0$ d gegenübergestellt. Verglichen wurden jeweils die Ergebnisse der ROS-Gruppe mit den Ergebnissen der Kontrollgruppen (Sham- und Laser-Gruppe).

Verglichen mit den Ergebnissen zum Zeitpunkt $t = 0$ d zeigte sich acht Tage nach der Laserbestrahlung ein signifikant vermindertes ROS-Signal in der 8-OHdG-Färbung (Abb. 14A; $t_0: 1,049 \pm 0,160$ vs. $t_8: 0,484 \pm 0,080$; $p \leq 0,01$).

Nach acht Tagen war der oxidative Stress in der Laser-Gruppe tendenziell ($p = 0,094$) höher als in der ROS-Gruppe. Ein eindeutig signifikanter Unterschied ergibt sich hier allerdings nicht (Abb. 14B). Die 8-OHdG-Expression ist sowohl in der Sham- als auch in der Laser-Gruppe über die Zeit angestiegen (Sham-Gruppe $t_0: 0,341 \pm 0,026$, $t_8: 0,559 \pm 0,060$; Laser-Gruppe $t_0: 0,517 \pm 0,082$, $t_8: 0,732 \pm 0,092$). Der oxidative Stress in der ROS-Gruppe ist demnach direkt nach der Intervention ($t = 0$ d) signifikant höher als in der Sham-Gruppe und sinkt im Zeitverlauf auf das Niveau der Kontrollgruppen ab.

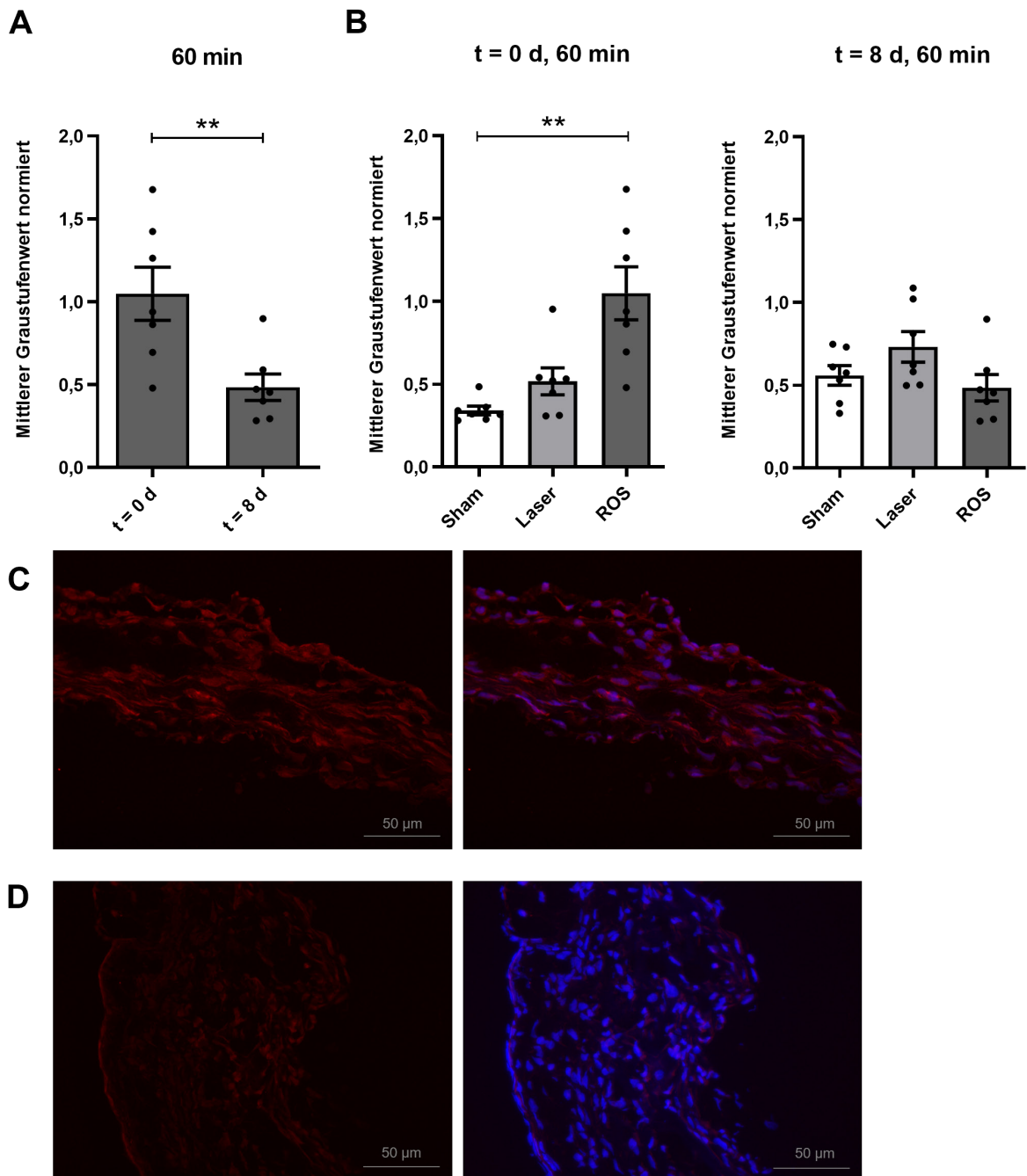


Abb. 14: Oxidativer Stress im Zeitverlauf

Untersucht wurde der zeitliche Verlauf des oxidativen Stresses anhand des normierten mittleren Graustufenwertes der 8-OHdG-Färbung nach der Intervention. Verglichen wurde die 8-OHdG-Expression direkt nach der 60-minütigen ROS-Behandlung ($t = 0$ d) und acht Tage später ($t = 8$ d) (A). Darüber hinaus ist der wie in Abb. 8 dargestellte Vergleich zwischen den Kontrollgruppen und der ROS-Gruppe gezeigt. In Analogie dazu werden die Sham- und Laser-Gruppe mit der ROS-Gruppe nach acht Tagen gegenübergestellt (B). Beispielhaft sind Bilder der Immunfluoreszenzfärbung in 400-facher Vergrößerung gezeigt (C, D). Rot eingefärbt ist das 8-OHdG-Signal in der linken Spalte. In der rechten Spalte sind das 8-OHdG-Signal und das blaue DAPI-Signal übereinandergelegt. Hier wird das Signal von Taschen der ROS-Gruppe direkt nach der Bestrahlung (C) und acht Tage später gezeigt (D). Dargestellt sind $M \pm SEM$ ($n = 7$) normiert auf die Positivkontrolle, statistisch getestet wurde mit dem Mann-Whitney-Test: ** $p \leq 0,01$ (A), dem Kruskal-Wallis-Test (B): *** $p \leq 0,001$ und *post hoc* mit dem Dunns-Test (B): Sham gegen ROS $t = 0$ d, 60 min ** $p \leq 0,01$.

3.3.2 Inflammatorische endotheliale Aktivierung

Um zu analysieren, wie sich inflammatorische Prozesse im Zeitverlauf entwickeln, wurde die VCAM-1-Expression acht Tage nach der Intervention unter Verwendung einer 60-minütigen Bestrahlungsdauer untersucht und den Ergebnissen zum Zeitpunkt $t = 0$ d gegenübergestellt. Verglichen wurden die Ergebnisse mit denen der Kontrollgruppen (Sham- und Laser-Gruppe).

In den ROS-Gruppen zeigte sich kein Unterschied in der VCAM-1-Expression über den Verlauf von acht Tagen (Abb. 15A). Der mittlere VCAM-1-Score lag konstant zwischen 1 und 2 mit einer größeren Tendenz zu einzelnen punktförmigen Anfärbungen.

Der VCAM-1-Score der ROS-Gruppen ist größer als die VCAM-1-Expression in den Laser-Gruppen (Abb. 15B; $t = 0$ d: $p \leq 0,05$; $t = 8$ d: $p = 0,054$). Ein signifikanter Unterschied zwischen ROS- und Sham-Gruppe zeigte sich zu keinem Zeitpunkt. In den ROS-Gruppen waren im Mittel punktförmige bis einzelne flächige Braunfärbungen zu sehen (Score-Werte von 1 bis 2). Die Laser-Gruppen wiesen dagegen im Durchschnitt keine oder nur einzelne punktförmige positive Areale im Querschnitt der Aortenklappe auf. In der ROS-Gruppe wurden insgesamt zehn Mal die Score-Werte 3 oder 4 vergeben. Dieser Grad der Inflammation wurde weder in der Sham- noch in der Laser-Gruppe beobachtet. Auch die Aufnahmen in Abb. 15C und D zeigen diese Unterschiede zwischen ROS- und Laser-Gruppe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inflammation in der ROS-Gruppe nach 60-minütiger PDR über den Zeitverlauf gleich hoch bleibt, die Unterschiede zu der Laser-Gruppe jedoch kleiner werden.

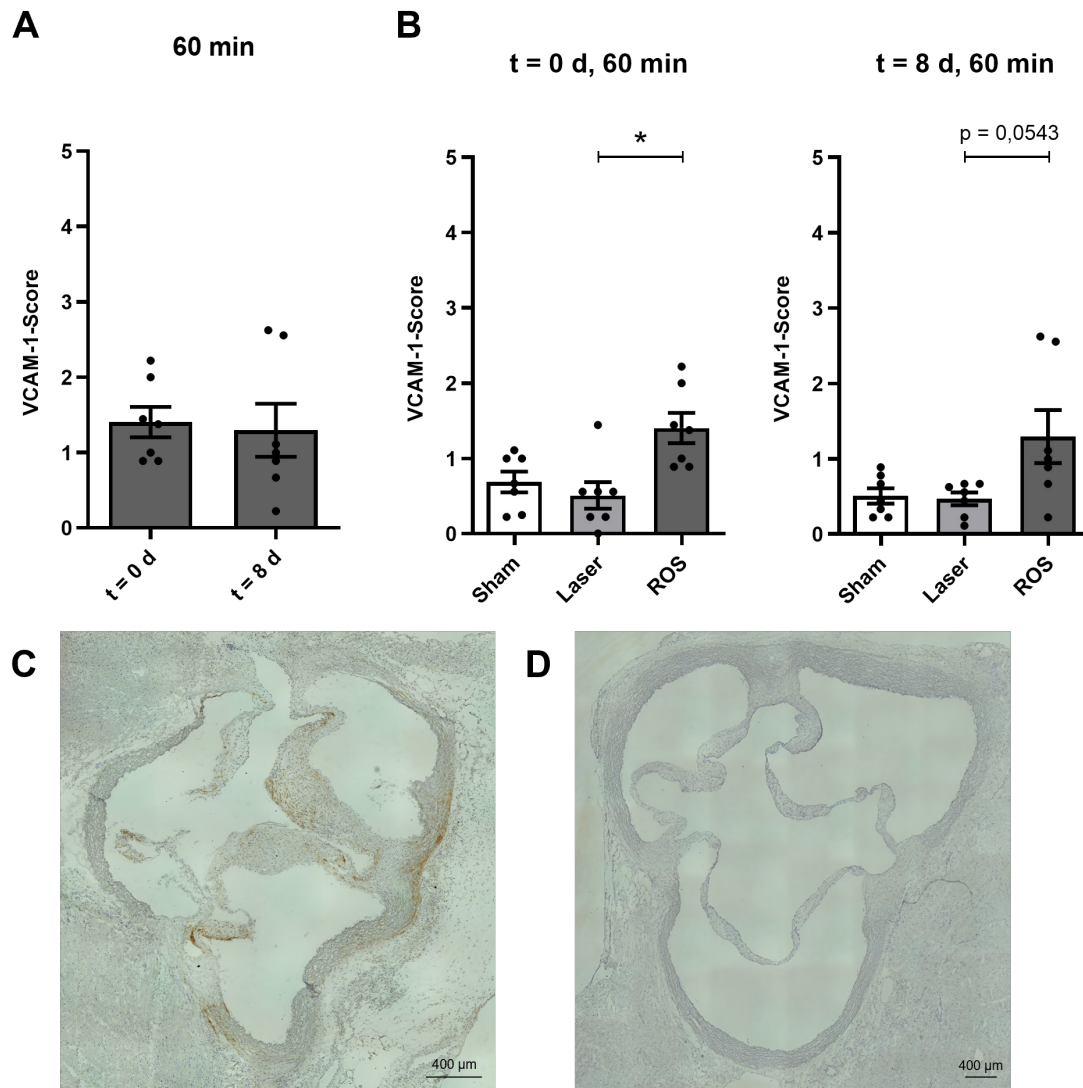


Abb. 15: Inflammation im Zeitverlauf

Verglichen wurde die VCAM-1-Expression direkt nach der 60-minütigen Intervention (t = 0 d) und acht Tage später (t = 8 d) mithilfe des VCAM-1-Scores (**A**, **B**). Dargestellt wurde zum einen der direkte Vergleich zwischen den beiden ROS-Gruppen (**A**). Darüber hinaus wurde die VCAM-1-Expression zu beiden Zeitpunkten in den Kontrollgruppen mit derjenigen der ROS-Gruppe gegenübergestellt (**B**). Dargestellt sind $M \pm SEM$ (n = 7), statistisch getestet wurde mit dem Mann-Whitney-Test (**A**), dem Kruskal-Wallis-Test (**B**): ** $p \leq 0,01$ für t = 0 d, 60 min und * $p \leq 0,05$ für t = 8 d, 60 min und *post hoc* mit dem Dunns-Test (**B**): Laser gegen ROS t = 0 d, 60 min * $p \leq 0,05$, keine Signifikanz für t = 8 d, 60 min (Laser gegen ROS $p = 0,05$). Beispielhaft werden Abbildungen der Aortenklappe aus der ROS- (**C**) und der Laser-Gruppe (**D**) acht Tage nach der Bestrahlung gezeigt. Hier wurde VCAM-1 mittels einer DAB-Färbung sichtbar gemacht. Es wurden Einzelbilder in 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.3.3 Apoptose

Ziel dieser Untersuchungen war die Detektion von apoptotischen Mechanismen im Zeitverlauf von acht Tagen nach der Intervention und die Gegenüberstellung der Ergebnisse mit denen zum Zeitpunkt $t = 0$ d. Verglichen wurden hierfür die Ergebnisse der *Cleaved Caspase 3*-Färbung der ROS-Gruppe mit denen der Kontrollgruppen (Sham- und Laser-Gruppe).

Acht Tage nach einer 60-minütigen Intervention der Aortenklappe zeigte sich in keiner der untersuchten Gruppen eine vermehrte Aktivität der *Cleaved Caspase 3* (Abb. 16).

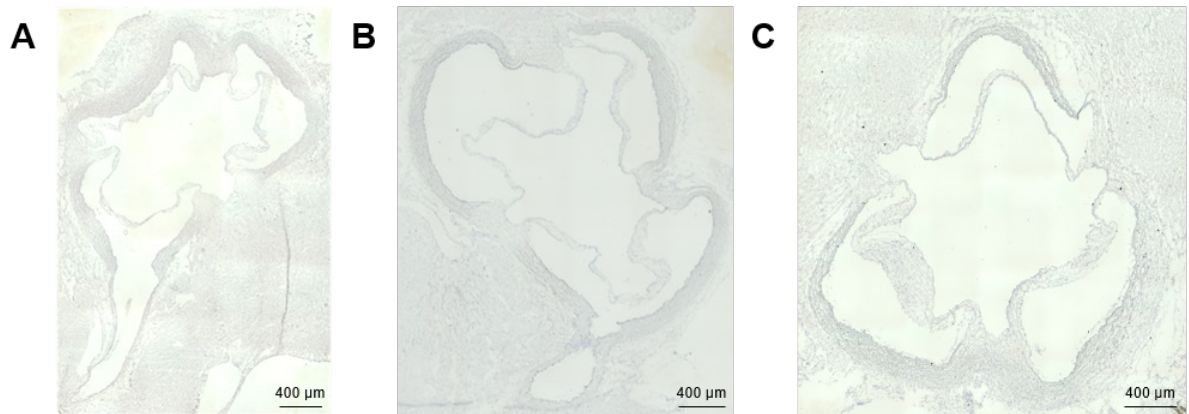


Abb. 16: Apoptose acht Tage nach einer 60-minütigen Interventionsdauer

Dargestellt sind Querschnitte der Aortenklappe acht Tage nach einer 60-minütigen Intervention und nach Anfärbung mittels DAB auf *Cleaved Caspase 3*. Die Beispielbilder aus der Sham- (A), Laser- (B) und ROS-Gruppe (C) wurden in Einzelbildern in 100-facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend mithilfe von ImageJ zusammengesetzt.

3.4 Regionale Unterschiede der Aortenklappen

3.4.1 Anatomie und morphologische Unterschiede in der Übersichtsfärbung

In der HE-Übersichtsfärbung zeigten sich makroskopisch in allen Klappenquerschnitten die drei *Sinus valsalvae*, welche jeweils von Taschengewebe (Abb. 17A), den Kommissuren (Abb. 17B) und dem Anulus (Abb. 17C) begrenzt wurden.

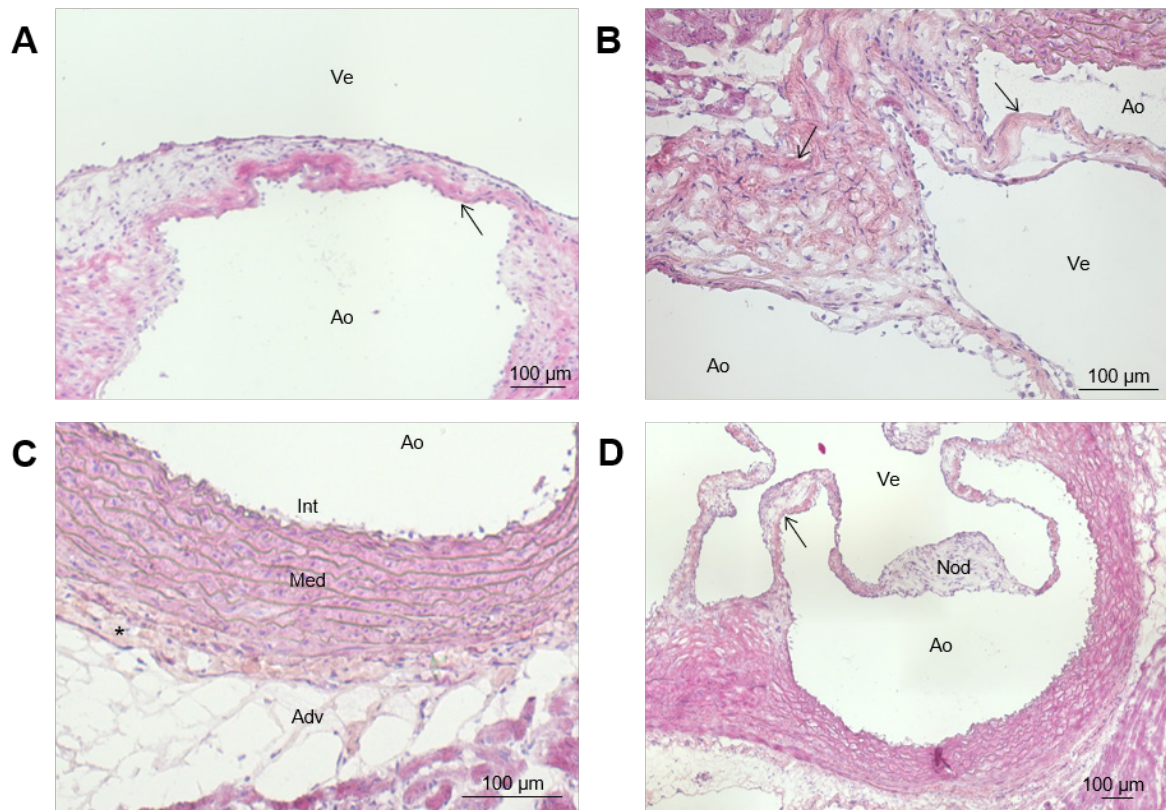


Abb. 17: Darstellung der Klappenstrukturen in HE-Färbung

Abgebildet sind die einzeln betrachteten Klappenstrukturen Tasche (A), Kommissur (B) und Anulus (C), sowie eine komplette Tasche (D). Zur Orientierung ist jeweils die aortale (Ao) und ventrikuläre (Ve) Seite der Tasche markiert. Kollagenfasern sind rosarot eingefärbt (Pfeile) und treten vorwiegend auf der aortalen Seite der Tasche auf (A, B). Auch die Kommissuren bestehen zu einem Großteil aus Kollagenfasern (B). Der Anulus zeigt die typische Wandschichtung von Arterien des elastischen Typs mit der Intima (Int), Media (Med) und Adventitia (Adv) (C). * markiert rot eingefärbte Anteile zwischen der Media und Adventitia, die am ehesten Erythrozyten entsprechen. Am oberen Rand einer Tasche der Aortenklappe befindet sich der *Nodulus valvae semilunaris* (Nod), eine mediale Verdickung des Taschengewebes (D).

In den Taschen konnten zwei Gewebearten voneinander unterschieden werden. So fielen Regionen mit dichtem und azidophilem Gewebe auf. Andere Bereiche der Tasche waren eher aufgelockert und weniger anfärbbar. Je nach Anschnitt konnte zur ventrikulären Seite hin eine durchgehende Zellschicht im Sinne eines Endothels dargestellt werden. Auf aortaler Seite fielen extrazellulär deutlich violett angefärbte Bereiche im Sinne einer Kollagenanreicherung auf (Abb. 17A). Alle Klappen enthielten zumeist in gleichen Anteilen dicke und dünne Abschnitte der Taschen mit aufgelockerten und knotigen Anteilen. Je nach Anschnitthöhe zeigten sich in der Mitte der Taschen Verdickungen der Taschen, die *Noduli valvae semilunaris*, welche aufgelockert und wenig anfärbbar imponierten (Abb. 17D).

In der quantitativen Untersuchung der Dicke der Taschen ergab sich direkt nach der Intervention ($t = 0$ d) kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Abb. 18A; 10 min: $73,753 \mu\text{m} \pm 9,411 \mu\text{m}$ vs. $69,911 \mu\text{m} \pm 8,122 \mu\text{m}$ vs. $71,657 \mu\text{m} \pm 8,718 \mu\text{m}$; 60 min: $77,191 \mu\text{m} \pm 14,093 \mu\text{m}$ vs. $71,324 \mu\text{m} \pm 7,271 \mu\text{m}$ vs. $74,367 \mu\text{m} \pm 7,940 \mu\text{m}$). Auch in der

Nachbeobachtung nach acht Tagen war in keiner der Gruppen eine signifikante Verdickung der Taschen sichtbar (Abb. 18B; 10 min: $78,228 \mu\text{m} \pm 7,128 \mu\text{m}$ vs. $80,675 \mu\text{m} \pm 10,184 \mu\text{m}$ vs. $60,540 \mu\text{m} \pm 10,881 \mu\text{m}$; 60 min: $71,216 \mu\text{m} \pm 10,182 \mu\text{m}$ vs. $63,205 \mu\text{m} \pm 3,641 \mu\text{m}$ vs. $85,008 \mu\text{m} \pm 18,102 \mu\text{m}$).

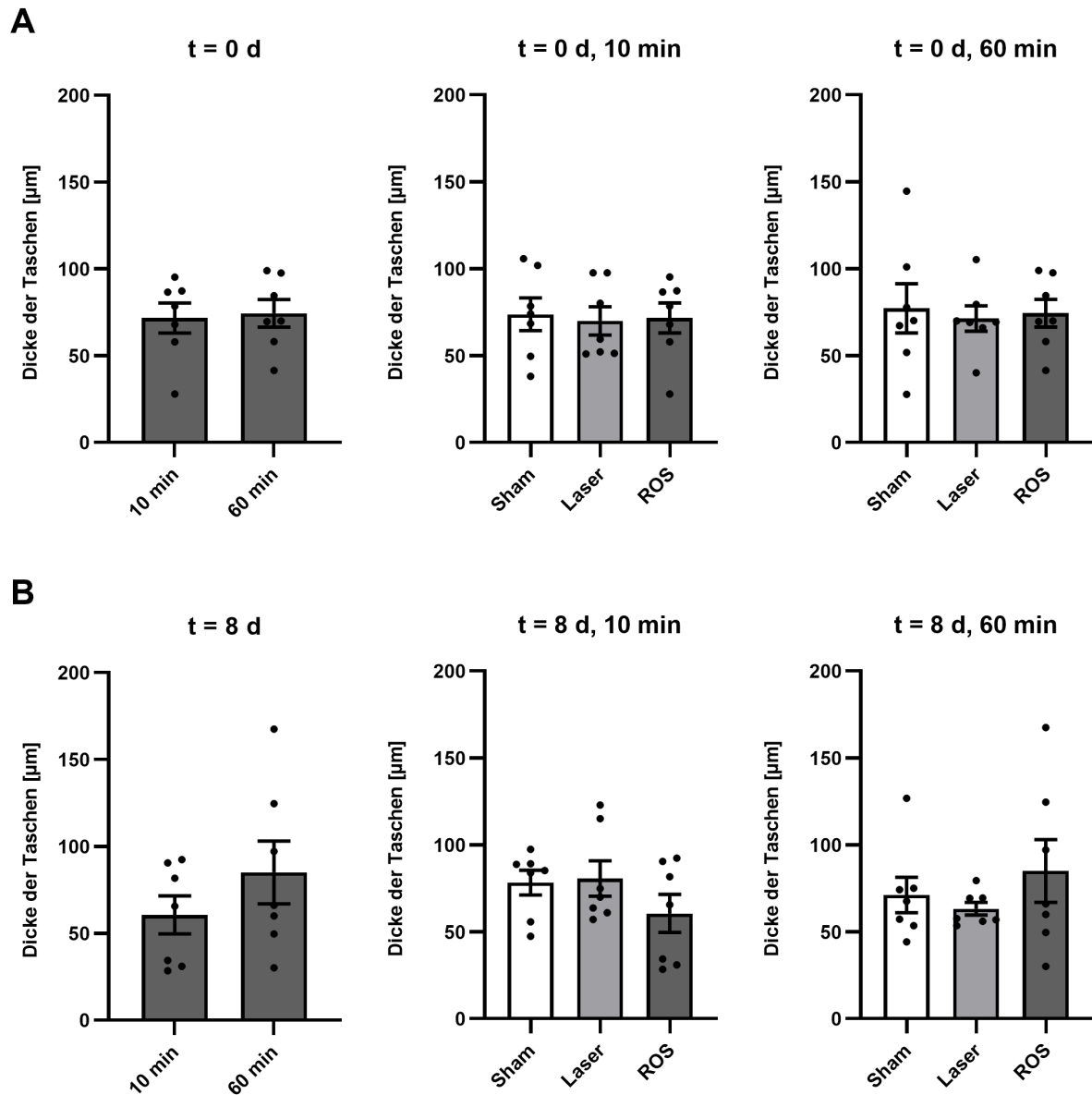


Abb. 18: Dicke der Taschen

Abgebildet ist die durchschnittliche Dicke der Taschen der Aortenklappe in μm direkt nach der Intervention ($t = 0 \text{ d}$) (**A**) und acht Tage später ($t = 8 \text{ d}$) (**B**). Neben dem direkten Vergleich zwischen den ROS-Gruppen wurden auch die Ergebnisse der Kontrollgruppen, mit denen der ROS-Gruppe verglichen. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen ergaben sich zu keinem Zeitpunkt. Dargestellt sind $M \pm SEM$ ($n = 7$), statistisch getestet wurde mit dem Mann-Whitney- (**A**) und dem Kruskal-Wallis-Test (**B**).

Das Gewebe der Kommissuren erschien insgesamt aufgelockert und grenzte sich morphologisch von der Tasche und dem Anulus ab (Abb. 17B). Die Strukturen waren zumeist gleichmäßig und ohne Auffälligkeiten. Am Übergang zum Anulus zeigten sich in der Kommissur vakuolenartige Strukturen (Abb. 19). Hierbei handelte es sich um blasige, nicht angefärbte oder eher basophile Strukturen.

Teilweise wurden Zellkerne angeschnitten, welche vor allem randständig lagen. Die Vakuolen zeigten sich unabhängig von der durchgeführten Intervention in allen Behandlungsgruppen.

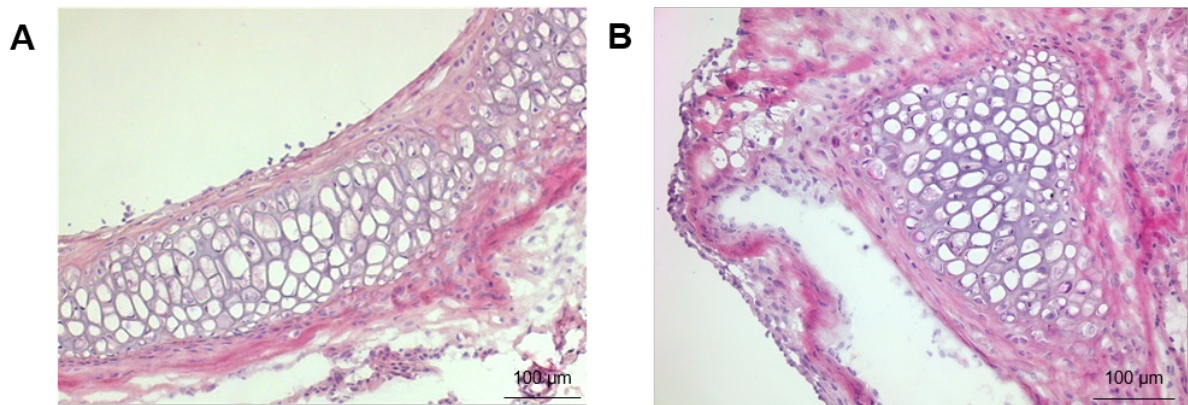


Abb. 19: Vakuolen in Anulus und Kommissuren in HE-Färbung

Dargestellt sind blasige Strukturen im Anulus (A) und der Kommissurenregion (B). Diese sind entweder gar nicht angefärbt oder eher basophil und weisen teilweise randständige Zellkerne auf.

Am Anulus, der ein Teil der Aorta darstellt, ließ sich klar die Media mit ihrer Vielzahl an kollagenen Fasern abgrenzen. Auch die daran angrenzende Adventitia konnte dargestellt werden. Die schmale Intima mit ihrer Endothelschicht ließ sich in der HE-Färbung meist nur erahnen (Abb. 17C). Der Anulus stellte sich zumeist gleichmäßig dar. Teilweise wurden Gebiete mit Vakuolen angeschnitten (Abb. 19A). Insgesamt fiel auf, dass sich die Vakuolen in Anulus und Kommissur eher am proximalen Ende der Klappe befanden.

Die oben beschriebenen Auffälligkeiten zeigten sich unabhängig von den verschiedenen Interventionen in allen Behandlungsgruppen. Darüber hinaus ergab sich zu keinem Zeitpunkt ein Hinweis auf eine intravalvuläre Thrombenbildung.

Lediglich die Aortenklappe eines ROS-Tieres, welches acht Tage nach der Laserbestrahlung untersucht wurde, stellte hier eine Ausnahme dar. Es zeigte sich eine generalisierte Verdickung an den lateralen Anteilen der Taschen. In diesem Bereich war in der dazugehörigen VCAM-1-Färbung eine inflammatorische Aktivität zu erkennen. Darüber hinaus fiel ein Aufbrechen der Media und eine Zellvermehrung im Bereich der Intima auf. In der analogen VCAM-1-Färbung zeigte sich unterhalb der Intimaverdickung in der Adventitia ein VCAM-1-positives Areal. Eine ähnliche Beobachtung konnte in einer Aortenklappe der Laser-Gruppe gemacht werden, welche acht Tage nach einer 10-minütigen Intervention untersucht wurde.

3.4.2 Oxidativer Stress

Um zu untersuchen, ob es unterschiedliche Manifestationsorte des oxidativen Stresses gibt, wurden die drei separat auf 8-OHdG analysierten Klappenstrukturen Tasche, Kommissur und Anulus miteinander verglichen.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Klappenstrukturen in den Sham- (Abb. 20A) und ROS-Gruppen (Abb. 20C). Während in den Sham-Gruppen in zwei Versuchsbedingungen der

oxidative Stress in den Taschen signifikant größer war als im Anulus (Abb. 20; Sham t = 8 d 10 min: $0,541 \pm 0,083$ vs. $0,426 \pm 0,061$ mit $p \leq 0,05$; Sham t = 0 d 60 min: $0,362 \pm 0,029$ vs. $0,323 \pm 0,025$ mit $p \leq 0,01$), zeigte sich acht Tage nach einer 60-minütigen PDR in der ROS-Gruppe mehr oxidativer Stress in den Kommissuren als im Anulus (Abb. 20 + Abb. 23; ROS t = 8 d 60 min: $0,502 \pm 0,084$ vs. $0,447 \pm 0,074$ mit $p \leq 0,05$). Nach einer 10-minütigen PDR war der oxidative Stress in den ROS-Gruppen ebenfalls in den Taschen größer als im Anulus (Abb. 20 + Abb. 21 + Abb. 22; ROS t = 0 d 10 min: $0,541 \pm 0,045$ vs. $0,445 \pm 0,033$ mit $p \leq 0,01$; ROS t = 8 d 10 min: $0,595 \pm 0,058$ vs. $0,440 \pm 0,028$ mit $p \leq 0,01$). In den übrigen und den Laser-Gruppen ergaben sich keine regionalen Unterschiede.

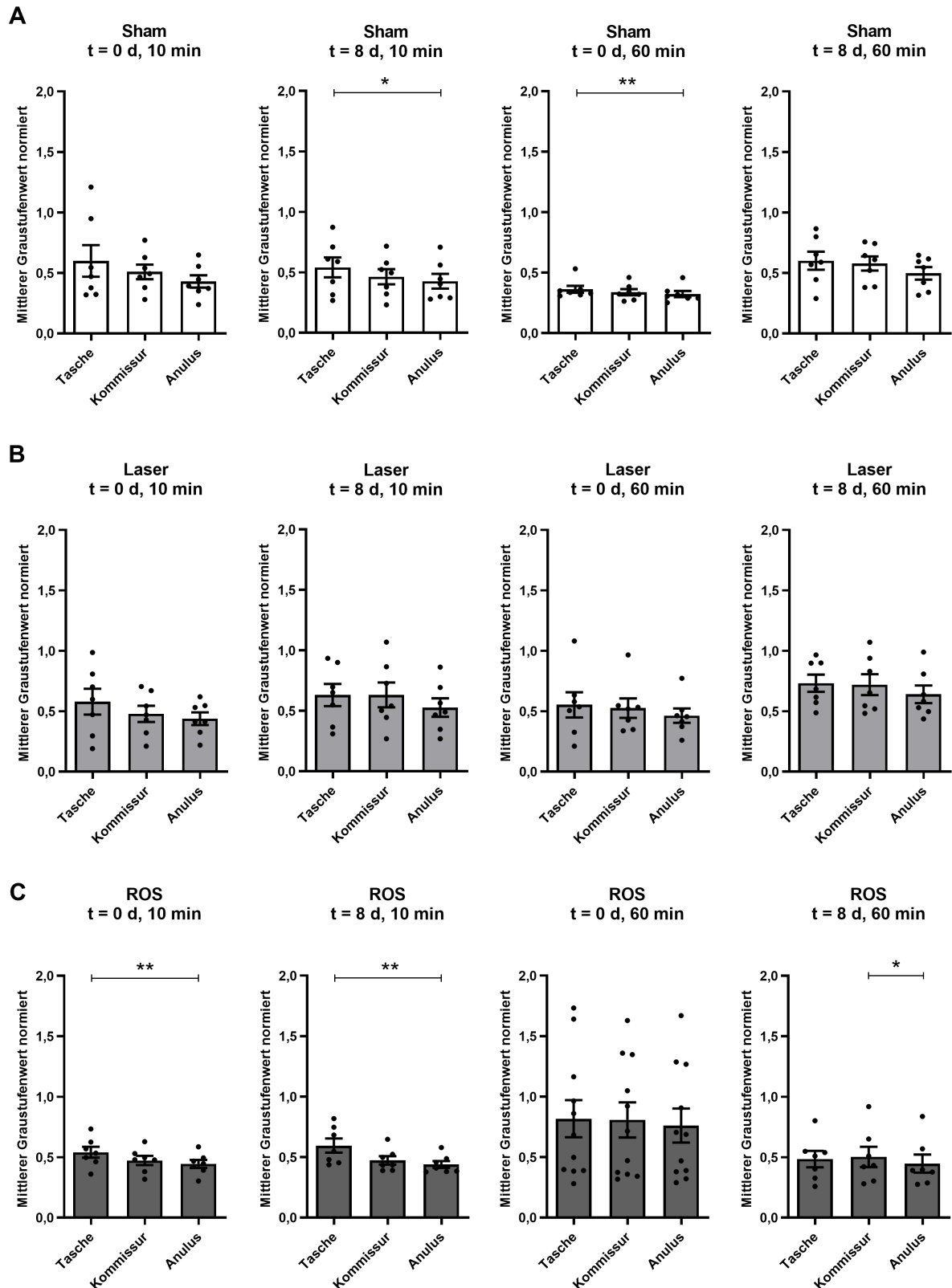


Abb. 20: Vergleich des generierten oxidativen Stresses in unterschiedlichen Klappenstrukturen

Abgebildet ist der nachgewiesene oxidative Stress in Tasche, Kommissur und Anulus der Aortenklappe nach den Interventionen. Gemessen wurde der mittlere Graustufenwert in 8-OHdG-Fluoreszenzfärbungen. Aufgetragen sind die Messwerte der Sham- (A), Laser- (B) und ROS-Gruppe (C) direkt (t = 0 d) nach einer 10-minütigen bzw. 60-minütigen Bestrahlung und nach acht Tagen (t = 8 d). Dargestellt sind $M \pm SEM$ (n = 7) normiert auf die Positivkontrolle, statistisch getestet wurde mit dem Friedman-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

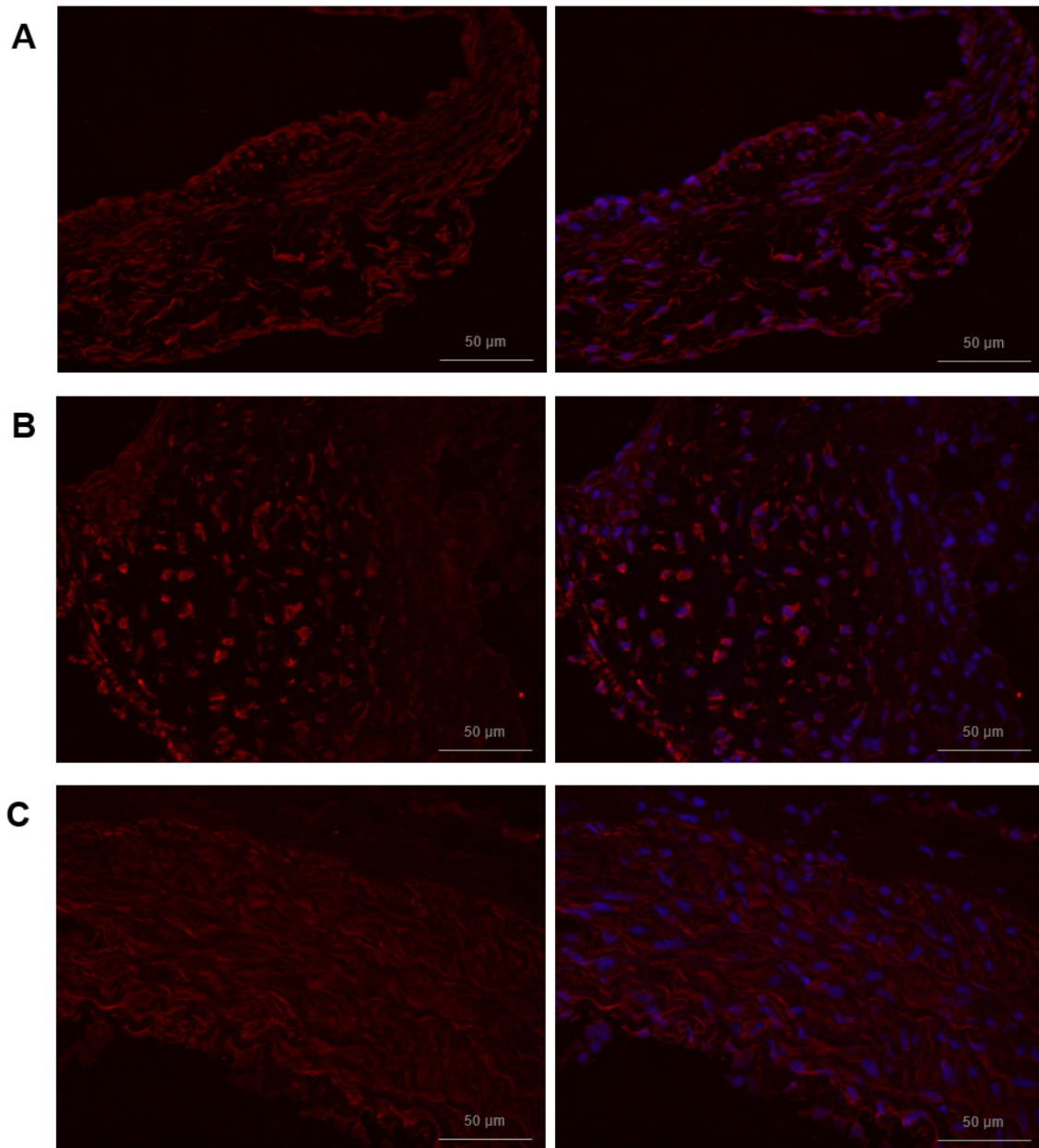


Abb. 21: Oxidativer Stress in verschiedenen Klappenstrukturen nach 10-minütiger PDR

Dargestellt sind die Ergebnisse der 8-OHdG-Färbung der ROS-Tiere nach 10-minütiger Bestrahlung zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d anhand von repräsentativen Beispielbildern der Tasche (A), der Kommissur (B) und des Anulus (C). In der linken Spalte ist das 8-OHdG-Signal in Rot zu sehen. Die rechte Spalte zeigt das 8-OHdG-Signal kombiniert mit dem blauen DAPI-Signal.

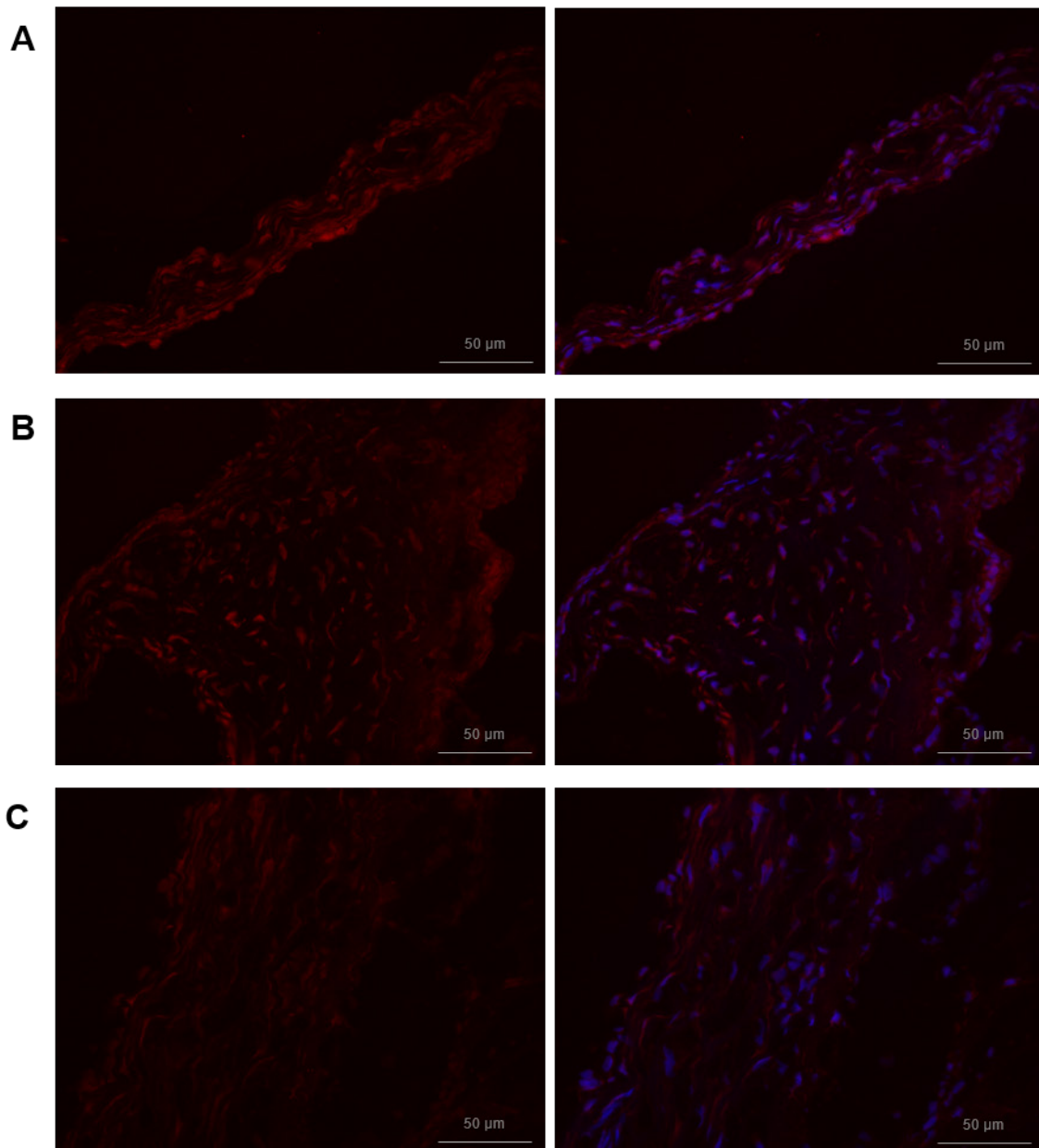


Abb. 22: Oxidativer Stress in verschiedenen Klappenstrukturen acht Tage nach 10-minütiger PDR

Dargestellt sind die Ergebnisse der 8-OHdG-Färbung der ROS-Tiere acht Tage nach 10-minütiger Bestrahlung anhand von repräsentativen Beispielen der Tasche (**A**), der Kommissur (**B**) und des Anulus (**C**). In der linken Spalte ist das 8-OHdG-Signal in Rot zu sehen. Die rechte Spalte zeigt das 8-OHdG-Signal kombiniert mit dem blauen DAPI-Signal.

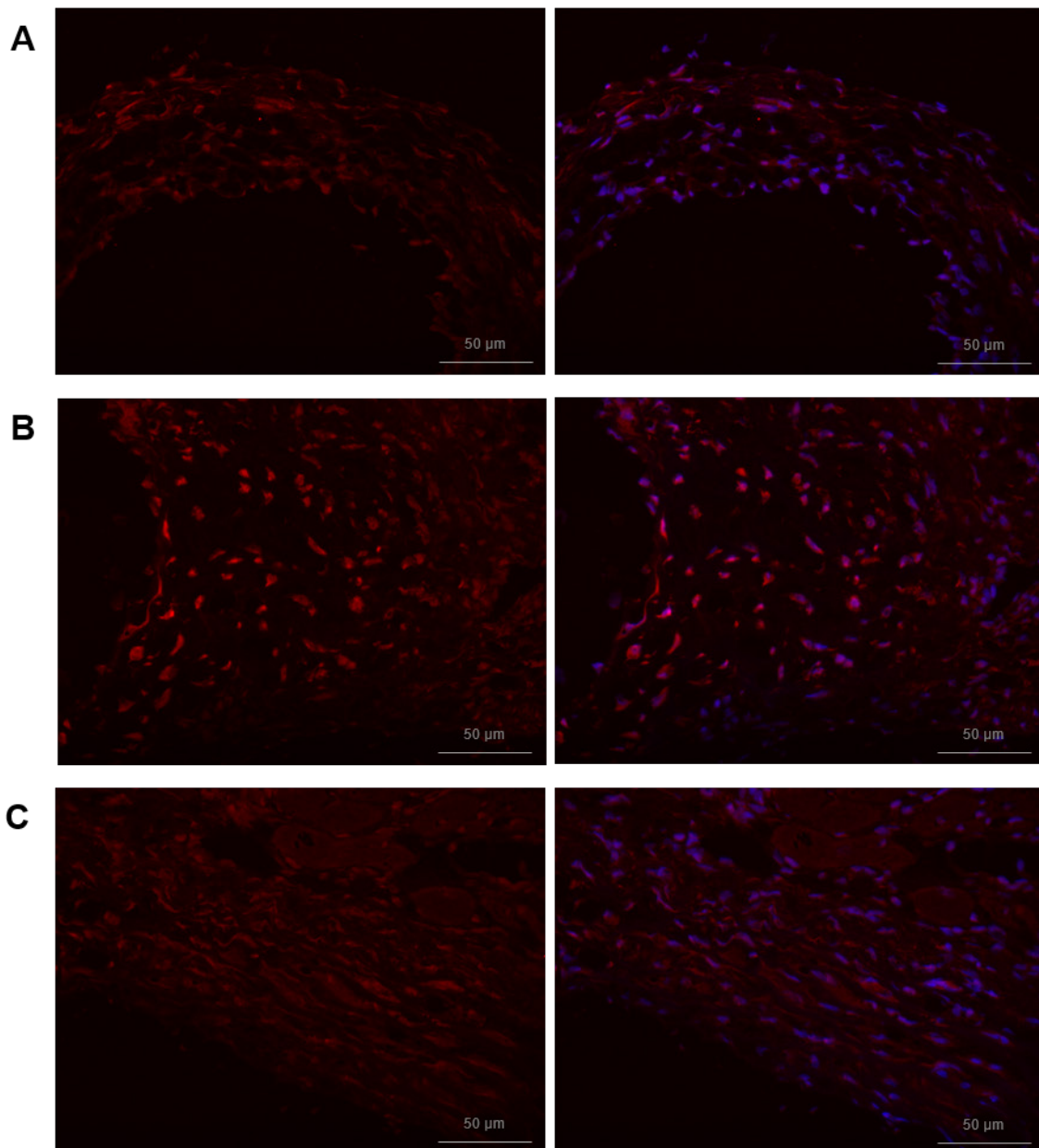


Abb. 23: Oxidativer Stress in verschiedenen Klappenstrukturen acht Tage nach 60-minütiger PDR

Dargestellt sind die Ergebnisse der 8-OHdG-Färbung der ROS-Tiere acht Tage nach 60-minütiger Bestrahlung anhand von repräsentativen Beispielbildern der Tasche (A), der Kommissur (B) und des Anulus (C). In der linken Spalte ist das 8-OHdG-Signal in Rot zu sehen. Die rechte Spalte zeigt das 8-OHdG-Signal kombiniert mit dem blauen DAPI-Signal.

3.4.3 Inflammatorische endotheliale Aktivierung

Um zu untersuchen, inwieweit sich inflammatorische Prozesse im Rahmen der PDR an unterschiedlichen Stellen in der Klappe manifestieren, wurden die erhobenen Daten hinsichtlich der jeweiligen Klappenstruktur untersucht.

In den Sham- und Laser-Gruppen ergaben sich zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der VCAM-1-Expression an den verschiedenen Klappenstrukturen (Abb. 24A+B). Eine 10-minütige Bestrahlung führte in den ROS-Gruppen ebenfalls zu keinem Unterschied (Abb. 24C). Nach einer Bestrahlungsdauer

von 60 Minuten zeigte sich zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d ein signifikanter Unterschied zwischen Tasche und Anulus (Abb. 24C; ROS t_0 60 min: $0,929 \pm 0,162$ vs. $1,810 \pm 0,355$; $p \leq 0,05$). Der gemessene VCAM-1-Score im Bereich der Taschen entspricht einzelnen punktförmigen Arealen. Verglichen damit zeigten sich im Anulusbereich auch flächige Areale positiv.

Betrachtet man VCAM-1-positive Areale allein in den Taschen, so fallen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen auf. Positive Areale befinden sich überwiegend auf der ventrikulären Seite der Tasche, vereinzelt auch auf aortaler Seite oder beidseitig. In den Klappen, in denen sich ein VCAM-1-positives Areal nur auf der aortalen Seite zeigte, konnten morphologische Auffälligkeiten in der HE-Übersichtsfärbung gesehen werden. Diese Auffälligkeiten werden im Abschnitt 3.4.1 näher erläutert.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass direkt nach ($t = 0$ d) einer 60-minütigen Bestrahlung in den ROS-Gruppen Unterschiede in der Lokalisation von beginnenden inflammatorischen Prozessen festgestellt werden konnten. Eine inflammatorische endotheliale Aktivierung findet sich vorwiegend in den Anuli und ist hier deutlich stärker ausgeprägt als in den Taschen.

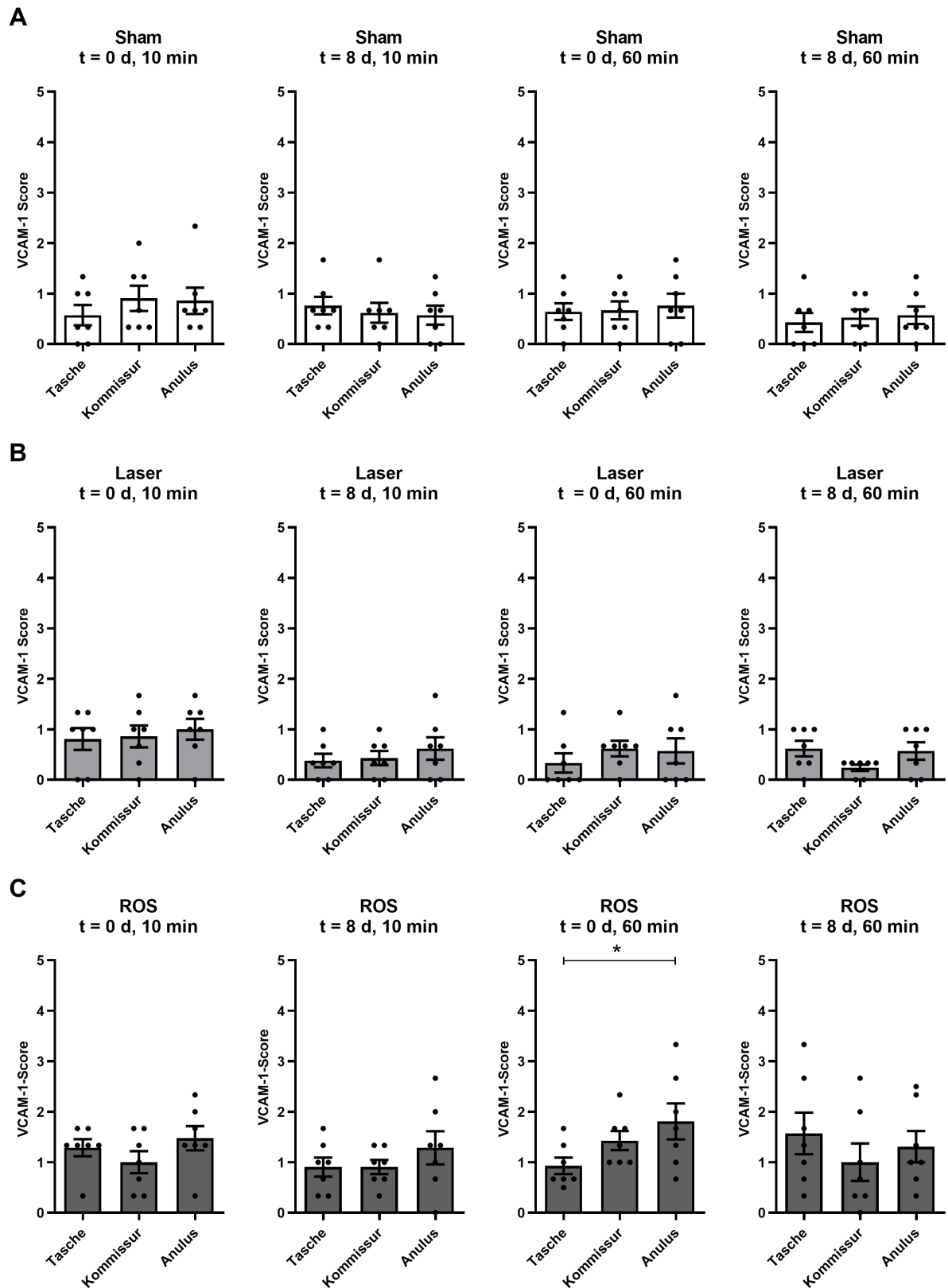


Abb. 24: Vergleich der endothelialen inflammatorischen Aktivität in verschiedenen Klappenstrukturen

Verglichen wurde die VCAM-1-Expression an Tasche, Kommissur und Anulus. Diese wurde mithilfe des VCAM-1-Scores in immunhistochemischen Färbungen ermittelt. Aufgetragen sind die Messwerte der Sham- (A), Laser- (B) und ROS-Gruppe (C) direkt nach einer 10-minütigen bzw. 60-minütigen Bestrahlung und nach acht Tagen. Dargestellt sind $M \pm SEM$ ($n = 7$), statistisch getestet wurde mit dem Friedman-Test: * $p \leq 0,05$.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Modells der Aortenklappenstenose auf der Grundlage der PDR, welches die wesentlichen frühen pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung möglichst realitätsnah abbildet.

Morphologisch unterschieden sich die Klappen nach der PDR weder signifikant hinsichtlich der Taschendicke noch ergaben sich zu irgendeinem Zeitpunkt andere strukturelle Auffälligkeiten in den Behandlungsgruppen.

Die Analysen des oxidativen Stresses und der inflammatorischen Reaktion nach PDR zeigten sowohl signifikante Unterschiede bezogen auf die Bestrahlungsdauer als auch im Zeitverlauf. Eine 60-minütige Bestrahlungsdauer führte nicht nur zu signifikant mehr oxidativem Stress verglichen mit einer 10-minütigen Bestrahlungsdauer, sondern auch im Vergleich zur Sham-Kontrollgruppe. Acht Tage nach der Intervention normalisierte sich dieses Stressniveau nach 60-minütiger Bestrahlung wieder signifikant im Vergleich zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d. Die inflammatorische endotheliale Aktivierung war nach 60-minütiger Bestrahlung in den ROS-Gruppen zu jedem Zeitpunkt größer als in den Laser-Gruppen.

Darüber hinaus ergaben sich in diesen Untersuchungen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Klappenstrukturen. Acht Tage nach einer 60-minütigen Bestrahlung war der oxidative Stress in der Kommissur signifikant größer als im Anulus, wogegen in den Sham-Kontrollgruppen der oxidative Stress in den Taschen größer als im Anulus war. Nach einer 60-minütigen PDR zeigte sich im Anulus zum Explantationszeitpunkt $t = 0$ d eine signifikant größere inflammatorische endotheliale Aktivierung verglichen mit der Tasche.

Eine vermehrte apoptotische Aktivität konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

4.1 Analyse einer nativen Aortenklappe und Einordnung der morphologischen Auffälligkeiten in der Übersichtsfärbung

Die Querschnitte der Aortenklappe des in der Arbeit beschriebenen Rattenmodells lassen sich gut mit der humanen Anatomie der Aortenklappe in Einklang bringen (2, 5). Es stellten sich die in Abb. 1 gezeigten Strukturen, wie der *Sinus valsalvae*, die Tasche, der Anulus und die Kommissurenregion dar (vgl. Abb. 1 + Abb. 17).

Je nach Anschnitthöhe zeigten sich darüber hinaus Verdickungen im medialen Anteil der Taschen, welche dem *Nodulus valvae semilunaris* entsprechen (vgl. Abb. 17D und (2, 5, 6)). Insgesamt ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Taschendicke zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und im zeitlichen Verlauf (vgl. Abb. 18). Ein Kennzeichen der DAVD, die Klappenverdickung, konnte in diesem Modell nach einer Nachbeobachtungszeit von acht Tagen demnach nicht nachgewiesen werden (25). Da ein struktureller Umbau der Aortenklappe nach dieser Zeitspanne noch nicht zu erwarten ist, sind Langzeituntersuchungen mit Bestimmung der Klappendicke notwendig.

Obwohl das Taschengewebe der Ratten keinen klaren dreischichtigen Aufbau aufweist, können anhand der HE-Übersichtsfärbung Regionen, die der humanen *Lamina fibrosa* und *Lamina spongiosa*

entsprechen, nachvollzogen werden (79). Morphologisch stellte sich die *Lamina fibrosa* auf aortaler Seite dicht und eher eosinophil dar (vgl. Abb. 17A). Hier waren in der HE-Färbung auch Kollagenfasern erkennbar (8). Im Gegensatz dazu war die aufgelockerte und basophile *Lamina spongiosa* abzugrenzen (vgl. Abb. 17A).

Mazzone et al. untersuchten histologische Auffälligkeiten in humanen Aortenklappen mit hochgradiger Aortenklappenstenose (24). Hierbei fielen schon in der Übersichtsfärbung Regionen mit Kalzifizierungen, Ossifikationen und Neovaskularisation sowie massive inflammatorische Infiltrate auf (24). Diese Ausprägungen konnten in der vorliegenden Arbeit zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (vgl. 3.4.1). Somit kann davon ausgegangen werden, dass direkt nach der Behandlung bzw. acht Tage später noch keine hochgradige Veränderung an der Aortenklappe ausgelöst wird, die zu einem signifikanten Strukturumbau an der Klappe führt. Einige geringe Veränderungen fielen allerdings auf und werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

Bei zwei Tieren, deren Aortenklappen acht Tage nach einer 10- bzw. 60-minütigen Bestrahlung (Laser-Gruppe: 10-minütige Bestrahlung, ROS-Gruppe: 60-minütige Bestrahlung) untersucht wurden, zeigten sich auffällige Verdickungen des Taschengewebes (vgl. 3.4.1). Da dies nur in zwei Tieren beobachtet wurde, kann in dieser Arbeit nicht belegt werden, dass diese Beobachtungen ein Resultat der Intervention sind. Es ist durchaus möglich, dass die dickeren Anteile der Tasche in diesen beiden Tieren lediglich durch den Anschnittwinkel der Tasche zustande kamen oder dass es sich um physiologische Verdickungen der Tasche an dieser Stelle handelt (92). Dennoch ist auffällig, dass sich in den VCAM-1-Färbungen an den entsprechenden Stellen positive Areale zeigen. Diese waren in den beiden Klappenquerschnitten auf der aortalen Seite der Tasche zu finden. Dies ist insofern besonders, da ein Großteil der VCAM-1-positiven Areale im beschriebenen Versuchsaufbau auf der ventrikulären Seite zu finden waren (vgl. 3.4.3). Allgemein ist bekannt, dass Scherstress ein wichtiger Faktor für die vermehrte endotheliale Expression von VCAM-1 ist (23, 93). Darüber hinaus konnten verschiedene Untersuchungen zeigen, dass der Scherstress aufgrund der Hämodynamik des Blutes am ventrikulären Endothel größer ist, als auf der aortalen Seite der Taschen der Aortenklappen (18–20). Vor diesem Hintergrund erscheint eine vermehrte VCAM-1-Expression auf der aortalen Seite der Taschen acht Tage nach der Intervention außergewöhnlich. Eine ähnliche Besonderheit war darüber hinaus am Anulus der gleichen Klappe zu sehen. Die Faserstruktur der aortalen Media schien an mehreren Stellen aufgebrochen und es zeigten sich Zellvermehrungen im Bereich der Intima. Auch hier sind in der VCAM-1-Färbung unterhalb von diesen in der HE-Färbung auffälligen Bereichen positive Areale zu sehen (vgl. 3.4.1). Da diese Beobachtung zum einen nach einer 10-minütigen Laserbehandlung und zum anderen nach einer 60-minütigen ROS-Behandlung gemacht wurde, ist es unwahrscheinlich, dass hier die Produktion von ROS im Rahmen der photodynamischen Reaktion verantwortlich gemacht werden kann. Vielmehr könnte eine mechanische Verletzung des Gewebes durch die Laserfaser ursächlich sein (25). Um eine abschließende Beurteilung treffen zu können, bedarf es an dieser Stelle weiterer Untersuchungen.

Eine weitere Auffälligkeit betraf die proximalen Abschnitte der Aortenklappe. Im Bereich der *Spatia intervalvularis* zeigten sich in der Übersichtsfärbung durch alle Behandlungsgruppen hinweg vakuolenartige Veränderungen (siehe 3.4.1 und Abb. 19). Ähnliche Veränderungen wurden bereits von Assmann et al. beschrieben. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass lipidhaltigen Vakuolen abhängig vom Futterregime auftreten, persistieren und nach mehreren Wochen Prädilektionsstellen für den osteochondrogenen Umbau an der Klappe sein können (80). Diese Beobachtung wurde allerdings nur bei Tieren gemacht, die hochdosiert mit Vitamin D, 2 % Cholesterol und 1,5 % Phosphat gefüttert wurden. Tiere, deren Futter das hochdosierte Vitamin D fehlte, entwickelten zwar ebenfalls Vakuolen, diese verschwanden allerdings nach spätestens acht Wochen und es resultierte keine Kalzifizierung an den zurückgebliebenen Stellen in der Aortenklappe (80). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde dem Futter lediglich Cholesterol und Phosphat zugesetzt. In der Übersichtsarbeit von Buetow und Laflamme werden diese Vakuolen als Verknorpelung beschrieben (79). Es sind daher weitere Untersuchungen auf Marker der osteochondrogenen Differenzierung notwendig, um genaue Aussagen über die Herkunft des Gewebes treffen zu können. Darüber hinaus wird sich erst in Langzeitversuchen zeigen, ob sich die beobachteten Vakuolen wie bei Assmann et al. im Verlauf zurückbilden oder in den ROS-Gruppen Prädilektionsstellen für kalzifizierende Prozesse darstellen.

Eine mögliche Erklärung für die Lokalisation der Vakuolen im Bereich des *Spatia intervalvularis* ist der höhere Scherstress in diesem Bereich (4). Mechanischer Stress führt zu einer Schädigung des Endothels, sodass Lipoproteine, wie das LDL lokal in das Gewebe gelangen (13, 27, 28, 94). Da die Vakuolen in allen Behandlungsgruppen auftraten, kann das Vorkommen als Resultat des erhöhten Scherstress und des dem Futter zugesetzten Cholesterols interpretiert werden.

Zusammenfassend zeigen sich keine signifikanten Häufungen von morphologischen Auffälligkeiten in den einzelnen Behandlungsgruppen, sodass nach einer Zeitspanne von acht Tagen nach der beschriebenen Intervention noch nicht von einem strukturellen Umbau des Klappengewebes ausgegangen werden kann. Die vereinzelt aufgetretenen morphologischen Auffälligkeiten allein lassen keinen Rückschluss auf die Wirksamkeit der PDR im Hinblick auf eine Entwicklung der DAVD zu. Sie liefern lediglich Hinweise auf mögliche beginnende Veränderungen und können erst im Zusammenhang mit Langzeitversuchen eingeordnet werden.

4.2 Oxidative Effekte der photodynamischen Therapie an der Aortenklappe

Minol et al. zeigten, dass mithilfe eines endovaskulären Grünlichtlasers und dem Photosensibilisator Bengalrot eine lokale ROS-vermittelte Degeneration an Gefäßen induziert werden kann (85). In der Atheroskleroseforschung konnte der Einfluss von oxidativem Stress auf die Pathophysiologie von Gefäßerkrankungen bereits gezeigt werden (26, 60, 95). Im Krankheitsprozess von arteriellen Gefäßerkrankungen und der DAVD scheinen ähnliche Faktoren eine Rolle zu spielen (26, 33). Dennoch sind die Mechanismen im Detail verschieden (13, 26).

Die durchgeführten Untersuchungen hatten daher zum Ziel an einem neuen Tiermodell zu zeigen, welche Rolle oxidativer Stress isoliert, lokal an der Aortenklappe und in vivo an der Entwicklung der

DAVD hat. Zur Entwicklung des Tiermodells war es notwendig eine geeignete Bestrahlungsdauer der Aortenklappe zu finden, nach der eine signifikante Menge an oxidativem Stress entsteht und die möglichst nebenwirkungsarm ist. Hierzu wurden die Aortenklappen von Ratten entweder 10 oder 60 Minuten lang bestrahlt, nachdem diesen 24 Stunden vorher Temoporfin injiziert wurde. Anschließend wurden durch oxidativen Stress entstandene DNA-Schäden mithilfe von 8-OHdG gemessen, die inflammatorische endotheliale Aktivierung anhand der VCAM-1-Expression beurteilt und apoptotische Mechanismen mithilfe der *Cleaved Caspase 3*-Bestimmung detektiert.

4.2.1 Analyse der Nebenwirkungen der photodynamischen Reaktion im dargestellten Tiermodell

Für die erfolgreiche Etablierung des Tiermodells in dieser Arbeit sollten zwei Grundvoraussetzungen erfüllt sein: Zum einen müssen Nebenwirkungen ausgeschlossen werden, die nicht in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung einer DAVD stehen. Zum anderen müssen die dargestellten Ergebnisse möglichst zweifelsfrei auf ROS zurückgehen und nicht durch die physikalischen Effekte des Lasers bedingt sein.

Im PDR-Modell der Aorta von Minol et al. bildeten sich nach der Intervention lokal Thromben (85). Aufgrund dieser beschriebenen Nebenwirkung wurde in der vorliegenden Arbeit allen Tieren vor der Intervention 300 IE/kg Heparin-Natrium appliziert. Histologisch zeigte sich nach der Bestrahlung unabhängig von der Bestrahlungsdauer kein Hinweis auf eine Thrombenbildung im Bereich der Aortenklappe (vgl. 3.4.1).

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse in dieser Arbeit tatsächlich auf durch PDR entstandene ROS zurück gehen und nicht allein durch die physikalische Energie des Lasers bedingt sind, können sich Marker der Apoptose zunutze gemacht werden.

Laserstrahlung allein kann abhängig von Energie- und Leistungsdichte zu apoptotischen Mechanismen im Gewebe führen (44, 85, 96). Dieses Ausmaß der Gewebeschädigung war in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht gewünscht, da die Apoptose in der Pathophysiologie der DAVD erst in späten Erkrankungsstadien eine Rolle spielt (97–100). Die Ergebnisse zeigen weder in den Laser- noch in den ROS-Gruppen nach 10- oder 60-minütiger Intervention und zu keinem Zeitpunkt eine apoptotische Aktivität im Klappengewebe (vgl. 3.2.3). Es ist also davon auszugehen, dass durch den physikalischen Effekt der Laserbestrahlung in keiner Behandlungsgruppe ein direkter Zelluntergang provoziert wurde. Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass ein Tiermodell entwickelt werden konnte, welches ohne schwerwiegende vaskuläre Nebenwirkungen auskommt und zu keinem direkten Zelluntergang an der Aortenklappe führt.

4.2.2 Analyse der alleinigen Laserwirkung

Szacilowski et al. beschreiben fünf Interaktionsmechanismen zwischen Laserstrahlung und dem Gewebe, welche abhängig von der Energiedichte und der Leistungsdichte sind: die photochemische Reaktion, die Koagulation, die Vaporisation, die Photoablation und die Photodestruktion (44). In den

oben beschriebenen Versuchen wurde mit einem Laser gearbeitet, der eine Leistungsdichte von $0,1 \text{ W/cm}^2$ und Energiedichten von 60 J/cm^2 bzw. 360 J/cm^2 aufwies. Damit bewegen sich die Effekte des verwendeten Lasers im Rahmen der photochemischen Reaktion (Abb. 25). Treffen Laserstrahlen der entsprechenden Wellenlänge auf endogene Photosensibilisatoren können auch ohne die Zugabe von Temoporfin lokal ROS generiert werden (vgl. 1.3.1).

In der vorliegenden Arbeit konnte auch in den Tieren, die keinen Photosensibilisator erhielten (Laser-Gruppe) oxidativer Stress nachgewiesen werden (siehe Abb. 8B/C). Der entstandene oxidative Stress nach einer 60-minütigen Bestrahlung zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den beiden anderen Versuchsgruppen.

Kvam et al. untersuchten DNA-Schäden, die durch eine PDR mit dem Photosensibilisator der ersten Generation Photofrin II ausgelöst wurden (101). Die Untersuchungen erfolgten hierbei im Gegensatz zu den Versuchen in der vorliegenden Arbeit *in vitro* an Zellkulturen (101). Photofrin II reichert sich ähnlich wie Temoporfin an der nukleären Membran an ohne in den Zellkern selbst zu gelangen (101). Analog zu den oben beschriebenen Versuchen nutzten auch Kvam et al. eine Kontrollgruppe, welche bestrahlt wurde ohne einen Photosensibilisator zu erhalten (101). Hierbei zeigten sich keine vermehrten DNA-Schäden, die über die physiologisch auftretenden Schäden hinaus gehen (101). Die *in vivo*-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen also mit den *in vitro*-Untersuchungen von Kvam et al. weitestgehend überein und können durch die Erkenntnisse der Biophysik gut erklärt werden.

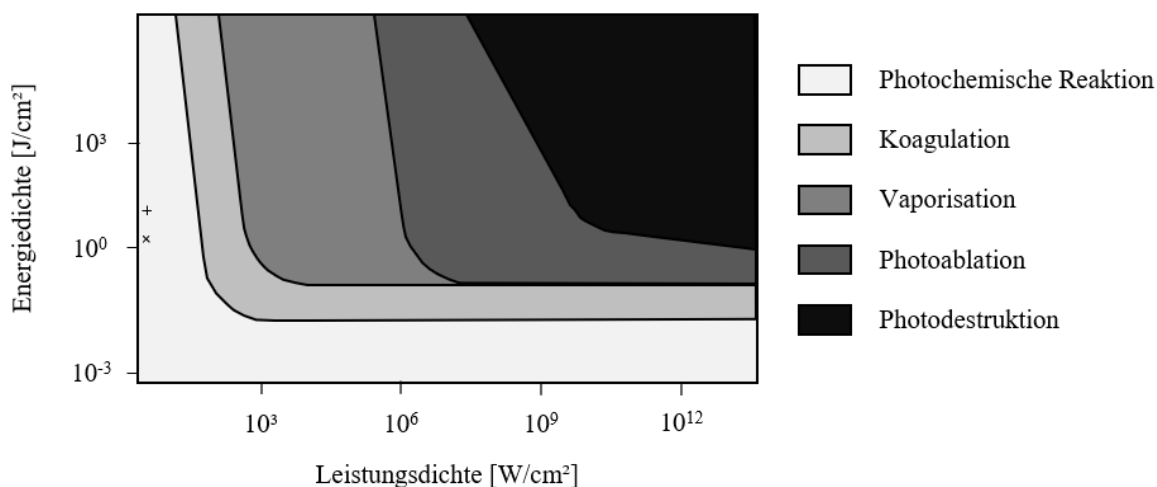


Abb. 25: Interaktionsmechanismen von Laserstrahlung und Gewebe, angelehnt an Szacilowski et al. (44)

Trifft Laserstrahlung auf ein Gewebe, so gibt es verschiedene Möglichkeiten der Interaktion. Diese sind abhängig von der Leistungsdichte und Energiedichte des Lasers und reichen von der photochemischen Reaktion bis zur Destruktion des Gewebes durch hohe Energien. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es im Rahmen der PDR eine photochemische Reaktion an der Aortenklappe hervorzurufen. Die Eigenschaften des Lasers über eine Bestrahlungsdauer von 10 bzw. 60 Minuten sind aufgetragen (x: Bestrahlungsdauer 10 Minuten, $0,1 \text{ W/cm}^2$, 60 J/cm^2 ; +: Bestrahlungsdauer 60 Minuten, $0,1 \text{ W/cm}^2$, 360 J/cm^2).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass im vorliegenden Tiermodell oxidativer Stress an den Aortenklappen im Rahmen der PDR entsteht. Wie groß der Anteil der alleinigen biophysikalischen

Reaktion durch die Laserenergie ist, kann auf der Grundlage der Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden.

4.2.3 Analyse des durch PDR generierten oxidativen Stresses

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mithilfe der PDR oxidativer Stress lokal an der Aortenklappe generiert werden kann. Hierbei führte eine längere Bestrahlungsdauer zu signifikant größerem oxidativem Stress.

Es ist bekannt, dass im Rahmen der PDR oxidativer Stress in Form der ROS $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}^{\cdot}$ und H_2O_2 entsteht (41, 42, 44, 47, 51, 52, 60). Diese geben Elektronen an Verbindungen in der Umgebung ab und greifen so in den Zellmetabolismus ein (60). Im Rahmen der PDR mit Temoporfin entsteht neben anderen ROS das reaktive Agens $^1\text{O}_2$ (49). Dieses kann die Nukleinbase Guanin in Mitochondrien und im Zellkern oxidativ modifizieren, wodurch 8-OHdG entsteht (91).

Bereits Martinet et al. nutzten den ROS-Marker 8-OHdG in einem Atherosklerosemodell in Kaninchen (102). Hier konnten sie zeigen, dass eine Hypercholesterinämie zu einem vermehrten Nachweis von 8-OHdG in der Plaqueregion führte (102). Als Ursache dafür nahmen sie vermehrten oxidativen Stress an (102). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe des indirekten ROS-Markers 8-OHdG gezeigt werden, dass oxidativer Stress im untersuchten Tiermodell entsteht. Darüber hinaus zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Bestrahlungsdauer der Aortenklappe und dem erzeugten oxidativen Stress. Eine Bestrahlungsdauer von 60 Minuten führte zum Zeitpunkt $t = 0$ d zu signifikant mehr oxidativem Stress in Form von nukleären DNA-Schäden als eine Bestrahlungsdauer von 10 Minuten (Abb. 8A).

Der *in vivo*-Nachweis von oxidativem DNA-Schaden nach PDR mit Temoporfin in der vorliegenden Arbeit deckt sich sowohl mit den Erkenntnissen von Kvam et al. am Zellkulturmodell mit Photofrin II (101) als auch mit den Ausführungen von Chakraborty et al (103) und Rubio et al. (104). Auch hier führte die PDR zu DNA-Schäden an den untersuchten Zellen. Eine Bestrahlungsdauer von 60 Minuten wurde darüber hinaus auch von Minol et al. in den PDR-Versuchen mit Bengalrosa an der Aorta verwendet (85). Hier wurde oxidativer Stress ebenfalls indirekt durch die Anfärbung von 3-Nitrotyrosin nachgewiesen (85).

Neben der zellkernspezifischen Wirkung der PDR mit Temoporfin wird in der Literatur eine Beeinflussung der Mitochondrien beschrieben (49, 105). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zielten auf die nukleäre Detektion von 8-OHdG ab. Dennoch konnte vereinzelt auch extranukleär 8-OHdG nachgewiesen werden (Abb. 21, Abb. 22, Abb. 23). Ob es sich hierbei um ROS in Mitochondrien handelt, kann auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit nicht gesagt werden.

Innerhalb der ROS-Gruppe treten große Schwankungen in der Ausprägung des oxidativen Stresses zwischen den einzelnen Versuchstieren auf (vgl. Abb. 8A). Ein Erklärungsversuch liefert die Betrachtung der Pharmakokinetik des Temoporfins. Obwohl ein DNA-Schaden nach PDR in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden konnte (106, 107), wurde Temoporfin auf subzellulärer Ebene bisher nicht direkt im Zellkern, sondern nur in der nukleären Membran und in den den Zellkern

umgebenen Strukturen, wie bspw. dem Golgi-Apparat, detektiert (101, 108, 109). Kvam et al. legten nahe, dass trotz der fehlenden Anreicherung von Temoporfin im Zellkern, ein DNA-Schaden an den Kernmembran-nahen Anteilen der DNA entstehen kann (101). Es wird davon ausgegangen, dass hierfür die Diffusionsstrecke der entstandenen Singulett-Sauerstoffe von circa 0,02 μm verantwortlich ist (43, 101). Diese Abhängigkeit des DNA-Schadens von der Lage des DNA-Stranges innerhalb des Zellkerns und der Nähe zur Kernmembran könnte die großen Schwankungen des 8-OHdG-Signals in den ROS-Gruppen des hier dargestellten Modells mit erklären (Abb. 8). Einen weiteren Erklärungsversuch für dieses Beobachtung liefern Chakraborty et al. und Rubio et al. (103, 104). Sie gehen von einer zweistufigen Entstehung des DNA-Schadens nach PDR aus. Demnach entstehen ROS primär Photosensibilisator-nah beispielsweise in der Zellmembran oder perinukleär (103). Anschließend werden umgebene Strukturen wie Lipide oder Proteine oxidiert und fungieren als Mediatoren (104). Diese Mediatoren können dann in den Zellkern diffundieren und dort einen sekundären oxidativen DNA-Schaden auslösen (103, 104). Mit der in dieser Arbeit durchgeführten 8-OHdG-Färbung wurde ein nukleärer DNA-Schaden nachgewiesen. Es ergibt sich allerdings kein Hinweis auf die Herkunft des oxidativen Stresses, weshalb sowohl die Hypothese zur Herkunft des oxidativen Stresses von Chakraborty et al. (103) und Rubio et al. (104) als auch von Kvam et al. (101) plausibel erscheint. Darüber hinaus ist aber auch die Lage der Laserfaser vor der Aortenklappe eine denkbare Ursache für die Schwankungen in der Expression von 8-OHdG. Trotz Lagekontrolle mittels Echokardiographie, ist eine Deplatzierung der Laserfaser während der Bestrahlung durchaus denkbar.

Das in dieser Arbeit dargestellte Tiermodell führte zusammenfassend zu einem oxidativen DNA-Schaden und ist somit in der Lage den Einfluss von ROS an der Aortenklappe zu untersuchen. Hierfür war eine PDR mit dem Photosensibilisator Temoporfin und eine 60-minütige Laserbestrahlung notwendig.

4.2.4 Analyse des Einflusses der Bestrahlungsdauer im Rahmen der PDR

Im klinischen Einsatz an Patienten werden Tumoren im Rahmen der PDR in der Regel nur wenige Minuten mit einem Laser der Leistungsdichte von 0,1 W/cm^2 bestrahlt (49, 110). Ris et al. untersuchte die Wirkung von verschiedenen Leistungsdichten (0,1 W/cm^2 und 0,2 W/cm^2) und unterschiedlich langen Bestrahlungszeiten (100 s und 200 s) in Mäusen bei *Drug-Light*-Intervallen von vier Stunden bis fünf Tagen (111). Dies entspricht verwendeten Energiedichten von 10 J/cm^2 bzw. 20 J/cm^2 . Hierbei nahmen Nekrosen im Tumorgewebe von Mäusen mit der verwendeten Energiedichte zu (111). Gesundes Gewebe schien von den hochintensiven Laserstrahlen weniger stark beeinträchtigt zu sein (111). Vergleicht man diese Erkenntnisse mit den Versuchen dieser Arbeit, so gibt es mehrere Unterschiede. In der vorliegenden Arbeit wurde gesundes Aortenklappengewebe von Wistar-Ratten nach einem *Drug-Light*-Intervall von 24 Stunden und mit einem Laser der Leistungsdichte 0,1 W/cm^2 bestrahlt. Aus der Bestrahlungsdauer von 10 bzw. 60 Minuten ergeben sich Energiedichten von 60 J/cm^2 bzw. 360 J/cm^2 , was einem Vielfachen der untersuchten Energiedichte von Ris et al. entspricht. Eine Bestrahlungsdauer von 60 Minuten führte zu signifikant mehr oxidativem Stress in der Aortenklappe

als eine 10-minütige Bestrahlung (vgl. Abb. 8A). Trotz der höheren Energie wurde in diesen Versuchen kein Gewebsuntergang festgestellt (vgl. 3.2.3 + 3.3.3).

Dies kann zum einen auf die verwendeten Spezies zurückgeführt werden, zum anderen aber auch an dem gesunden und nicht durch Blutgefäße versorgten Gewebe der Aortenklappe liegen (54–56). Triesscheijn et al. und Peng et al. geben Hinweise darauf, dass Temoporfin primär an vaskulären Endothelzellen wirkt und hierdurch die gute Tumorwirksamkeit begründet ist (54, 55, 112). Die fehlende Gefäßversorgung der Aortenklappe könnte ursächlich dafür sein, dass die klassische Wirkung des Temoporfins hier nicht in Gänze greift und größere Energiemengen notwendig werden. Zwar finden sich auch in der Aortenklappe Endothelzellen, diese unterscheiden sich allerdings in vielerlei Hinsicht von den vaskulären Endothelzellen und scheinen kein primärer Zielort von Temoporfin zu sein.

Außerdem muss bei der Einordnung der verwendeten Energiedichten beachtet werden, dass die im hier dargestellten Tiermodell verwendeten Energiedichten nicht direkt auf das Aortenklappengewebe treffen. Auf dem Weg zur Aortenklappe werden sie durch Moleküle in der Blutphase reflektiert und absorbiert. Zu nennen ist hier insbesondere das Porphyrin Häm, welches als endogener Biosensibilisator fungieren kann (44, 48, 113). Die auf das Aortenklappengewebe treffende Energiedichte ist also bedeutend kleiner als die vom Laser emittierte Energiedichte. Direkte Vergleiche der Energiedichten dieses Tiermodells mit anderen Versuchsaufbauten sind dementsprechend nur ansatzweise möglich.

Im Vergleich zu Arbeiten in anderen Spezies und an anderen Geweben sind zusammenfassend im vorliegenden Modell deutlich höhere Energiedichten für einen Effekt am Aortenklappengewebe notwendig.

4.2.5 Evaluierung der Ergebnisse in der kurzfristigen Nachbeobachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Normalisierung des oxidativen Stresses an den Aortenklappen acht Tage nach der Bestrahlung (Abb. 14). Der oxidative Stress sinkt über die Zeit signifikant ab und gleicht sich den Kontrollgruppen an.

Ursache für diese Beobachtung können Reparaturmechanismen in der Zelle sein. Martinet et al. wiesen in ihrem Atherosklerosemodell in Kaninchen nach einer cholesterolreichen Diät vermehrte Mengen an DNA-Reparaturmolekülen in den Plaques nach, die sie auf einen vorherigen oxidativen DNA-Schaden zurückführten (102). Ist dieser nur gering ausgeprägt, so kann dieser Schaden durch Reparaturmechanismen korrigiert und eine Apoptose oder Nekrose im Gewebe verhindert werden (102). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Erkenntnisse aus der Atheroskleroseforschung in diesem Fall auch auf Mechanismen an der Aortenklappe zutreffen können. McNair et al. und Rousset et al. wiesen in ihren Zellkulturversuchen einen durch PDR verursachten DNA-Schaden und eine darauf folgende DNA-Reparatur nach (106, 114). Dabei konnten Rousset et al. zeigen, dass der Reparaturmechanismus abhängig von der verwendeten Energiedichte des Lasers und der Temoporfinkonzentration ist (106). Bis zu einer gewissen Energiedichte und Temoporfinkonzentration zeigte sich ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem durch PDR

verursachten DNA-Schaden und der darauf folgenden Reparatur der DNA (106). Dabei war der Reparaturmechanismus nach 24 Stunden vollständig abgeschlossen (106, 114).

Die *in vivo*-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fügen sich gut in die Beobachtungen von Rousset et al. und Martinet et al. ein (102, 106): Im vorliegenden DAVD-Modell konnte ein DNA-Schaden in Form von 8-OHdG nachgewiesen werden, welcher acht Tage nach der Bestrahlung wieder auf dem basalen Niveau der Kontrollgruppe angelangt ist. Es kann demnach von einer Reparatur des zugefügten Schadens ausgegangen werden (Abb. 14). Darüber hinaus wurden weder initial noch nach acht Tagen apoptotische Mechanismen in der Klappe nachgewiesen (vgl. 3.2.3 + 3.3.3). Zusammenfassend wurde im hier dargestellten Modell oxidativer Schaden ausgelöst, der aber initial und langfristig subletal für die Zellen der Aortenklappe war und nach acht Tagen abgesunken ist. Eine mögliche Ursache hierfür können funktionierende und durch die PDR nicht beeinflusste DNA-Reparaturmechanismen sein. In weiteren Untersuchungen kann zur Beantwortung dieser Frage die Anwesenheit spezifischer DNA-Reparaturenzyme untersucht werden.

4.2.6 Analyse der regionalen Unterschiede

Regionale Unterschiede zwischen den einzelnen Taschenstrukturen zeigen sich in drei verschiedenen ROS-Behandlungsgruppen. Hierbei war der oxidative Stress in den 10-Minuten-Gruppen, sowohl zum Zeitpunkt $t = 0$ d als auch zum Zeitpunkt $t = 8$ d, in den Taschen größer als im Anulus (vgl. Abb. 20C). Acht Tage nach einer 60-minütigen PDR konnte in den Kommissuren signifikant mehr oxidativer Stress nachgewiesen werden als im Anulus (vgl. Abb. 20C). Insgesamt war der gemessene oxidative Stress niedrig und auf dem Niveau der Kontrollgruppen, weswegen hier nur eine vorsichtige Interpretation der Daten erfolgen sollte. Direkt nach einer 60-minütigen PDR ($t = 0$ d) ergab sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Klappenstrukturen.

Eine denkbare Erklärung dieser Ergebnisse liefert die Arbeit von Grande et al. (4). Demnach ist der Scherstress an den freien Rändern der Taschen im Vergleich zu anderen Strukturen der Aortenklappe am größten (4). Scherstress führt zu einer Beeinflussung der Endothelfunktion, welche unter anderem antioxidative Mechanismen beinhalten (3, 28, 115). Eine mögliche Schlussfolgerung kann also sein, dass oxidativer Stress an mechanisch stark beanspruchten Strukturen auch physiologisch erhöht ist. Eine direkte Korrelation dieser beiden Faktoren wurde bisher noch nicht untersucht. Die Ergebnisse der Sham-Gruppe acht Tage nach einer 10-minütigen Intervention und direkt nach einer 60-minütigen Intervention untermauern jedoch diese Hypothese (vgl. Abb. 20A). Auch hier zeigt sich ein basal erhöhter oxidativer Stress in den Taschen verglichen mit dem Anulus. In den übrigen Behandlungsgruppen zeigen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Klappenstrukturen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse und der Feststellungen von Grande et al. kann also davon ausgegangen werden, dass in physiologischem Zustand der oxidative Stress an den Taschen größer ist als am Anulus (Abb. 20 + (4)). Das Ergebnis acht Tage nach einer 60-minütigen Bestrahlung kann vorsichtig als Hinweis darauf gewertet werden, dass der oxidative Stress nach PDR an den Kommissuren zunimmt (Abb. 20C). Da in der Literatur häufig die Kommissur als primärer Ort für frühe Veränderungen bei der

DAVD genannt wird (63, 80, 97), lassen sich diese Ergebnisse plausibel einordnen. Dennoch sollten an dieser Stelle die Ergebnisse der Langzeitversuche berücksichtigt werden. Hier wäre interessant, inwieweit andere pathophysiologische Mechanismen der DAVD vermehrt in den Kommissuren nachgewiesen werden können.

4.3 Inflammatorische endotheliale Aktivierung im Zusammenhang mit oxidativem Stress im dargestellten Tiermodell

Die inflammatorische endotheliale Aktivierung ist einer der frühen Mechanismen in der Pathophysiologie der DAVD. Scherstress und oxidiertes LDL schädigen das Endothel, wodurch Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise VCAM-1, exprimiert werden. An diese binden im Verlauf Leukozyten und der Erkrankungsprozess schreitet voran (14, 17, 63, 116).

4.3.1 Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die inflammatorische endotheliale Aktivierung im dargestellten Tiermodell

Die 60-minütige PDR der Aortenklappe führte im dargestellten Modell zu einer vermehrten VCAM-1-Expression verglichen mit einer alleinigen Laserbestrahlung (siehe Abb. 10C). Dennoch zeigte sich im direkten Vergleich kein signifikanter Unterschied zwischen einer 10- bzw. 60-minütigen Bestrahlungsdauer zum Zeitpunkt $t = 0$ d (siehe Abb. 10A).

Die 60-minütige PDR hat zum Zeitpunkt $t = 0$ d neben vermehrtem oxidativem Stress (vgl. Abb. 8) zu einem gewissen Endothelschaden an der Aortenklappe geführt (vgl. Abb. 10). Insgesamt konnten zwar geringe Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, es kam aber zu keiner massiven inflammatorischen Reaktion am Klappenendothel.

In der Literatur werden zwei Hypothesen zum Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem Beginn der Inflammation im frühen Krankheitsprozess beschrieben. Zum einen wird von einem intrinsischen Ungleichgewicht am Klappenendothel ausgegangen, durch welches lokal ROS erzeugt werden (28, 63). Zum anderen wird der Einfluss von oxidiertem LDL als Faktor von außen diskutiert (35, 116).

Farrar et al. zeigten als eine der ersten Arbeitsgruppen einen direkten Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und inflammatorischen Prozessen am Klappenendothel (28). Hier führte TNF- α zu einer endothelialen ROS-Freisetzung und einer kolokalisierten VCAM-1-Expression. Außerdem zeigten Aikawa et al. eine vermehrte VCAM-1-Expression an den hämodynamisch stark beanspruchten Kommissuren (63). Das Endothel scheint also eine intrinsische Ressource von oxidativem Stress zu sein, aus dem in pathologischen Zuständen eine inflammatorische endotheliale Aktivierung resultiert.

Neben dem Klappenendothel trägt vermutlich auch oxidiertes LDL ähnlich wie bei der Atherosklerose zur Entstehung der DAVD bei. Die Arbeiten von Olsson et al. und Mohty et al. zeigen einen Zusammenhang von oxidiertem LDL und inflammatorischen Prozessen zu Beginn der DAVD auf (35, 116). Auf der Grundlage der im beschriebenen Tiermodell erhobenen Daten kann keine Aussage über den genauen Ort der Entstehung des oxidativen Stresses in diesem Versuchsaufbau getroffen werden.

Im Zusammenhang mit der bisher bekannten Pharmakokinetik des Temoporfin und den Wirkungen des Lasers sind aber einige theoretische Überlegungen sinnvoll.

Temoporfin wird in der Blutphase zu einem gewissen Teil an LDL gebunden (117, 118). Somit ist denkbar, dass mit Temoporfin beladenes LDL von der Aortenklappe aufgenommen wurde und die PDR zu einer lokalen Bildung von ROS an den LDL-Molekülen geführt hat. Dies würde einen Kernmechanismus in der Pathophysiologie der DAVD abbilden. Bei der Übertragung dieser Hypothese zur Pathophysiologie der humanen DAVD auf ein Rattenmodell, muss allerdings berücksichtigt werden, dass das Lipoproteinprofil von Ratten weniger LDL aufweist als das des Menschen (56). Dies ist eine Limitation des beschriebenen Tiermodells. Hinweise für eine Lipidakkumulation zeigten sich aber in den HE-Übersichtsfärbungen (vgl. Abb. 19). Hier müssen spezifische Untersuchungen zum Nachweis von LDL oder ggf. Temoporfin in den beschriebenen Gebieten durchgeführt werden, um genaue Aussagen treffen zu können.

Insgesamt hat allein die 60-minütige PDR zum Zeitpunkt $t=0$ d initial zu einer vermehrten inflammatorischen endothelialen Aktivierung geführt. Diese inflammatorische Aktivierung wird auch in Frühphasen der Erkrankung beobachtet.

4.3.2 Analyse der VCAM-1-Expression in der kurzfristigen Nachbeobachtung

Acht Tage nach der 60-minütigen Intervention an der Aortenklappe zeigte sich kein klarer Unterschied in der VCAM-1-Expression zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Zu diesem Zeitpunkt fand sich lediglich noch eine Tendenz zu einer vermehrten inflammatorischen endothelialen Aktivierung in der ROS-Gruppe (vgl. Abb. 15B). Im direkten Vergleich der beiden ROS-Gruppen ergab sich aber kein signifikanter Unterschied (vgl. Abb. 15A). Die Unterschiede in der VCAM-1-Expression zwischen den Behandlungsgruppen scheinen sich also im Verlauf anzugleichen.

Eine inflammatorische endotheliale Aktivierung des Klappenendothels im Rahmen der DAVD wurde in verschiedenen Stadien der Erkrankung nachgewiesen. Aikawa et al. zeigten eine VCAM-1-Aktivität schon in den frühen Stadien der Erkrankung auf, in denen es noch zu keinen kalzifizierten Ablagerungen in den Klappen kam (63). Ghaisas et al. und Mazzone et al. konnten auch noch in den Endstadien der Erkrankung eine VCAM-1-Aktivität feststellen (22, 24). Die genauesten Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der VCAM-1-Expression stellten Honda et al. nach einer mechanischen Schädigung der Aortenklappe von Mäusen dar (78). Hier zeigte sich erst nach 12 bis 16 Wochen ein signifikanter Anstieg der VCAM-1-Expression. Allerdings ist auf der Grundlage der veröffentlichten Daten kein Zusammenhang zum oxidativen Stress ersichtlich. Dieser war zwar erhöht, die Messungen von Dihydroethidium wurden allerdings nur zu einem Zeitpunkt nach vier Wochen durchgeführt. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist demnach nicht möglich.

Untersuchungen, die die VCAM-1-Aktivität von den frühen Phasen der Erkrankung bis zum Endpunkt der Kalzifizierung quantitativ darstellen, gibt es aktuell noch nicht. Die Expression von VCAM-1 in der ROS-Gruppe der vorliegenden Arbeit verändert sich im Verlauf des Untersuchungszeitraums von acht Tagen nicht (vgl. Abb. 15A). Diese Ergebnisse fügen sich insgesamt gut in das allgemeine Verständnis

der Pathophysiologie der DAVD ein, bei der eine chronische Inflammation eine wesentliche Rolle einnimmt (8, 13, 119).

Die PDR hat demnach in der ROS-Gruppe zu einem inflammatorischen Prozess geführt, der typisch für die Entwicklung einer DAVD ist und in den Kontrollgruppen nicht in diesem Ausmaß zu beobachten war.

4.3.3 Analyse von regionalen Unterschieden der VCAM-1-Expression

Im Hinblick auf die inflammatorische endotheliale Aktivierung zeigten sich im dargestellten Modell regionale Unterschiede nach 60-minütiger PDR. Direkt nach der Behandlung wurde im Anulus eine signifikant höhere VCAM-1-Expression als an der Tasche deutlich. Acht Tage später war dieser Unterschied nicht mehr sichtbar (vgl. Abb. 24C).

Die Arbeitsgruppe um Aikawa et al. untersuchten mithilfe einer Magnetresonanztomographie und einer Nahinfrarot-Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation von VCAM-1 in frühen Stadien der DAVD an Apolipoprotein E^{-/-}-defizienten Mäusen (63). Hierbei war ein Großteil des VCAM-1 nicht an den Taschen, sondern vorwiegend an den mechanisch stark beanspruchten Kommissuren und am Anulus nachweisbar (63). Diese Untersuchungen stimmen mit den Beobachtungen des in dieser Arbeit dargestellten Tiermodells direkt nach der Behandlung überein (vgl. Abb. 24C). Es muss allerdings beachtet werden, dass die Aortenklappen nur an zwei Zeitpunkten untersucht wurden. Eine eventuelle Dynamik der VCAM-1-Expression im Verlauf der Pathogenese der DAVD bleibt hierbei unberücksichtigt. In der hier dargestellten Arbeit konnte eine Dynamik in der Lokalisation der VCAM-1-Expression beobachtet werden. Die anfänglichen Unterschiede zwischen der VCAM-1-Expression in Anulus und Tasche normalisierten sich acht Tage nach der PDR (vgl. Abb. 24C). Insgesamt bedarf es noch weiteren Untersuchungen, welche die genaue Lokalisation von inflammatorischen Mechanismen in unterschiedlichen Stadien der DAVD beleuchten.

In einer gesunden Aortenklappe ist der Scherstress an der *Lamina ventricularis* höher als an der aortalen *Lamina fibrosa* (18–20). Frühe inflammatorische Läsionen in der Entwicklung der DAVD manifestieren sich jedoch vorwiegend an der aortalen Seite des Taschengewebes (120). Die Ergebnisse von Sucosky et al. legen nahe, dass die *Lamina fibrosa* anfälliger für hämodynamische Veränderungen an der Aortenklappe ist (121). So führten Strömungsveränderungen an der aortalen Seite der Tasche zu einer vermehrten VCAM-1-Expression, nicht jedoch an der ventrikulären Seite (121). In der vorliegenden Arbeit wurde VCAM-1 allerdings vorwiegend auf der ventrikulären Seite der Aortenklappe und nur vereinzelt auf der aortalen Seite nachgewiesen (siehe 3.4.3). Diese Beobachtung ist insofern interessant, da die Laserfaser von aortaler Seite an die Aortenklappe gebracht wurde und sich diese Manifestation von den bisherigen Erkenntnissen zur Pathophysiologie der DAVD unterscheidet. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liefern Simmons et al. (122). Die Arbeitsgruppe wies auf der aortalen Seite der Aortenklappe eine vermehrte Expression von antioxidativen Genen nach als auf der ventrikulären Seite (122). Möglicherweise waren die aortalen VECs im hier dargestellten Tiermodell im Gegensatz zu den VECs der *Lamina ventricularis* durch antioxidative Mechanismen vor den generierten ROS der PDR stärker geschützt. Dennoch sind weitere Untersuchungen nötig, die die Expression von

antioxidativen Molekülen (beispielsweise SOD) seitenspezifisch und in eben diesem Modell nachweisen, um valide Aussagen treffen zu können.

4.4 Evaluierung des Tiermodells

4.4.1 Wirkung der PDR mit Temoporfin an der Aortenklappe der Ratte

Die PDR ist ein komplexes Verfahren, welches im medizinischen Kontext bisher vorwiegend an Tumorgewebe untersucht wurde. Bei der Anwendung sind viele Einflussfaktoren, wie die Eigenschaften des Lasers (Wellenlänge, Leistungs- und Energiedichte), die pharmakokinetischen Eigenschaften des Temoporfins im Gewebe und der Zeitpunkt der Bestrahlung zu berücksichtigen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die nötige Bestrahlungsdauer (60 Minuten; vgl. 3.2 und 4.2.4) für diesen Versuchsaufbau ausmachen, um einen relevanten oxidativen Effekt an der Aortenklappe zu erzeugen. Dieser Effekt war durch eine alleinige Laserbestrahlung der Aortenklappe nicht zu erzeugen. Negative Auswirkungen wie eine Thrombenbildung oder ein Zelluntergang im Sinne einer Apoptose wurden nicht beobachtet.

Somit ist der Versuchsaufbau grundlegend geeignet, um die Auswirkungen einer PDR an der Aortenklappe zu untersuchen.

4.4.2 Abbildung der Pathomechanismen der DAVD durch das beschriebene Tiermodell

Histologisch gibt es Kernelemente der DAVD, die sich auch in dem beschriebenen Tiermodell wiederfinden sollten. In den hier dargestellten Versuchen wurden lediglich kurzfristige Effekte untersucht und der Fokus auf ein funktionierendes Modell mit dem Nachweis von generiertem oxidativem Stress gelegt.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass oxidativer Stress ein treibender Faktor in der Entstehung der DAVD ist. ROS wurden hierfür einmalig an der Aortenklappe generiert und deren kurzfristige Wirkung im Sinne von oxidativem Schaden an der DNA nachgewiesen (vgl. 3.2). Nach acht Tagen hat sich dieser oxidative Schaden signifikant reduziert und entsprach dem basalen oxidativen Stressniveau (vgl. 3.3.1). Dies entspricht im Detail nicht der Pathophysiologie der DAVD, bei der es sich um einen chronischen Krankheitsprozess und damit einer dauerhaften Schädigung der Aortenklappe handelt (8, 13). Dennoch führte diese einmalige Zufuhr von ROS zu einer für die DAVD typischen inflammatorischen endothelialen Aktivierung an der Aortenklappe, welche zu einem gewissen Maß auch nach acht Tagen noch sichtbar war (vgl. 3.2.2 + 3.3.2).

Inwieweit das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Modell in der Lage ist, eine klinisch relevante Aortenklappenstenose und das Vollbild der DAVD zu erzeugen, wird sich erst in Langzeitversuchen zeigen. Klassische Kernelemente der DAVD wie eine Verdickung der Aortenklappe, eine Fibrosierung, Makrophageninfiltration und Calciumeinlagerungen sind acht Tage nach einer Schädigung noch nicht zu erwarten und müssen in Langzeituntersuchungen analysiert werden (25).

4.4.3 Vergleich mit bisherigen Tiermodellen zur DAVD

Tiermodelle eignen sich im Vergleich zu *in vitro*-Untersuchungen besonders für die Erforschung der DAVD. Hier können *in vivo*-Einflussfaktoren, die den Gesamtorganismus betreffen, berücksichtigt werden (Hämodynamik an der Aortenklappe, Einfluss des Immunsystems, Einfluss der Ernährung). Darüber hinaus können Erkrankungen wie das metabolische Syndrom oder die Niereninsuffizienz simuliert werden, die häufig mit der Entwicklung einer DAVD beim Menschen einhergehen (8).

Bisherige Tiermodelle analysierten insbesondere den Einfluss von Stoffwechselstörungen im Sinne einer Hyperlipidämie oder einer Hyperphosphatämie auf die Aortenklappe (64, 66, 68–71). Darüber hinaus wurde die Bedeutung einiger Gene wie Fibulin 4 oder Notch 1 in der Pathophysiologie durch *Knock-out*-Mäuse dargestellt (75, 76). Ein anderer Ansatz ist die mechanische Induktion einer DAVD durch die Verletzung der Aortenklappe mithilfe eines Drahtes, welcher zunächst durch Honda et al. implementiert und später durch Niepmann et al. weiter entwickelt wurde (25, 78).

Oxidativer Stress konnte hierbei häufig als Begleiterscheinung nachgewiesen werden. Allerdings wurde im Rahmen eines Tiermodells bisher nie der alleinige Einfluss von lokal erzeugten ROS auf die Entwicklung der DAVD untersucht. Dies unterscheidet das in dieser Arbeit vorgestellte Tiermodell von den Bisherigen. Darüber hinaus wurden in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit Ratten und nicht wie üblich Mäuse, Kaninchen oder Schweine genutzt (67, 81, 82, 123). Ein Grund hierfür ist die Expertise auf dem Gebiet der mikrovaskulären Klappenchirurgie an Ratten vor Ort (85, 124). Ein weiterer Vorteil in der Verwendung von Ratten ist darüber hinaus die Größe der Aortenklappen für die histologischen Untersuchungen. Hier ist im Vergleich zu murinen Modellen eine differenziertere Betrachtung der einzelnen Strukturen möglich. Zur Implementierung eines Modells ist darüber hinaus auch aus ethischen Gesichtspunkten die Verwendung kleiner Nager den großen Säugetieren vorzuziehen. Es muss aber beachtet werden, dass Ratten ein anderes Lipoproteinprofil als Menschen besitzen und sich atherosklerotische Veränderungen in diesen Tieren nicht ohne externes Eingreifen entwickeln (67).

Eine abschließende Beurteilung des Modells kann erst mit den Ergebnissen aus Langzeituntersuchungen durchgeführt werden. Wenn sich hier zeigt, dass durch die lokale PDR eine DAVD erzeugt werden kann, so weist das hier vorgestellte Modell Vorteile gegenüber bisher bestehenden Tiermodellen auf und kann neue Ansätze in der Erforschung der DAVD liefern.

4.5 Ausblick und Limitationen

4.5.1 Ausblick

Für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf die Entwicklung eines neuen Tiermodells zur Untersuchung der Pathophysiologie der DAVD und insbesondere des Einflusses von ROS, sind vor allen Dingen Langzeituntersuchungen mit dem dargestellten Modell von Nöten. Nur hiermit kann die Frage beantwortet werden, inwieweit das Modell tatsächlich zur Entwicklung der DAVD und den kennzeichnenden Veränderungen an der Klappe führt.

Je nach Ergebnislage in den Langzeitversuchen kann darüber hinaus untersucht werden, wie sich das Temoporfin im Organismus der Ratten verteilt. Da es bisher noch keine Untersuchungen zur Pharmakokinetik an der Aortenklappe der Ratte gibt, wären weitere Untersuchungen mit beispielsweise ¹⁴C-markiertem Temoporfin (52) oder fluorometrische Messungen (53) durchaus sinnvoll, um die Wirkung an der Aortenklappe zu optimieren.

Interessant wäre darüber hinaus die Messung des oxidativen Stresses im Vergleich zur Aktivität antioxidativer Enzyme wie beispielsweise der eNOS oder der SOD an der ventrikulären und aortalen Seite, um den Einfluss von antioxidativen Schutzmechanismen seitenspezifisch zu untersuchen. Auch wäre eine Applikation von ROS von ventrikulärer statt aortaler Seite aufschlussreich, da sich beide Seiten in der Manifestation von DAVD-typischen Veränderungen unterscheiden (vgl. 4.3.3).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit den zeitlichen Verlauf der DAVD vom Tag der Schädigung an detailliert zu untersuchen. Hierbei sind vor allen Dingen die frühen Veränderungen an der Aortenklappe relevant, die noch zu keiner morphologischen Veränderung der Aortenklappe führt. Mithilfe eines detaillierten Verständnisses der frühen pathophysiologischen Mechanismen könnten neue therapeutische Angriffsmöglichkeiten zur Prophylaxe bei Risikopatienten analysiert werden.

Anhand des Modells kann der Einfluss mehrerer Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie oder die Expression von Risikogenen auf die Entwicklung der DAVD untersucht werden.

4.5.2 Limitationen

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Tiermodells, welches in der Lage ist, die Pathophysiologie der DAVD abzubilden. Ein Modell stellt die Realität jedoch grundsätzlich nur vereinfacht dar. So ist beispielsweise zu beachten, dass sich das Lipoproteinprofil der Ratte von dem des Menschen unterscheidet (vgl. 4.3.1 und (56)). Dies hat Auswirkungen auf die oxidativen Veränderungen der Lipide und deren Einfluss auf die Entwicklung der DAVD.

Methodisch muss berücksichtigt werden, dass histochemische Verfahren angewandt wurden. Dies brachte den Vorteil mögliche Unterschiede in der Lokalisation zu verdeutlichen und die Aortenklappe als heterogene Struktur zu betrachten. Im Gegensatz zur Molekularbiologie ist die Auswertung allerdings subjektiver und weniger standardisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht diese mögliche Fehlerquelle durch die Nutzung von standardisierten Färbeprotokollen, einer standardisierten Mikroskopie und Bildaufnahme sowie durch eine quantitative Anwendung von Bildverarbeitungsprogrammen und semiquantitativen Scores in der Auswertung zu minimieren (vgl. 2). In der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass sich in den Behandlungsgruppen große interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren zeigen. Dies zeigt sich insbesondere in den Auswertungen des oxidativen Stresses in den ROS-Gruppen (Abb. 8A+C). Neben methodischen Ungenauigkeiten könnten die Beobachtungen von Kvam et al. zur intrazellulären Lokalisation des Temoporfins eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen bieten (101). Weitaus wahrscheinlicher für die Variabilität der Ergebnisse sind allerdings die pharmakokinetischen Eigenschaften von Temoporfin. Wo genau ROS im

Rahmen der PDR entstanden sind, kann demnach nur erahnt werden. Hier könnte die Hauptursache der interindividuellen Schwankungen begründet liegen.

4.6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit am beschriebenen Tiermodell zeigt, dass durch die PDR oxidativer Stress an der Aortenklappe erzeugt werden kann.

Diese Behandlung führte im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Bestrahlung zu einem oxidativen Schaden im Klappengewebe. Eine massive Zellschädigung wurde hierbei nicht herbeigeführt. Neben dem Nachweis von oxidativem Stress im Klappengewebe konnte eine inflammatorische endotheliale Aktivierung beobachtet werden. Inflammatorische Prozesse am Endothel spielen in der Frühphase der DAVD eine Rolle und können ein Hinweis auf eine beginnende DAVD im untersuchten Modell sein.

Mithilfe des hier dargestellten Modells kann in Langzeitversuchen untersucht werden, ob durch die PDR das Vollbild einer DAVD erzeugt werden kann und oxidativer Stress einer der Hauptmechanismen in der Pathophysiologie der Erkrankung ist.

5 Literaturverzeichnis

1. Schünke M, Hrsg. Hals und innere Organe: 78 Tabellen. Stuttgart: Thieme; 2005. (Prometheus / Michael Schünke Erik Schulte Udo Schumacher. Unter Mitarb. von Jürgen Rude. Ill. von Markus Voll Karl Wesker; Bd. 2).
2. Misfeld M, Sievers H-H. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B, Biol Sci* 2007; 362(1484):1421–36. doi: 10.1098/rstb.2007.2125.
3. Hinton RB, Yutzey KE. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol* 2011; 73:29–46. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142145.
4. Grande KJ, Cochran RP, Reinhall PG, Kunzelman KS. Stress variations in the human aortic root and valve: the role of anatomic asymmetry. *Ann Biomed Eng* 1998; 26(4):534–45. doi: 10.1114/1.122.
5. Aumüller G, Wurzing L. Anatomie. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010. (Duale Reihe). Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-46981>.
6. Gross L, Kugel MA. Topographic Anatomy and Histology of the Valves in the Human Heart. *Am J Pathol* 1931; 7(5):445–474.7.
7. Servier Medical Art. Suresnes: Les Laboratoires Servier. Verfügbar unter: <https://smart.servier.com>.
8. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD 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):1783–91. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767.
9. Herold G. Innere Medizin 2016: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Selbstverlag; 2016.
10. Iung B. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *European Heart Journal* 2003; 24(13):1231–43. doi: 10.1016/S0195-668X(03)00201-X.
11. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *The Lancet* 2006; 368(9540):1005–11. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673606692088>.
12. Leibowitz D, Stessman J, Jacobs JM, Stessman-Lande I, Gilon D. Prevalence and prognosis of aortic valve disease in subjects older than 85 years of age. *Am J Cardiol* 2013; 112(3):395–9. doi: 10.1016/j.amjcard.2013.03.044.
13. Mathieu P, Boulanger M-C. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Can J Cardiol* 2014; 30(9):982–93. doi: 10.1016/j.cjca.2014.03.029.
14. Warren BA, Yong JL. Calcification of the aortic valve: Its progression and grading. *Pathology* 1997; 29(4):360–8. doi: 10.1080/00313029700169315.
15. Stewart B, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE et al. Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease fn1fn1This study was supported in part by Contracts NO1-HC85079 through HC-850086 from the National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. *Journal of the American College of Cardiology* 1997; 29(3):630–4. doi: 10.1016/S0735-1097(96)00563-3.
16. Schoen FJ, Gotlib AI. Heart valve health, disease, replacement, and repair: a 25-year cardiovascular pathology perspective. *Cardiovasc Pathol* 2016; 25(4):341–52. doi: 10.1016/j.carpath.2016.05.002.

17. New SEP, Aikawa E. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circ Res* 2011; 108(11):1381–91. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234146.
18. Mahler GJ, Butcher JT. Inflammatory regulation of valvular remodeling: the good(?), the bad, and the ugly. *Int J Inflam* 2011; 2011:721419. doi: 10.4061/2011/721419.
19. Kilner PJ, Yang GZ, Wilkes AJ, Mohiaddin RH, Firmin DN, Yacoub MH. Asymmetric redirection of flow through the heart. *Nature* 2000; 404(6779):759–61. doi: 10.1038/35008075.
20. Weston MW, LaBorde DV, Yoganathan AP. Estimation of the shear stress on the surface of an aortic valve leaflet. *Ann Biomed Eng* 1999; 27(4):572–9. doi: 10.1114/1.199.
21. Li C, Xu S, Gotlieb AI. The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovasc Pathol* 2013; 22(1):1–8. doi: 10.1016/j.carpath.2012.06.005.
22. Ghaisas NK, Foley J, O'Briain D, Crean P, Kelleher D, Walsh M. Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels and effects of valve replacement. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; 36(7):2257–62. doi: 10.1016/S0735-1097(00)00998-0.
23. Müller AM, Cronen C, Kupferwasser LI, Oelert H, Miller K-M, Kirkpatrick CJ. Expression of endothelial cell adhesion molecules on heart valves: up-regulation in degeneration as well as acute endocarditis. *J. Pathol.* 2000; 191(1):54–60. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200005)191:1<54::AID-PATH568>3.0.CO;2-Y.
24. Mazzone A, Epistolato MC, Caterina R de, Storti S, Vittorini S, Sbrana S 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. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43(9):1670–6. doi: 10.1016/j.jacc.2003.12.041.
25. Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, Adam M, Nordsiek J, Gyamfi-Poku I et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype. *Clin Res Cardiol* 2019; 108(8):847–56. doi: 10.1007/s00392-019-01413-1.
26. Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Peña-Silva R, Heistad DD. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; 52(10):843–50. doi: 10.1016/j.jacc.2008.05.043.
27. Poggianti E, Venneri L, Chubuchny V, Jambrik Z, Baroncini LA, Picano E. Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 41(1):136–41. doi: 10.1016/S0735-1097(02)02622-0.
28. Farrar EJ, Huntley GD, Butcher J. Endothelial-derived oxidative stress drives myofibroblastic activation and calcification of the aortic valve. *PLoS ONE* 2015; 10(4):e0123257. doi: 10.1371/journal.pone.0123257.
29. Anea CB, Cheng B, Sharma S, Kumar S, Caldwell RW, Yao L et al. Increased superoxide and endothelial NO synthase uncoupling in blood vessels of Bmal1-knockout mice. *Circ Res* 2012; 111(9):1157–65. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261750.
30. Kar S, Bhandar B, Kavdia M. Impact of SOD in eNOS uncoupling: a two-edged sword between hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Free Radic Res* 2012; 46(12):1496–513. doi: 10.3109/10715762.2012.731052.
31. Li J-M, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287(5):R1014-30. doi: 10.1152/ajpregu.00124.2004.
32. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res* 2011; 108(11):1392–412. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234138.

33. Branchetti E, Sainger R, Poggio P, Grau JB, Patterson-Fortin J, Bavaria JE et al. Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013; 33(2):e66-74. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300177.
34. Kaden JJ, Dempfle C-E, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kiliç R et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14(2):80–7. doi: 10.1016/j.carpath.2005.01.002.
35. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1999; 19(5):1218–22.
36. Jian B, Narula N, Li Q, Mohler ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF- β 1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *The Annals of Thoracic Surgery* 2003; 75(2):457–65. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003497502043126>.
37. Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8., völlig neu bearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007. (Springer-Lehrbuch). Verfügbar unter: <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10157756>.
38. Mathieu P, Voisine P, Pépin A, Shetty R, Savard N, Dagenais F. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis* 2005; 14(3):353–7.
39. Galeone A, Brunetti G, Oranger A, Greco G, Di Benedetto A, Mori G et al. Aortic valvular interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Int J Cardiol* 2013; 169(4):296–304. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.09.012.
40. Raab O. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien [@München, Univ., Diss., 1900]. *Zeitschrift f. Biologie*, Bd 39 1900.
41. Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 2008; 10(3):148–54. doi: 10.1007/s12094-008-0172-2.
42. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 1992; 55(1):145–57. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x.
43. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 1991; 53(4):549–53.
44. Szaćilowski K, Macyk W, Drzewiecka-Matuszek A, Brindell M, Stochel G. Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *Chem Rev* 2005; 105(6):2647–94. doi: 10.1021/cr030707e.
45. Liu P, Zhu Z, Zeng C, Nie G. Specific absorption spectra of hemoglobin at different PO₂ levels: potential noninvasive method to detect PO₂ in tissues. *J Biomed Opt* 2012; 17(12):125002. doi: 10.1117/1.JBO.17.12.125002.
46. Boulnois J-L. Photophysical processes in recent medical laser developments: A review. *Lasers in Medical Science* 1986; 1(1):47–66. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/BF02030737>.
47. Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc* 2013; 46(1):7–23. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.7.
48. Saenko YV, Glushchenko ES, Zolotovskii IO, Sholokhov E, Kurkov A. Mitochondrial dependent oxidative stress in cell culture induced by laser radiation at 1265 nm. *Lasers in Medical Science* 2016; 31(3):405–13. doi: 10.1007/s10103-015-1861-z.
49. Senge MO, Brandt JC. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)--a second-generation photosensitizer. *Photochem Photobiol* 2011; 87(6):1240–96. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00986.x.

50. European medicines agency. EMA/235463/2016 - Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit - Foscan/Temoporfin 2007. London, United Kingdom; 2016. Verfügbar unter: https://www.ema.europa.eu/documents/overview/foscan-epar-summary-public_en.pdf [Stand: 23.05.2019].
51. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3(5):380–7. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
52. Cramers P, Ruevekamp M, Oppelaar H, Dalesio O, Baas P, Stewart FA. Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *Br J Cancer* 2003; 88(2):283–90. doi: 10.1038/sj.bjc.6600682.
53. Morlet L, Vonarx-Coinsmann V, Lenz P, Foultier M-T, Brito LX de, Stewart C et al. Correlation between meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) biodistribution and photodynamic effects in mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1995; 28(1):25–32. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/10113449407090B>.
54. Peng Q, Moan J, Ma L-W, Nesland JM. Uptake, Localization, and Photodynamic Effect of meso-Tetra(hydroxyphenyl)porphine and Its Corresponding Chlorin in Normal and Tumor Tissues of Mice Bearing Mammary Carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55(12):2620.
55. Triesscheijn M, Ruevekamp M, Aalders M, Baas P, Stewart FA. Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response. *Photochem Photobiol* 2005; 81(5):1161–7. doi: 10.1562/2005-04-04-RA-474.
56. Jones HJ, Vernon DI, Brown SB. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br J Cancer* 2003; 89(2):398–404. doi: 10.1038/sj.bjc.6601101.
57. Glanzmann T, Hadjur C, Zellweger M, Grosjean P, Forrer M, Ballini J-P et al. Pharmacokinetics of Tetra (m-hydroxyphenyl)chlorin in Human Plasma and Individualized Light Dosimetry in Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol* 1998; 67(5):596–602. doi: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb09099.x.
58. Ronn AM, Nouri M, Lofgren LA, Steinberg BM, Westerborn A, Windahl T et al. Human tissue levels and plasma pharmacokinetics of temoporfin (Foscan®, mTHPC). *Lasers in Medical Science* 1996; 11(4):267–72. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/BF02134918>.
59. Hopkinson HJ, Vernon DI, Brown SB. Identification and Partial Characterization of an Unusual Distribution of the Photosensitizer meta-Tetrahydroxyphenyl Chlorin (Temoporfin) in Human Plasma. *Photochem Photobiol* 1999; 69(4):482–8. doi: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb03316.x.
60. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84(4):1381–478. doi: 10.1152/physrev.00047.2003.
61. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002; 82(1):47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
62. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989; 70(6):737–57. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2557883>.
63. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, Aikawa M et al. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation* 2007; 115(3):377–86. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.654913.
64. Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2006; 114(19):2065–9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.634139.

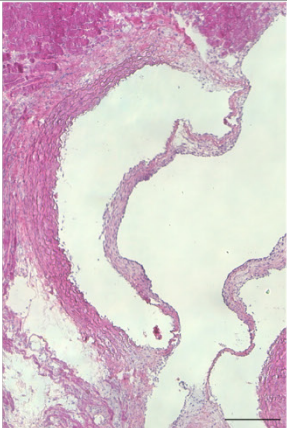
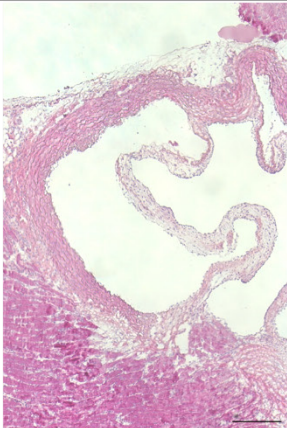
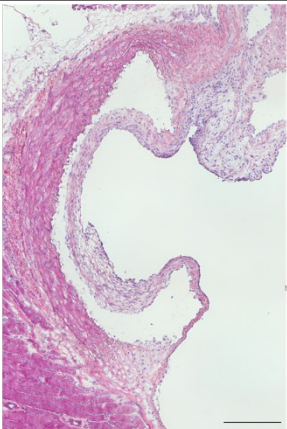
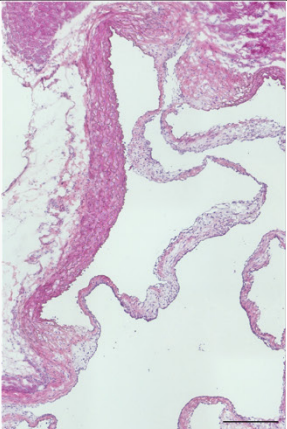
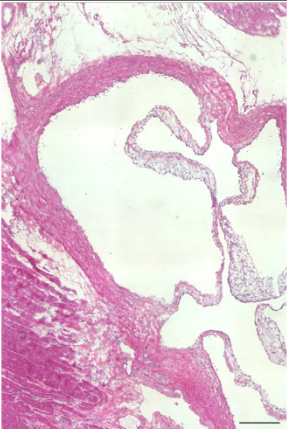
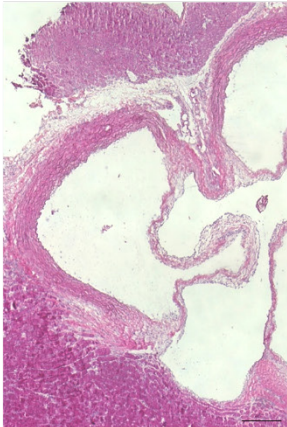
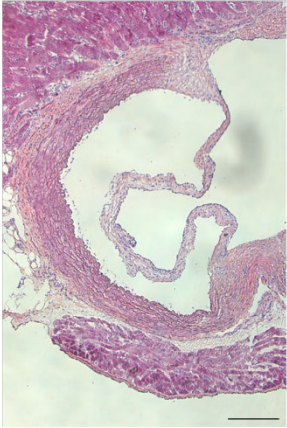
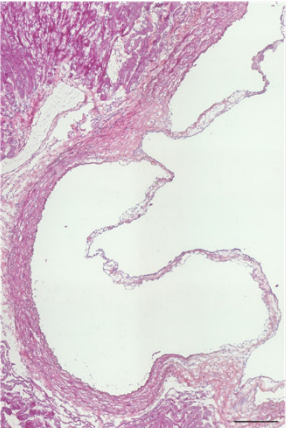
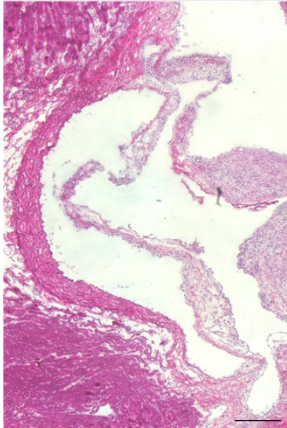
65. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Brooks RM, Berry CJ, Zimmerman K et al. Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice. *Circulation* 2009; 119(20):2693–701. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.834614.
66. Drolet M-C, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 47(4):850–5. doi: 10.1016/j.jacc.2005.09.049.
67. Sider KL, Blaser MC, Simmons CA. Animal models of calcific aortic valve disease. *Int J Inflam* 2011; 2011:364310. doi: 10.4061/2011/364310.
68. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo J-L, Rusanescu G, Iwamoto Y et al. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation* 2009; 119(13):1785–94. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827972.
69. Hjortnaes J, Butcher J, Figueiredo J-L, Riccio M, Kohler RH, Kozloff KM et al. Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation. *European Heart Journal* 2010; 31(16):1975–84. doi: 10.1093/eurheartj/ehq237.
70. Drolet M-C, Arsenault M, Couet J. Experimental aortic valve stenosis in rabbits. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 41(7):1211–7. doi: 10.1016/S0735-1097(03)00090-1.
71. Drolet M-C, Couet J, Arsenault M. Development of aortic valve sclerosis or stenosis in rabbits: role of cholesterol and calcium. *J Heart Valve Dis* 2008; 17(4):381–7.
72. Liberman M, Bassi E, Martinatti MK, Lario FC, Wosniak J, Pomerantzeff PMA et al. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008; 28(3):463–70. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.156745.
73. Ngo DTM, Stafford I, Kelly DJ, Sverdlow AL, Wuttke RD, Weedon H et al. Vitamin D(2) supplementation induces the development of aortic stenosis in rabbits: interactions with endothelial function and thioredoxin-interacting protein. *Eur J Pharmacol* 2008; 590(1-3):290–6. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.05.051.
74. Ngo DT, Stafford I, Sverdlow AL, Qi W, Wuttke RD, Zhang Y et al. Ramipril retards development of aortic valve stenosis in a rabbit model: mechanistic considerations. *Br J Pharmacol* 2011; 162(3):722–32. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01084.x.
75. Hanada K, Vermeij M, Garinis GA, Waard MC de, Kunen MGS, Myers L et al. Perturbations of vascular homeostasis and aortic valve abnormalities in fibulin-4 deficient mice. *Circ Res* 2007; 100(5):738–46. doi: 10.1161/01.RES.0000260181.19449.95.
76. Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009; 47(6):828–34. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.008.
77. Isoda K, Matsuki T, Kondo H, Iwakura Y, Ohsuzu F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010; 30(4):708–15. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.201749.
78. Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y et al. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014; 34(2):270–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302610.
79. Buetow BS, Laflamme MA. Cardiovascular. In: *Comparative Anatomy and Histology*; Elsevier; 2018. S. 163–89.
80. Assmann A, Zwirnmann K, Heidelberg F, Schiffer F, Horstkötter K, Munakata H et al. The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model. *Biomaterials* 2014; 35(26):7416–28. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.034.

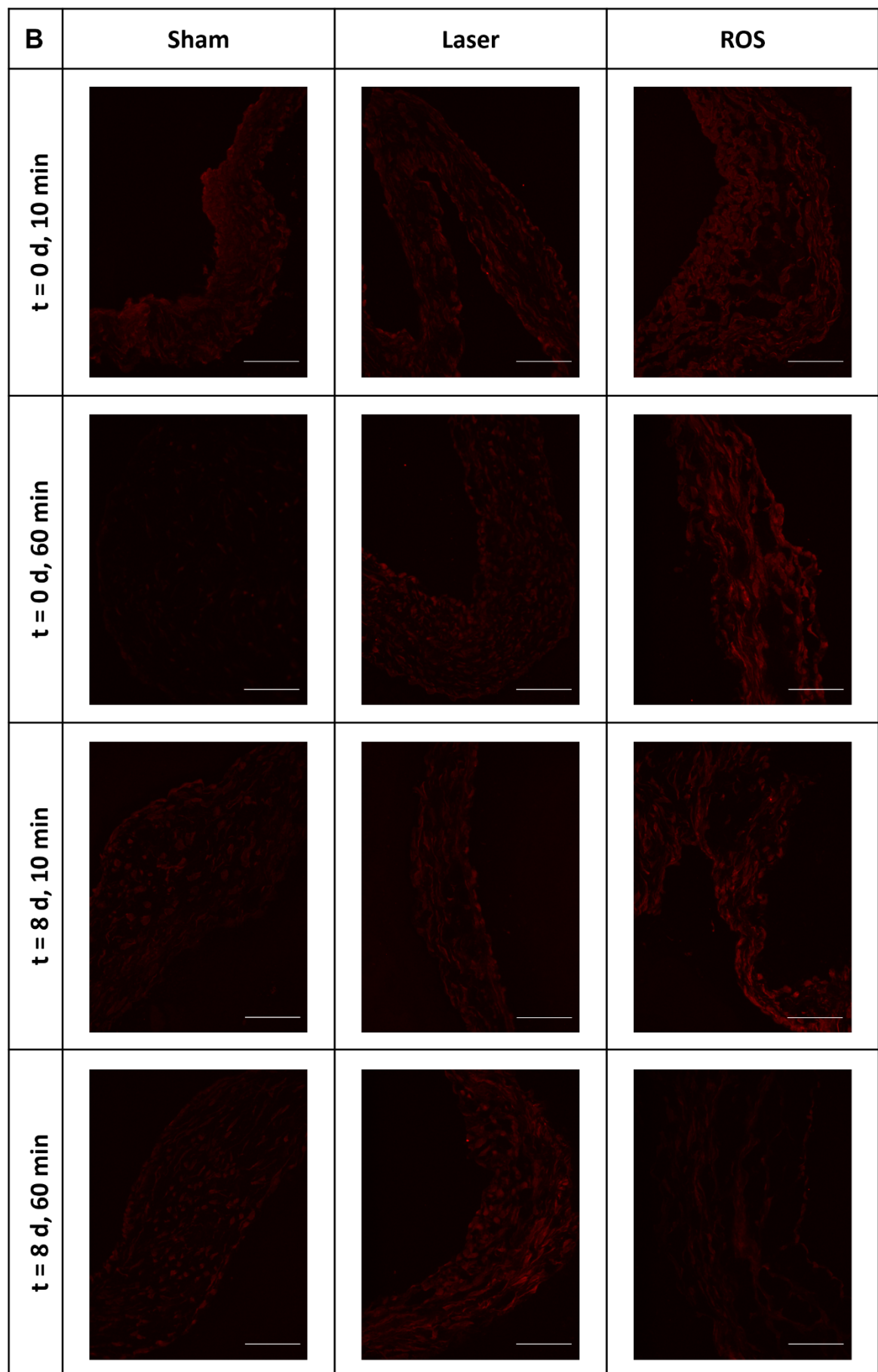
81. Guerraty M, Mohler Iii ER. Models of aortic valve calcification. *J Investig Med* 2007; 55(6):278–83. doi: 10.2310/6650.2007.00012.
82. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis. *Life Sciences* 2002; 70(8):855–65. doi: 10.1016/S0024-3205(01)01479-5.
83. Gillis K, Roosens B, Bala G, Remory I, Hernot S, Delvenne P et al. Interaction of renal failure and dyslipidaemia in the development of calcific aortic valve disease in rats. *Acta Cardiol* 2017; 72(5):537–46. doi: 10.1080/00015385.2017.1311138.
84. Shuvy M, Abedat S, Eliaz R, Abu-Rmeileh I, Abu-Snieneh A, Ben-Dov IZ et al. Hyperphosphatemia is required for initiation but not propagation of kidney failure-induced calcific aortic valve disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019; 317(4):H695-H704. doi: 10.1152/ajpheart.00765.2018.
85. Minol J-P, Reinsch I, Luik M, Leferink A, Barth M, Assmann A et al. Focal induction of ROS-release to trigger local vascular degeneration. *PLoS ONE* 2017; 12(6):e0179342. doi: 10.1371/journal.pone.0179342.
86. Wissozky N. Ueber das Eosin als Reagens auf Hämoglobin und die Bildung von Blutgefäßen und Blutkörperchen bei Säugethier- und Hühnerembryonen. *Archiv f. mikrosk. Anat.* 1877; 13(1):479–96. doi: 10.1007/BF02933947.
87. Lang G, Hrsg. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2. Aufl. Wien: Springer Wien; 2013.
88. Chan JKC. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol* 2014; 22(1):12–32. doi: 10.1177/1066896913517939.
89. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 2009; 25(11):1463–5. doi: 10.1093/bioinformatics/btp184.
90. Thévenaz P, Unser M. User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy. *Microsc Res Tech* 2007; 70(2):135–46. doi: 10.1002/jemt.20393.
91. Dąbrowska N, Wiczowski A. Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med* 2017; 26(1):155–66. doi: 10.17219/acem/43272.
92. Clark RE, Finke EH. Scanning and light microscopy of human aortic leaflets in stressed and relaxed states. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1974; 67(5):792–804. doi: 10.1016/S0022-5223(19)41751-0.
93. Gonzales RS, Wick TM. Hemodynamic modulation of monocytic cell adherence to vascular endothelium. *Ann Biomed Eng* 1996; 24(3):382–93. doi: 10.1007/BF02660887.
94. Côté C, Pibarot P, Després J-P, Mohty D, Cartier A, Arsenault BJ et al. Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis. *Heart* 2008; 94(9):1175–80. doi: 10.1136/hrt.2007.125740.
95. Hajjar DP, Gotto AM. Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases. *Am J Pathol* 2013; 182(5):1474–81. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.010.
96. Minol J-P, Reinsch I, Luik M, Leferink A, Barth M, Assmann A et al. Reactive oxygen species and vascular degeneration. *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßschirurgie* 2018; 32(3):242–7. Verfügbar unter: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85045142557&doi=10.1007%2fs00398-018-0227-9&partnerID=40&md5=5c80be20534b052c806011934b9db89e>.
97. Aikawa E, Schoen FJ. Chapter 9 - Calcific and Degenerative Heart Valve Disease. In: Willis MS, Homeister JW, Stone JR, Hrsg. *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease*. San Diego: Academic Press; 2014. S. 161–80 Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124052062000090>.

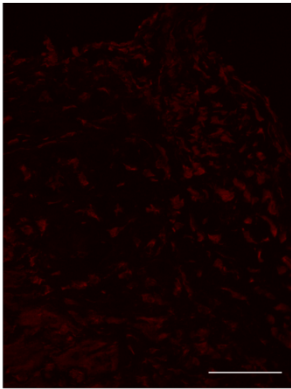
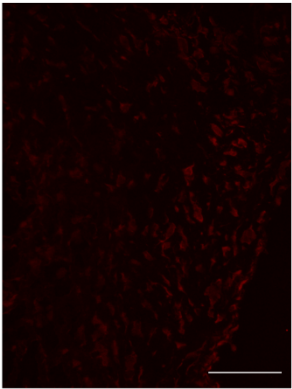
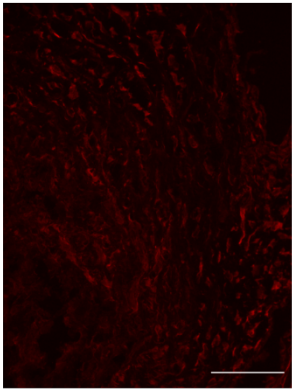
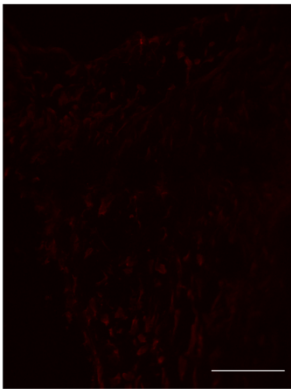
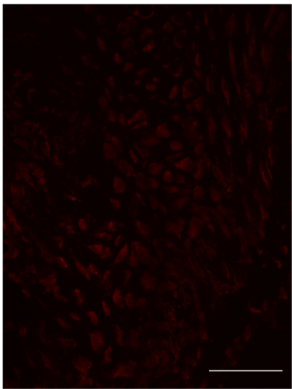
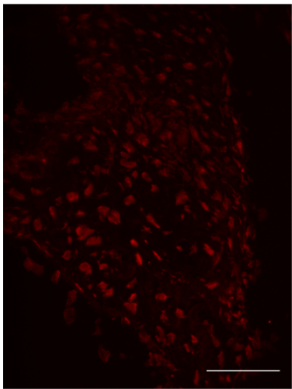
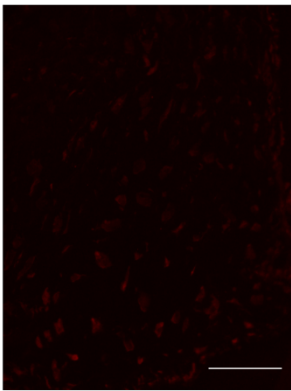
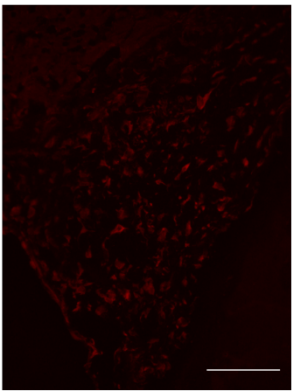
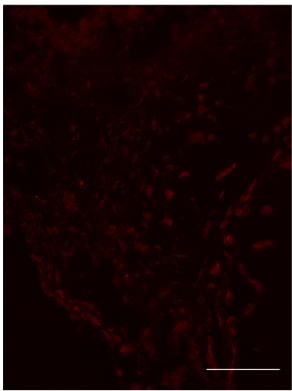
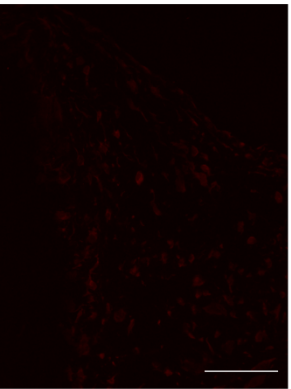
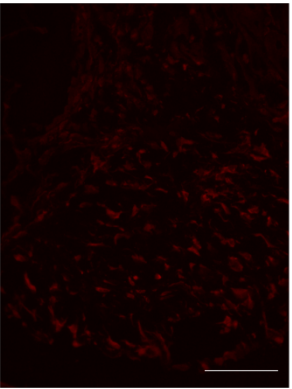
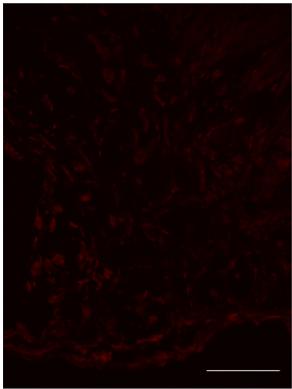
98. Yutzey KE, Demer LL, Body SC, Huggins GS, Towler DA, Giachelli CM et al. Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014; 34(11):2387–93. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189570>.
99. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* 2007; 171(5):1407–18. doi: 10.2353/ajpath.2007.070251.
100. Li P-F, Dietz R, Harsdorf R von. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Letters* 1997; 404(2-3):249–52. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00093-8.
101. Kvam E, Stokke T, Moan J. The lengths of DNA fragments light-induced in the presence of a photosensitizer localized at the nuclear membrane of human cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1990; 1049(1):33–7. doi: 10.1016/0167-4781(90)90081-c.
102. Martinet W, Knaapen MW, Meyer GR de, Herman AG, Kockx MM. Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering. *Circ Res* 2001; 88(7):733–9. doi: 10.1161/hh0701.088684.
103. Chakraborty A, Held KD, Prise KM, Liber HL, Redmond RW. Bystander effects induced by diffusing mediators after photodynamic stress. *Radiat Res* 2009; 172(1):74–81. doi: 10.1667/RR1669.1.
104. Rubio N, Fleury SP, Redmond RW. Spatial and temporal dynamics of in vitro photodynamic cell killing: extracellular hydrogen peroxide mediates neighbouring cell death. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2009; 8(4):457–64. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1039/B815343D>.
105. Klein SD, Walt H, Richter C. Photosensitization of isolated rat liver mitochondria by tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin. *Arch Biochem Biophys* 1997; 348(2):313–9. doi: 10.1006/abbi.1997.0437.
106. Rousset N, Kerninon E, Eléouet S, Le Néel T, Auget J-L, Vonarx V et al. Use of alkaline Comet assay to assess DNA repair after m-THPC-PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2000; 56(2-3):118–31. doi: 10.1016/S1011-1344(00)00053-1.
107. Yow C, Mak N, Szeto S, Chen J, Lee Y, Cheung N et al. Photocytotoxic and DNA damaging effect of Temoporfin (mTHPC) and merocyanine 540 (MC540) on nasopharyngeal carcinoma cell. *Toxicology Letters* 2000; 115(1):53–61. doi: 10.1016/S0378-4274(00)00174-0.
108. Melnikova VO, Bezdetnaya LN, Bour C, Festor E, Gramain M-P, Merlin J-L et al. Subcellular localization of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1999; 49(2):96–103. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134499000330>.
109. Foster TH, Pearson BD, Mitra S, Bigelow CE. Fluorescence anisotropy imaging reveals localization of meso-tetrahydroxyphenyl chlorin in the nuclear envelope. *Photochem Photobiol* 2005; 81(6):1544–7. doi: 10.1562/2005-08-11-RN-646.
110. Gondivkar SM, Gadbail AR, Choudhary MG, Vedpathak PR, Likhitar MS. Photodynamic treatment outcomes of potentially-malignant lesions and malignancies of the head and neck region: A systematic review. *J Investig Clin Dent* 2018; 9(1). doi: 10.1111/jicd.12270.
111. Ris HB, Altermatt HJ, Stewart CM, Schaffner T, Wang Q, Lim CK et al. Photodynamic therapy with m-tetrahydroxyphenylchlorin in vivo: optimization of the therapeutic index. *Int. J. Cancer* 1993; 55(2):245–9. doi: 10.1002/ijc.2910550213.
112. Luo D, Carter KA, Miranda D, Lovell JF. Chemophototherapy: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors. *Adv Sci (Weinh)* 2017; 4(1):1600106. doi: 10.1002/advs.201600106.

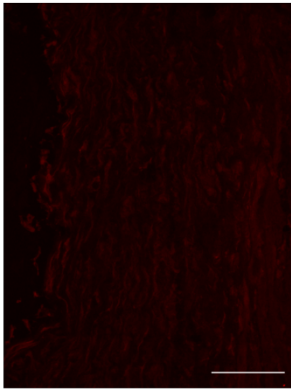
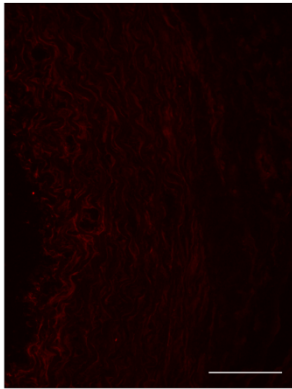
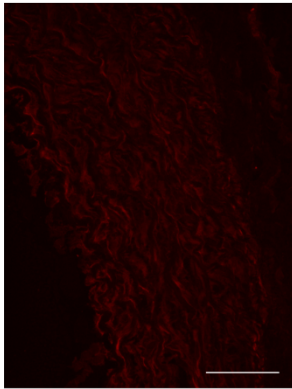
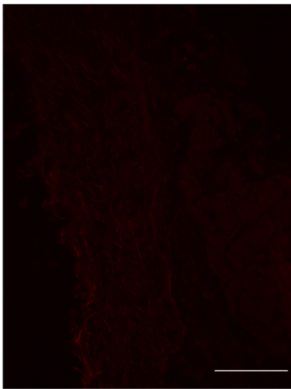
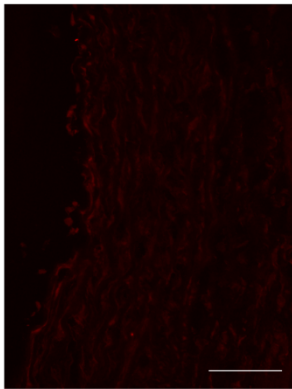
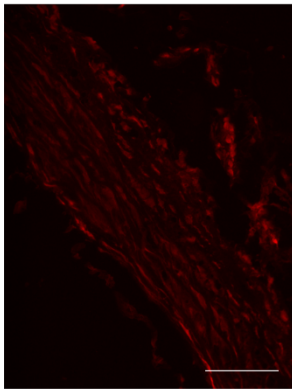
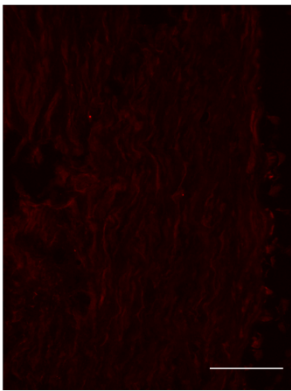
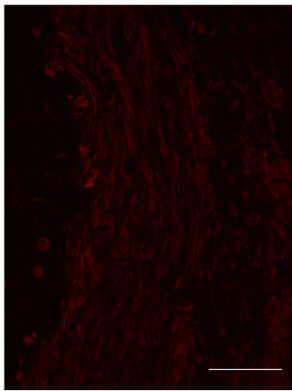
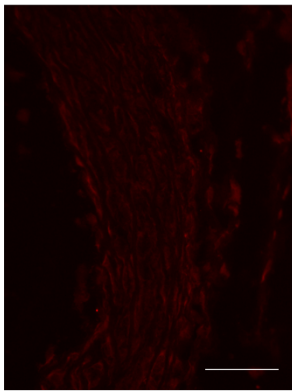
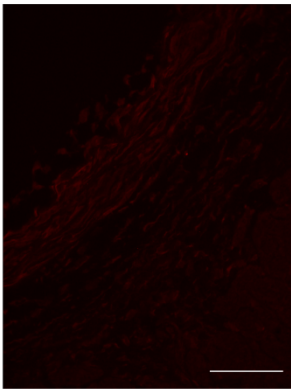
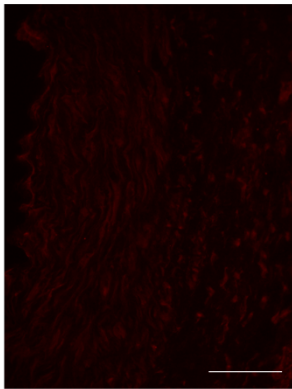
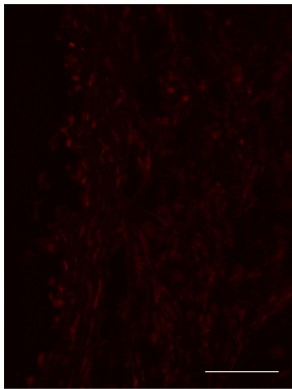
113. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2004; 73(1):1–28. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134403001507>.
114. McNair FI, Marples B, West CM, Moore JV. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells after photodynamic therapy using haematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydroxyphenylchlorin. *Br J Cancer* 1997; 75(12):1721–9. doi: 10.1038/bjc.1997.295.
115. Butcher JT, Tressel S, Johnson T, Turner D, Sorescu G, Jo H et al. Transcriptional profiles of valvular and vascular endothelial cells reveal phenotypic differences: influence of shear stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006; 26(1):69–77. doi: 10.1161/01.ATV.0000196624.70507.0d.
116. Mohty D, Pibarot P, Després J-P, Côté C, Arsenault B, Cartier A et al. Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008; 28(1):187–93. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.154989.
117. Michael-Titus AT, Whelpton R, Yaqub Z. Binding of temoporfin to the lipoprotein fractions of human serum. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 40(6):594–7. doi: 10.1111/j.1365-2125.1995.tb05805.x.
118. Westermann P, Glanzmann T, Andrejevic S, Braichotte DR, Forrer M, Wagnieres GA et al. Long circulating half-life and high tumor selectivity of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenylchlorin conjugated to polyethylene glycol in nude mice grafted with a human colon carcinoma. *Int. J. Cancer* 1998; 76(6):842–50. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980610)76:6<842::AID-IJC13>3.0.CO;2-4.
119. Schoen FJ. Morphology, Clinicopathologic Correlations, and Mechanisms in Heart Valve Health and Disease. *Cardiovasc Eng Technol* 2018; 9(2):126–40. doi: 10.1007/s13239-016-0277-7.
120. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994; 90(2):844–53. doi: 10.1161/01.CIR.90.2.844.
121. Sucosky P, Balachandran K, Elhammali A, Jo H, Yoganathan AP. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009; 29(2):254–60. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.176347.
122. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with site-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res* 2005; 96(7):792–9. doi: 10.1161/01.RES.0000161998.92009.64.
123. Tsang HG, Rashdan NA, Whitelaw CBA, Corcoran BM, Summers KM, MacRae VE. Large animal models of cardiovascular disease. *Cell Biochem Funct* 2016; 34(3):113–32. doi: 10.1002/cbf.3173.
124. Sugimura Y, Schmidt AK, Lichtenberg A, Assmann A, Akhyari P. A Rat Model for the In Vivo Assessment of Biological and Tissue-Engineered Valvular and Vascular Grafts. *Tissue Eng Part C Methods* 2017; 23(12):982–94. doi: 10.1089/ten.tec.2017.0215.

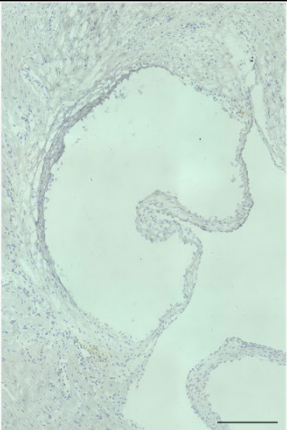
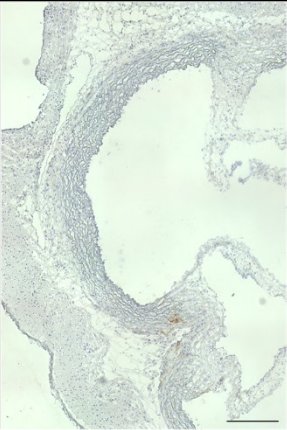
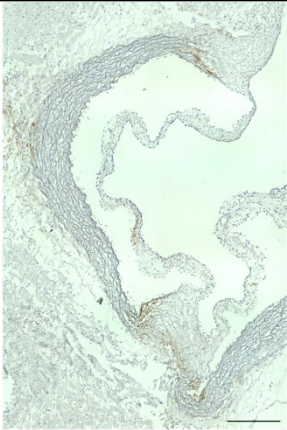
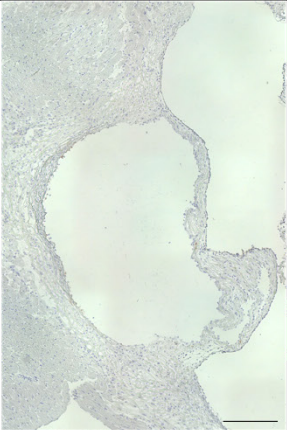
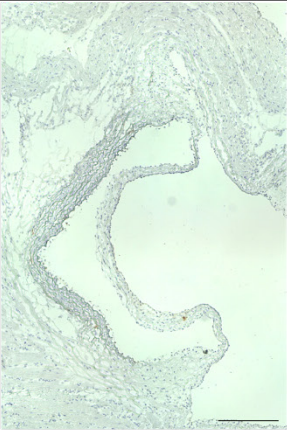
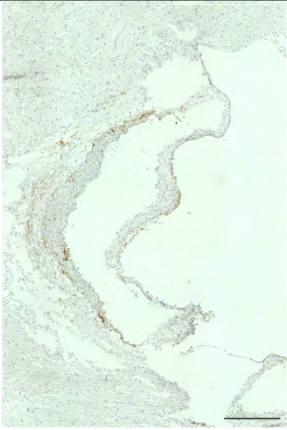
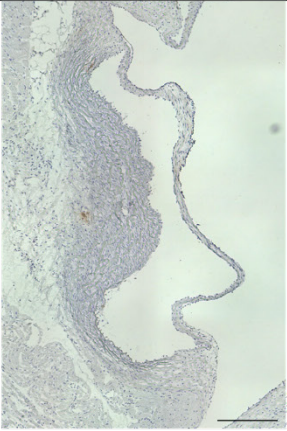
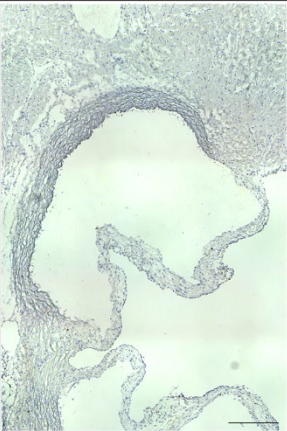
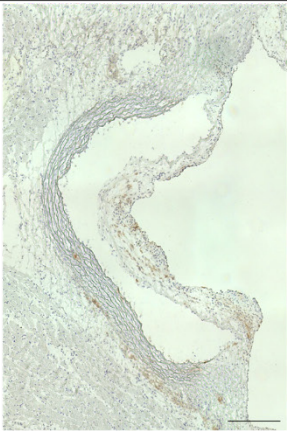
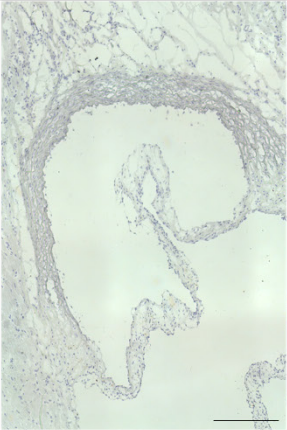
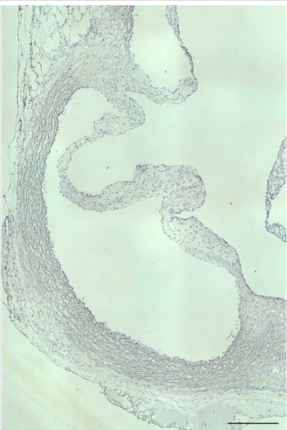
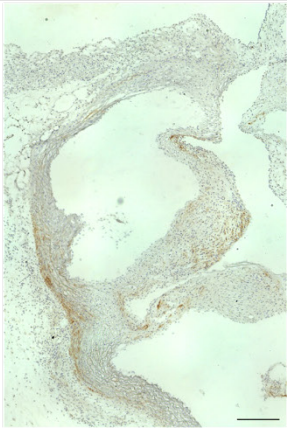
6 Anhang

A	Sham	Laser	ROS
t = 0 d, 10 min			
t = 0 d, 60 min			
t = 8 d, 10 min			
t = 8 d, 60 min			



C	Sham	Laser	ROS
t = 0 d, 10 min			
t = 0 d, 60 min			
t = 8 d, 10 min			
t = 8 d, 60 min			

D	Sham	Laser	ROS
t = 0 d, 10 min			
t = 0 d, 60 min			
t = 8 d, 10 min			
t = 8 d, 60 min			

F	Sham	Laser	ROS
t = 0 d, 10 min			
t = 0 d, 60 min			
t = 8 d, 10 min			
t = 8 d, 60 min			

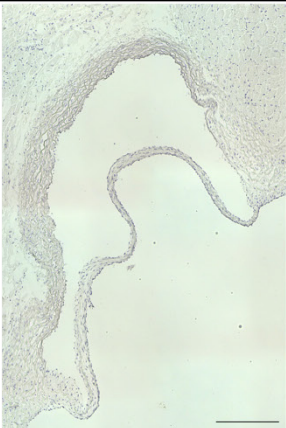
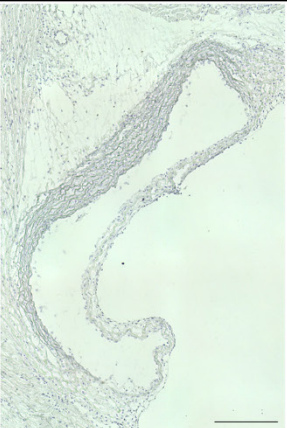
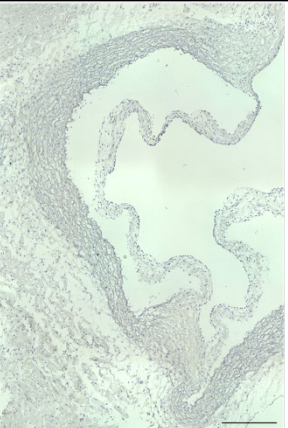
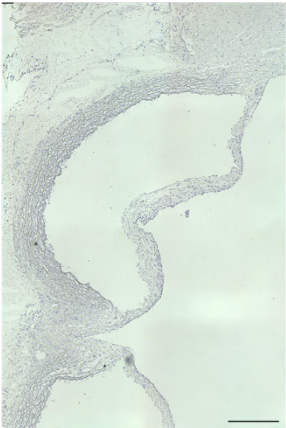
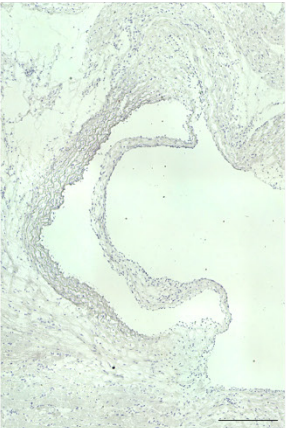
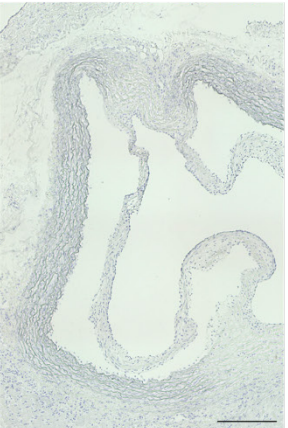
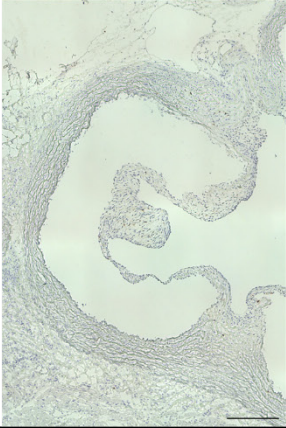
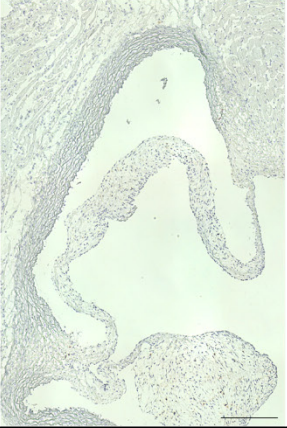
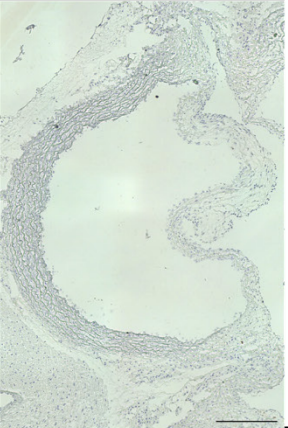
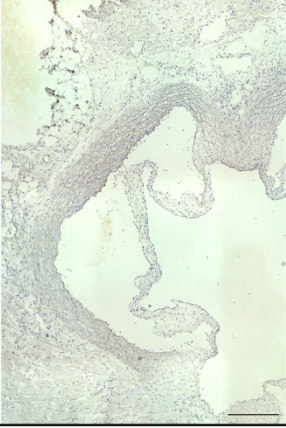
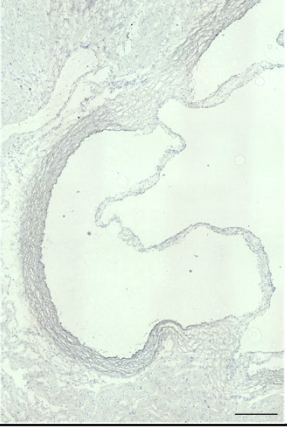
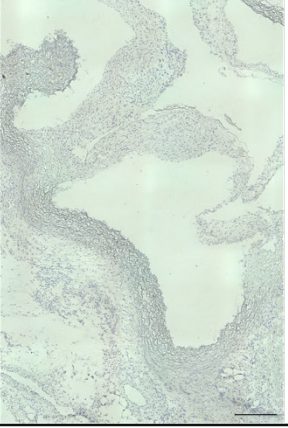
F	Sham	Laser	ROS
t = 0 d, 10 min			
t = 0 d, 60 min			
t = 8 d, 10 min			
t = 8 d, 60 min			

Abb. 26: Klappenübersicht der einzelnen Färbungen

Dargestellt sind Beispielbilder von Taschen aus jeder Versuchsgruppe in der HE-Färbung (**A**), der 8-OHdG-Färbung (**B-D**), der VCAM-1-Färbung (**E**) und der *Cleaved Caspase 3*-Färbung (**F**). In den Bildern der Durchlichtmikroskopie ist jeweils ein *Sinus valsalvae* mit der angrenzenden Tasche, dem Anulus und den Kommissuren dargestellt (**A, E, F**). Der Maßstabsbalken in diesen Übersichten entspricht 250 µm. Für die 8-OHdG-Färbung sind die drei Klappenstrukturen Tasche (**B**), Kommissur (**C**) und Anulus (**D**) in separaten Übersichten abgebildet. Hier entspricht der abgebildete Maßstabsbalken einer Länge von 50 µm.