

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

Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die osteochondrale
Differenzierung von valvulären Interstitialzellen (VICs), die
endotheliale Integrität sowie die Hämodynamik bei induzierter
degenerativer Aortenklappenstenose

Dissertation

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

vorgelegt von
Sarah Betke
2023

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

gez.: Sarah Betke

Dekan/in: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter/in: PD Dr. med. Verena Veulemans

Gewidmet meiner Familie und meinen Freunden.

Zusammenfassung

Neben verschiedenen anderen Risikofaktoren spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Progression der degenerativen Aortenklappenerkrankung eine wichtige Rolle. Mit der Intention, kontrolliert und fokal ROS freizusetzen, wurden männliche Wistar Ratten 24 Stunden vor einer einstündigen Rotlichtlaserbestrahlung (CW, 652nm, 1mW) der Aortenklappe mit dem Biosensibilisator Temoporfin (Foscan®, mTHPC) behandelt (ROS-Gruppe) und so einer photodynamischen Reaktion (PDR) ausgesetzt. Kontrollgruppen erhielten zum einen eine 60-minütige Laserbestrahlung ohne die vorherige Applikation von Temoporfin (Laser-Gruppe) und zum anderen nur die inaktivierte Laserfaser ohne Bestrahlung und Biosensibilisator (Sham-Gruppe), um etwaige Effekte durch den Laser selbst oder durch mechanische sowie anästhesiologische Manipulation ausschließen zu können.

Das Ziel der Arbeit war es, zelluläre und extrazelluläre Veränderungen der Aortenklappe durch lokalen Einfluss von oxidativen Stress über einen Zeitraum von bis zu 168 Tagen zu detektieren sowie die hämodynamische Relevanz dieser Veränderungen zu untersuchen.

Die Aortenklappen der verschiedenen Versuchsgruppen (n=7) wurden jeweils nach 0, 8, 84 und 168 Tagen explantiert und zur weiteren histologischen Analyse aufbereitet. Um die osteochondrale Proliferation und Dedifferenzierung valvulärer Interstitialzellen (VICs) zu untersuchen, wurde eine Sox 9 Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Das Signal ließ sich vor allem entlang der Kommissuren darstellen, während es im Taschen- und Anulusgewebe kaum nachzuweisen war. Dabei gab es keinen erkennbaren Unterschied zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen oder den verschiedenen Explantationszeitpunkten.

Der Endpunkt der Kalzifikation wurde semiquantitativ mittels der von Kossa Färbung analysiert. Nach 168 Tagen zeigte das Taschengewebe der ROS-Tiere signifikant mehr Verkalkung als das der Sham-Tiere ($p < 0,05$).

Um die endotheliale Integrität beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit dem von-Willebrand-Faktor (vWF) und Vimentin durchgeführt. Über alle Gruppen und Explantationszeitpunkte hinweg war eine durchgängige Endothelschicht in den Anulusbereichen der Aortenklappen darzustellen, die zu den Kommissuren hin diskontinuierlicher wurde. Die Taschen zeigten hingegen unabhängig von der jeweiligen Versuchsgruppe endotheliale Unterbrechungen.

Für die Beurteilung der hämodynamischen Veränderungen wurden vor den Interventionen sowie unmittelbar vor den Explantationen echokardiografische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde der transvalvuläre Druckgradient (mmHg) bestimmt, der mit dem Ausmaß einer Aortenklappenstenose und dem Blutfluss über die Klappe korreliert. Dieser war nach 168 Tagen in der ROS-Gruppe im Vergleich zu deren Kontrollgruppen signifikant erhöht (ROS vs. Sham $**p < 0,01$; ROS vs Laser $*p < 0,05$).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress einen Einfluss auf die Pathogenese der Aortenklappendegeneration haben könnten, da sie zu einer hämodynamisch relevanten Stenose mit morphologischer Evidenz einer Taschen-Kalzifikation führen.

Summary

Among other risk factors reactive oxygen species (ROS) play an important role in the progression of aortic valve degeneration. In order to gain a controlled focal induction of ROS-release, male Wistar rats were treated with the biosensitizer temoporfin (Foscan®) 24 hours before their aortic valves were irradiated with a red light laser for 60 minutes (ROS-group) and thus exposed to a photodynamic reaction (PDR). Controls received on the one hand laser irradiation without the application of temoporfin (Laser-group) and on the other hand an insertion of the deactivated laser fiber without irradiation and Foscan® (Sham-group) to identify potential side-effects due to mechanical and anaesthesiological manipulation.

The objective of this experiment was to detect cellular and extracellular alterations of the aortic valve by the local impact of oxidative stress over a period of 168 days.

Aortic valves were explanted 0, 8, 84 and 168 days after initial treatment (n=7) for further histological and immunofluorescence analyses which focused on the osteochondrogenic proliferation and dedifferentiation of valvular interstitial cells (VICs). Therefore, Sox-9 expression was analysed via immunofluorescence staining. Sox-9 signal further appeared among the commissures of the aortic valves while it was barely detectable in the cusps or annulus areas. There were no noticeable differences across the groups as well as across the explantation time points.

In an effort to analyse subsequent calcification, von Kossa staining was implemented and analysed semi-quantitatively with a scoring system. After 168 days, cusp tissue of ROS animals was significantly more calcified than cusps of the sham group ($p < 0,05$).

To evaluate endothelial integrity an immunofluorescence double-staining of von Willebrand factor (vWF) and Vimentin was performed. Over all groups and at any follow up time there was a consistent endothelial layer in annulus areas of the aortic valves. Endothelial integrity became interrupted towards the commissures. However, cusps of all groups showed endothelial discontinuation regardless of intervention.

The hemodynamic relevance of the induced aortic valve degeneration was echocardiographically measured and transvalvular pressure gradients [mmHg] were determined, correlating with the severity of aortic stenosis and the blood flow velocity across the valve. After 168 days, the ROS group displayed severe aortic valve stenosis in comparison to the control groups after 168 days (ROS vs. Sham $**p < 0,01$; ROS vs Laser $*p < 0,05$).

These results suggest that ROS release and oxidative stress have an impact on the pathogenesis of aortic valve degeneration as they lead to a hemodynamically significant stenosis with morphological evidence of cusp calcification.

Abkürzungsverzeichnis

A	Anulus
Abb.	Abbildung
aHT	arterielle Hypertonie (Bluthochdruck)
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i>
Art.-Nr.	Artikelnummer
α-SMA	<i>alpha smooth muscle cell actin</i>
BMI	Body-Mass-Index
BMP2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
cm	Centimeter
cm²	Quadratcentimeter
CT	Computertomografie
d	<i>day</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DAVD	Degenerative Aortenklappenerkrankung (<i>degenerative aortic valve disease</i>)
EndMT	endotheliale zu mesenchymale Transformation
Eppi	Eppendorf-Reaktiongefäß
g	Gramm
HIF-1	Hypoxie-induzierter-Faktor 1
H₂O₂	Hydrogenperoxid
i.v.	intravenös
J	Joule
K	Kommissur
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Laser-Gruppe
(ox-) LDL	(oxidiertes) <i>Low Density</i> Lipoprotein
LVOT	Linksventrikulärer Ausflusstrakt
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm²	Quadratmillimeter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
mTHPC	meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (Temoporfin, Foscan®)
M \pm SEM	Mittelwert \pm Standardfehler (<i>mean and standard error of mean</i>)

NaCl 0,9%	0,9%-ige Natriumchlorid-Lösung
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>nitric oxide synthase</i>)
O₂	elementarer Sauerstoff
O₂⁻	Superoxid-Anion
OH⁻	Hydroxyl-Radikal
ONOO⁻	Peroxynitrit
OP	Operation
OT	Objektträger
p	p-Wert
p*	p-Wert < 0,05
p**	p-Wert < 0,01
p***	p-Wert < 0,001
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDR	photodynamische Reaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
R	ROS-Gruppe
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RunX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
s	Sekunde
S	Sham-Gruppe
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
(V)SMCs	<i>(vascular) smooth muscle cells</i>
SM22α	<i>smooth muscle protein 22-alpha</i>
SOD	Superoxiddismutasen
Sox9	<i>Sry-related HMG box 9</i> (Chondrozyten-spezifischer Transkriptionsfaktor)
t	Zeit
T	Tasche
TAVI	<i>transcatheter aortic valve implantation</i>
V	Blutdurchflussgeschwindigkeit (<i>velocity</i>)
VICs	Valvuläre Interstitialzellen (<i>valvular interstitial cells</i>)
Vol.-%	Volumenprozent
vWF	von Willebrand Faktor
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Δp	Transvalvulärer Druckgradient (<i>pressure gradient</i>)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Herzklappen	1
1.1.1 Herzklappenerkrankungen	2
1.1.2 Aufbau der Aortenklappe	2
1.1.3 Hämodynamik.....	4
1.2 Die degenerative Aortenklappenerkrankung (DAVD)	4
1.2.1 Definition	4
1.2.2 Epidemiologie	5
1.2.3 Risikofaktoren und Pathophysiologie.....	5
1.2.4 Klinische Relevanz	7
1.3 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies.....	9
1.3.1 Definition und Funktion.....	9
1.3.2 Rolle in der degenerativen Aortenklappenerkrankung.....	10
1.4 Vergleich Atherosklerose und degenerative Aortenklappenerkrankung.....	11
1.4.1 Endotheliale Dysfunktion	12
1.5 Photodynamische Reaktion (PDR)	13
1.5.1 Prinzip der PDR	13
1.5.2 PDR mit Temoporfin	14
1.6 Bisherige Tiermodelle	14
1.7 Ziele der Arbeit	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Studienaufbau.....	17
2.2 Modell.....	18
2.2.1 Tierversuch	18
2.2.2 Photodynamische Reaktion.....	19
2.2.3 Euthanasie und Gewebeexplantation	20
2.2.4 Probenaufbereitung	20

2.3	Histologie	21
2.3.1	Anfertigung histologischer Schnitte	21
2.3.2	Von Kossa Färbung	21
2.4	Immunfluoreszenzfärbungen.....	22
2.4.1	Sox 9.....	22
2.4.2	Vimentin und von-Willebrand-Faktor	23
2.5	Echokardiografie	24
2.6	Auswertung.....	25
2.6.1	Von Kossa Färbung	25
2.6.2	Sox 9.....	26
2.6.3	Vimentin und von-Willebrand-Faktor	27
2.6.4	Statistik	28
2.7	Eigenanteil der Methodik und Etablierungsarbeit	28
2.8	Material.....	29
2.8.1	Tierversuch	29
2.8.2	Materialliste.....	29
2.8.3	Antikörper.....	30
2.8.4	Software	30
2.8.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Osteochondrogene Zelldifferenzierung.....	33
3.1.1	Sox9 Immunfluoreszenzfärbung	33
3.1.2	Von Kossa Färbung	36
3.2	Endotheliale Integrität	39
3.3	Echokardiografie	41
4	Diskussion.....	44
4.1	Entwicklung eines neuartigen Tiermodells	44
4.1.1	Vergleich Anatomie Ratte Vs. Mensch	45
4.1.2	Die Photodynamische Reaktion als ROS-Induktor.....	45
4.2	ROS-bedingte VIC Aktivierung und Transformation.....	46
4.2.1	Expression osteochondrogener Marker – die Rolle von Sox9.....	46
4.2.2	Fibrose und Kalzifikation.....	48
4.3	Die Rolle von ROS und der endothelialen Integrität auf die Entwicklung der DAVD....	49

4.4	Hämodynamisches Monitoring – der transvalvuläre Druckgradient	51
4.5	Limitierungen der Arbeit	53
4.6	Schlussfolgerungen.....	54
5	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	55
5.1	Abbildungen.....	55
5.2	Tabellen	56
6	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	57

1 Einleitung

1.1 Herzklappen

Insgesamt besitzt das menschliche Herz vier Herzklappen, die durch die Sicherung eines unidirektionalen Blutflusses für die Aufrechterhaltung des Herz-Kreislauf-Systems von großer Bedeutung sind [1]. Dabei öffnen und schließen sie sich mit dem Herzschlag über 100.000 Mal am Tag [2, 3]. Sie liegen alle in der unbeweglichen Herz-Basis, oder auch fibröses Herz-Skelett genannt. Dazu gehören vier Faserringe (*Anuli fibrosi*), an denen die Herzklappen befestigt sind [1]. Die Herzvorhöfe werden durch jeweils eine Segelklappe (Atrioventrikularklappen) von den Herzkammern (Ventrikel) getrennt. Im rechten Herzen ist diese die Trikuspidal-, im Linken die Mitralklappe [4]. Diese sind durch große asymmetrische Segel gekennzeichnet, die am gesicherten Ende an den ringförmigen Anulus befestigt und am beweglichen Ende durch einen Apparat aus Sehnenfäden (*Chordae tendineae*) und Papillarmuskeln mit den Ventrikeln verbunden sind. Die Semilunar- bzw. Taschenklappen trennen die Herzkammern von den großen Arterien. Insgesamt wirkt ein umfangreicher repetitiver mechanischer Stress auf die Herzklappen, sodass die dynamische Funktion sowie die Langlebigkeit / Haltbarkeit von der komplexen und hochdifferenzierten Makro- und Mikrostruktur der Herzklappen abhängt [5-7].

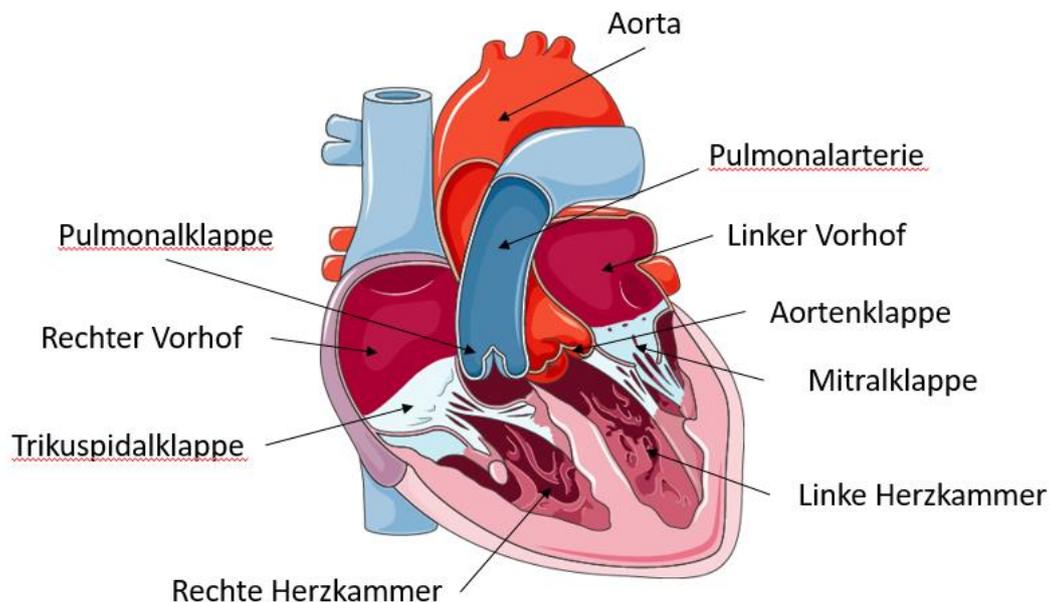


Abb. 1: Anatomischer Aufbau des Herzens.

Die Herzklappen sorgen für einen unidirektionalen Blutfluss. Die Vorhöfe werden durch die Mitralklappe bzw. Trikuspidalklappe von den Herzkammern getrennt, während die Aorten- bzw. Pulmonalklappe

die Herzkammern von den großen Arterien (Aorta und Pulmonalarterie) trennen. Die Abbildung wurde mit [8] erstellt.

1.1.1 Herzklappenerkrankungen

Als Herzklappenerkrankungen werden im klinischen Gebrauch diejenigen strukturellen Herzerkrankungen benannt, die mit einer Dysfunktion der Herzfunktion sowie einer Unterbrechung bzw. einer Veränderung des unidirektionalen Blutflusses innerhalb des Herzkreislauf-Systems einhergehen [8, 9].

1.1.2 Aufbau der Aortenklappe

1.1.2.1 Makroskopisch

Die Aortenklappe ist avaskulär und besteht aus drei Taschenklappen, die halbmondförmig über den fibrösen Anulus an der Aortenwurzel befestigt sind [10]. Die Anhaftungsstellen der Taschen an der Aortenwand werden Kommissuren genannt. Diese ertragen während der Herzaktion die größten mechanischen Kräfte [11]. Die drei Taschenklappen sind nach ihrer Ausrichtung bzw. Lokalisation zu den Abgängen der Koronararterien benannt: Die rechte koronare Tasche, die linke koronare Tasche und die nicht-koronare Tasche [2, 7, 12-14].

1.1.2.2 Mikroskopisch

Zusammenfassend besteht die Aortenklappe aus einer hoch organisierten extrazellulären Matrix (EZM) und valvulären Interstitialzellen (VICs), die von einer Schicht valvulärer Endothelzellen (VECs) umgeben sind [7]. Für die Klappenhaltbarkeit ist hierbei die intrinsische Architektur entscheidend. Die Taschenklappen lassen sich histologisch in drei Schichten (Laminae) einteilen (siehe Abbildung 2): Die zur aortalen Seite hin gelegene Lamina Fibrosa besteht aus parallel angeordneten Kollagenfasern. Sie trägt die größte Belastung. Die Lamina Ventrikularis ist zur linken Herzkammer hin gelegen und gewährleistet aufgrund einer hohen Dichte an Elastinfasern die Elastizität der Taschenklappen. Die zwischen diesen beiden Schichten liegende Lamina Spongiosa ist reich an Proteoglykanen und Glycosaminoglykanen und dient als Verschiebeschicht, die die Druckkräfte abpolstert und somit Bewegungen zwischen der Lamina Fibrosa und der Lamina Ventrikularis erleichtert [2, 6, 7, 12-18].

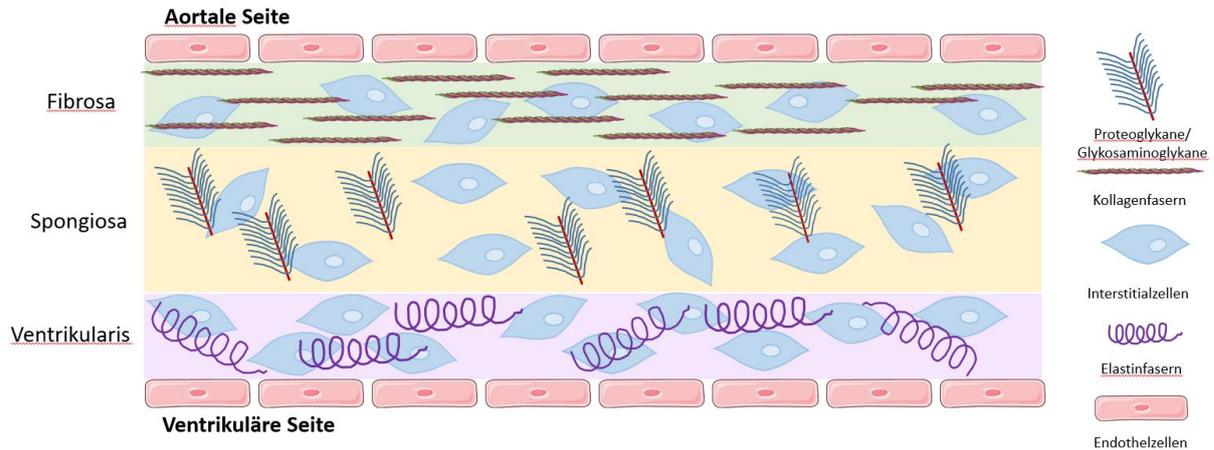


Abb. 2: Histologischer Aufbau der Aortenklappentaschen.

Das Gewebe der Taschenklappen ist dreischichtig aufgebaut. Auf der aortalen Seite ist die Lamina Fibrosa gelegen. Sie besteht aus parallel angeordneten Kollagenfasern. Die zu der Herzkammer gerichtete Lamina Ventrikularis ist reich an Elastinfasern und sorgt für die Elastizität des Gewebes. Die dazwischengelegene Lamina Spongiosa dient als Verschiebeschicht und beinhaltet Proteoglykane und Glykosaminoglykane. In allen drei Zellschichten sind valvuläre Interstitialzellen zu finden. Sowohl die aortale-, als auch die ventrikuläre Seite sind von einer einzelnen Schicht endothelialer Zellen umgeben. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [6, 17] und mit [19] erstellt.

Die VICs lassen sich in allen drei Zellschichten der Aortenklappentaschen finden [2, 10]. Sie sind durch die Sekretion der extrazellulären Matrix (EZM) für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität verantwortlich. In gesunden, adulten Aortenklappen liegen sie ruhend vor, exprimieren Vimentin und teilen somit phänotypische Charakteristika mit Fibroblasten. Im aktivierten Zustand (normalerweise < 5 % aller VICs) exprimieren sie molekulare Marker (α -SMA, *alpha smooth muscle cell actin*), die mit Phänotypen von Myofibroblasten bzw. glatten Muskelzellen (SMCs, *smooth muscle cells*) vereinbar sind [7, 13, 16, 20-22]. Insgesamt lassen sich fünf spezialisierte Typen von Interstitialzellen unterscheiden. Dazu zählen ruhende VICs (Aufrechterhaltung der Klappen-Physiologie) und aktivierte VICs (Regulation pathophysiologischer Zellantworten auf Schädigung oder Erkrankung des Klappengewebes) sowie Osteoblasten-ähnliche VICs, die für die Regulation von Knorpel- und Knochenaufbau (Chondro- und Osteogenese) verantwortlich sind. Zusätzlich sind noch embryonale VICs (Aufbau von Klappengewebe durch endotheliale zu mesenchymale Transformation während der Embryogenese) und Progenitor-VICs, die bisher von allen Typen am wenigsten beschrieben sind und eine heterogene Gruppe von Progenitorzellen darstellen, die wahrscheinlich in Reparaturprozessen von Bedeutung sind, beschrieben [21, 23].

Eine einzelne kontinuierliche Schicht von VECs überzieht die Taschenklappen von beiden Seiten [3]. Diese dient als schützende Barriere und bewahrt die darunterliegenden Zellschichten vor der Infiltration krankheitserregender Faktoren und Entzündungszellen. Die Endothelzellen sind mechanosensitiv und können parakrin Signale an die Interstitialzellen übertragen, um eine Aktivierung zu verhindern und somit adaptive Veränderungen der EZM-Homöostase zu vermitteln [10, 12-14, 16, 17, 21-25]. Durch eine endotheliale zu mesenchymale Transformationen (EndMT) können auch VECs sich ähnlich wie VICs zu Chondro- bzw. Osteoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren [16, 23, 26].

1.1.3 Hämodynamik

Die Herzklappen haben einen essenziellen Anteil an der Aufrechterhaltung eines unidirektionalen Blutflusses. Das Blut fließt im Herzen von den Vorhöfen (niedrige Drücke) in die Herzkammern (höhere Drücke) und von dort aus in die großen Arterien, um den Lungen- bzw. Körper-Kreislauf zu versorgen. Dabei weist das linke Herz höhere Druckverhältnisse als das rechte Herz auf [2, 7]. Zusammenfassend wirken während eines Herzzyklus drei grundlegende Belastungszustände auf das Klappengewebe: Biegung (durch aktive Klappenöffnung und -schließung), Scherstress (Blutfluss durch die geöffnete Klappe) und Spannung (wirkt auf die geschlossenen Klappen bei der Verhinderung der Blutrückflusses) [7, 15].

Bei der Aortenklappenstenose ist ein größerer Druck notwendig, um dasselbe Herzminutenvolumen pro Zeit auszuwerfen. Dies führt im Laufe der Zeit durch eine chronische Druckbelastung des linken Ventrikels zu einer Linksherzhypertrophie [27].

Die Darstellung von Veränderungen der Morphologie und der Hämodynamik kann mit Hilfe der Echokardiografie erfolgen [4, 28]. Diese Methode stellt die erste Wahl in der Diagnostik von Herzklappenerkrankungen dar, weil sie nicht invasiv, kostengünstig, akkurat und reproduzierbar ist [28].

1.2 Die degenerative Aortenklappenerkrankung (DAVD)

1.2.1 Definition

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (DAVD, *degenerative aortic valve disease*) äußert sich klinisch in einer progressiven Stenose der Aortenklappe. Diese beschreibt zunächst eine

Verdickung bzw. Verkalkung der Klappentaschen ohne Behinderung der Klappenbeweglichkeit und ohne signifikante Ausflussobstruktion (Aortenklappensklerose). Im Verlauf kommt es dann zu einer reduzierten systolischen Klappenöffnung, die mit einer linksventrikulären Ausflussobstruktion einhergeht (Aortenklappenstenose) [6, 12, 29, 30].

1.2.2 Epidemiologie

Die degenerative Aortenklappenerkrankung ist mit einem Anteil von 70,0 % die häufigste Herzklappenerkrankung und diejenige, die am häufigsten zum plötzlichen Herztod führt [6-8, 31-34]. Sie ist damit die Klappenerkrankung, die am häufigsten chirurgischer Intervention bedarf [6, 29, 31]. In den westlichen Industriestaaten ist sie hinter der koronaren Herzerkrankung und arteriellem Bluthochdruck die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung [2, 35, 36].

Die Inzidenz und Schwere der DAVD korrelieren hierbei mit dem Lebensalter. Die globale Inzidenz nicht rheumatischer Herzklappenerkrankungen ist in den Jahren von 1990 bis 2017 exponentiell um 45,1 % gestiegen. Dabei zeigt die altersstandardisierte Mortalitätsrate bei den über 70-Jährigen einen Anstieg von 15,4 % [8]. Es wird angenommen, dass bei Erhöhung des durchschnittlichen Lebensalters die Prävalenz der Patient:innen mit Aortensklerose um 1,5 % pro Jahr zunimmt [6, 27, 30, 37, 38]. Das allgemeine Mortalitätsrisiko der Aortenklappensklerose liegt bei 36,0 %, das Risiko für kardiovaskulär bedingte Todesfälle hingegen bei 69,0 %. Die Progressionsrate von einer Sklerose hin zur Aortenklappenstenose liegt bei 1,8 – 1,9 % pro Jahr [30].

Mit einer immer älter werdenden Bevölkerung (im Rahmen des demografischen Wandels) sowie globalem ökonomischem Wachstum wird die Anzahl nicht-rheumatischer Herzklappenerkrankungen weiter zunehmen und uns sowohl bezüglich des Managements, als auch ökonomisch vor Herausforderungen stellen [8].

1.2.3 Risikofaktoren und Pathophysiologie

Zu den Ursachen der DAVD zählt neben der altersbedingten Degeneration (81,9 %), die bikuspidale Aortenklappe als einer der häufigste angeborene Herzklappenfehler sowie rheumatische Herzerkrankungen [2, 8]. Insgesamt ist die Entstehung der degenerativen Aortenklappenerkrankung multifaktoriell bedingt. Dabei ähneln die Risikofaktoren denen der Atherosklerose [3, 6, 10, 11, 33, 39]. Dazu gehören Bluthochdruck, Nikotinabusus,

Fettstoffwechselstörungen (Hypercholesterinämie, Hyperlipoproteinämie, Hypertriglyzeridämie), Diabetes mellitus, männliches Geschlecht, das metabolische Syndrom sowie familiäre Häufung und chronische Niereninsuffizienz. Zu den assoziierten Komorbiditäten zählen unter anderem die koronare Herzerkrankung, die periphere arterielle Verschlusskrankheit, Karotisstenosen, vorangegangene Herzinfarkte und chronisch obstruktive Lungenerkrankungen [2, 14, 22, 31, 40].

Bei der DAVD handelt es sich um einen progressiven, aktiv regulierten Krankheitsprozess. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass die Pathophysiologie rein degenerativer Natur ist [2, 18, 32, 35, 41]. Dabei kann die Entwicklung der degenerativen Aortenklappenerkrankung in zwei Phasen eingeteilt werden (siehe Abbildung 3): In einer ersten Initiationsphase treten ähnliche pathophysiologische Prozesse wie bei der Atherosklerose in Form von Endothelschädigung und Inflammation auf. Diese werden durch mechanischen Stress ausgelöst. In einer zweiten Phase zeigt sich eine fortschreitende Fibrose und Verkalkung des Klappengewebes sowie aktive Knochenbildung, was im Verlauf zu einer Dysfunktion der Aortenklappe führt [2, 6, 7, 11, 18, 42, 43].

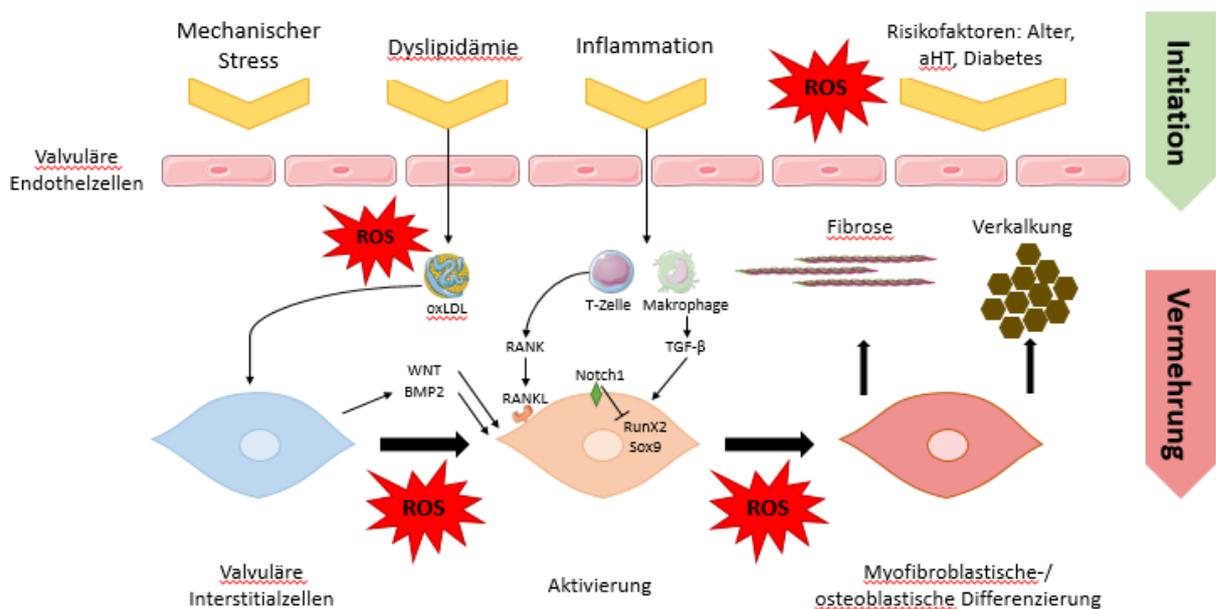


Abb. 3: Pathophysiologie der degenerativen Aortenklappenerkrankung.

Dargestellt sind die pathogenetischen Prozesse, die zu der Entwicklung einer degenerativen Aortenklappenerkrankung führen. In der Initiationsphase kommt es durch mechanischen Stress, Dyslipidämie, ROS und Inflammation sowie durch den Einfluss verschiedener Risikofaktoren zur Einwanderung von Entzündungszellen und Oxidation von Lipoproteinen (LDL). Dies führt über

verschiedene Signalwege zur Aktivierung valvulärer Interstitialzellen. In der Vermehrungsphase kommt es zur Transformation dieser VICs zu Myofibroblasten- und Osteoblasten-ähnlichen Zellen und dadurch zu einer fortschreitenden Fibrose und Verkalkung des Klappengewebes. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [14, 18, 22, 44] mit [19] erstellt.

Die Verkalkungsherde beginnen in der Lamina Fibrosa und treten initial vor allem an der Basis der Taschenklappen auf. Dieser ist der Punkt der maximalen Taschenklappen-Flexibilität, der dem größten mechanischen Stress ausgesetzt ist. Von dort aus breiten sie sich in Richtung der Klappenöffnung aus [2, 6, 11, 18, 45].

Auf zellulärer Ebene ist die DAVD durch die Aktivierung der Interstitialzellen mit phänotypischer Umwandlung in Osteoblasten-ähnliche, knochenaufbauende Zellen und Myofibroblasten-ähnliche Zellen charakterisiert [16, 46]. Diese führt zu einer erhöhten Zellproliferation und Induktion myofibroblastischer Marker (α -SMA und SM22 α , *smooth muscle protein 22-alpha*) [47]. Zusätzlich werden osteoblastisch-aktive Marker wie BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*), RunX2 (*runt-related transcription factor 2*), Sox9 (*sry-related HMG box 9*), Osteopontin, Osteocalcin und alkalische Phosphatase exprimiert. Somit sind Regulationswege, wie sie bei der Knochenmineralisierung im Skelettsystem auftreten, aktiviert [7, 22, 25, 36, 45, 48]. In vitro unterziehen sich isolierte Interstitialzellen nicht-stenotischer Aortenklappen unter Stimulation mit osteogenen Mediatoren der Transdifferenzierung zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen [49, 50] und reagieren mit einer Hochregulation der oben genannten osteochondrogenen Marker [51, 52].

1.2.4 Klinische Relevanz

Die DAVD präsentiert sich über eine lange Zeit symptomarm. Nach Entwicklung einer klinisch relevanten Stenose mit Ausflussbehinderung und Linksherzhypertrophie präsentieren sich dann im Verlauf Symptome einer Linksherzinsuffizienz in Form von Luftnot, Brustschmerzen/Angina und Synkope [7, 53]. Innerhalb der langen asymptomatischen Krankheitsphase ist das Überleben dem der Normalbevölkerung ähnlich. Nach dem Eintreten der ersten Symptome beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung betroffener Patient:innen ohne chirurgische Intervention nur noch drei Jahre bzw. geht der Symptombeginn mit einer Mortalität von 50,0 % innerhalb der ersten 2 Jahre einher. [12, 18, 32, 54, 55]

Der klinische Goldstandard zur Diagnostik und Detektion der DAVD ist die transthorakale Echokardiografie. Über die Bestimmung von Parametern wie der Klappenöffnungsfläche (< 1

cm², Normalbefund: 3 – 4 cm²), der aortalen Ausflussgeschwindigkeit und des transvalvulären Druckgradienten (Δp , *pressure gradient*) kann die Schwere der Erkrankung abgeschätzt werden. Eine milde Aortenklappenstenose existiert bei aortalen Ausflussgeschwindigkeiten von 2,6 – 3,0 m/s und einem Δp von < 20 – 25 mmHg. Eine mittelgradige Aortenklappenstenose liegt bei aortalen Ausflussgeschwindigkeiten von 3 – 4 m/s und einem Δp zwischen 20 und 45 mmHg vor. Ab aortalen Ausflussgeschwindigkeiten > 4 m/s und einem Δp > 40 – 45 mmHg spricht man von einer schweren Aortenklappenstenose [18, 53, 56, 57]. Die echokardiografische Abgrenzung der Aortenklappensklerose zur -stenose erfolgt über die Messung der Klappendicke bzw. -Echogenität und Bestimmung der transvalvulären Strömungsgeschwindigkeit. Eine hämodynamische Relevanz der Ausflussobstruktion liegt bei Werten von > 2,0 – 2,5 m/s vor [30].

Im Verlauf der Zeit haben sich weitere mögliche diagnostische bildgebende Verfahren gezeigt: So ist z.B. die Computertomografie (CT) sensitiver bezüglich der Visualisierung und Quantifizierung aortaler Kalkablagerungen als die Echokardiografie [6, 10]. Eine Kombination aus Positronen-Emissions-Tomografie (PET) und CT ermöglicht ebenfalls eine Quantifizierung sowie die simultane Darstellung früher Verkalkungs- und Entzündungsherde und somit die Vorhersage der Krankheitsprogression [58].

Insgesamt unterscheidet sich der Schweregrad der DAVD, der mit dem Ersteintritt von Symptomen einhergeht, von Individuum zu Individuum. So können einige Patient:innen trotz einer hämodynamisch relevanten und schweren Erkrankung Jahre lang asymptomatisch bleiben [59].

Die aktuelle Therapie der Wahl bei symptomatischer und hämodynamisch relevanter DAVD ist die Implantation einer Klappenprothese [11, 60]. Diese ist in den westlichen Industriestaaten die zweithäufigste durchgeführte Herzoperation [2, 7]. Hierbei erhalten ca. 275.000 Patient:innen/ Jahr eine neue Herzklappe [60]. Die Indikationen bestehen aus dem Auftreten klinischer Symptome, ventrikuläre Dysfunktion oder Belastungs-/ Stressintoleranz bei asymptomatischen Patient:innen[53].

Der Klappenersatz kann mechanisch (20,5 %) oder biologisch (78,4 %) erfolgen. Mechanische Herzklappen sind langfristig haltbar und werden deshalb bevorzugt bei jüngeren Patient:innen < 60 Jahren verwendet. Allerdings erfordern diese bei dem Risiko für thrombembolische Komplikationen eine lebenslange Antikoagulation. Der biologische Herzklappenersatz hat nur

eine limitierte Haltbarkeit von durchschnittlich 15 Jahren und wird darum eher bei Patient:innen > 70 Jahren verwendet, da so die Risiken der Antikoagulation vermieden werden können. Die chirurgische Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI, *transcatheter aortic valve implantation*) wird bei Patient:innen mit schwerer symptomatischer Aortenklappenstenose und hohem chirurgischen Risiko empfohlen [59-61].

Insgesamt herrscht ein Mangel an adäquaten effektiven medikamentösen Therapieoptionen, die die Progression der DAVD verlangsamen oder aufhalten könnten [18, 62, 63]. Die interventionellen- bzw. chirurgischen Eingriffe sind vor allem bei älteren Patient:innen > 70 Jahre, vaskulären Vorerkrankungen, einer Ejektionsfraktion < 30 % und/ oder einem erhöhten BMI (Body-Mass-Index) mit einer signifikant erhöhten Morbidität, Mortalität und Gesundheitskosten verbunden. Patient:innen, die wegen ihres erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrisikos als ungeeignet für eine interventionelle- / operative Therapieoption eingestuft werden, bleibt aktuell nur eine palliative Behandlung [37, 54, 61].

Ein Anstieg des Durchschnittsalters sowie der Anzahl der Hochrisikopatient:innen mit einer vermehrten Anzahl an Komorbiditäten [54] machen daher die Untersuchung früher pathophysiologischer Veränderungen der DAVD und die damit einhergehender Detektion möglicher therapeutischer Angriffspunkte notwendig.

1.3 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

1.3.1 Definition und Funktion

Unter homöostatischen Bedingungen herrscht ein Ausgleich zwischen der Anzahl freier Radikale und deren Elimination [64-66]. Oxidativer Stress beschreibt eine Störung / Unterbrechung dieser Homöostase bzw. ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Regulationswegen mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Relation zu den antioxidativen Gegenmechanismen [40, 64-68]. Dabei können Risikofaktoren wie Nikotin- und Alkoholabusus, Ernährung, Abgase, schwere körperliche Belastung und metabolische Abnormalitäten zu erhöhtem oxidativen Stress führen [40].

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) bilden eine Familie von Molekülen, die elementaren Sauerstoff und all seine Derivate umfasst und in aeroben Zellen produziert wird. Dazu zählen freie Radikale wie Superoxid-Anionen (O₂⁻), Hydroxyl-Radikale (OH⁻) und Stickstoffmonoxid (NO) sowie nicht-radikalische Spezies wie Hydrogenperoxid H₂O₂ und

Peroxynitrit (ONOO-) [40, 69]. Hierbei stellen die mitochondriale Atmungskette, Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen (Arachidonsäure metabolisierende Enzyme), Cytochrom P450, die Xanthinoxidase, NADP(H)-Oxidasen (Generierung von ROS durch Katalysierung des Elektronentransfers von NADPH zu O₂), Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS, *nitric oxide synthase*, Katalysierung der Reaktion von L-Arginin und O₂ zu NO und L-Citrullin), Peroxidasen und andere Hämproteine (Katalysierung der Reduktion von O₂ zu O₂⁻) enzymatische ROS-Quellen dar [50, 70-72]. Innerhalb des kardiovaskulären Systems sind drei ROS-Quellen von Bedeutung: Die entkoppelte Stickstoffmonoxid-Synthase, NADP(H)-Oxidasen und Mitochondrien [66, 73].

In physiologischen Konzentrationen regulieren ROS das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, -alterung und -migration sowie die Apoptose und Autophagie. Zusätzlich modulieren sie eine Reihe metabolischer Prozesse wie die Glykolyse, die oxidative Phosphorylierung und die Fettsäuresynthese [50, 66, 72-74]. Freie Radikale sind schädlich, wenn sie im Überfluss vorliegen. Effekte oxidativen Stresses sind u.a. die Peroxidation von Fetten, die Degradation von Proteinen und DNA-Schäden (Zucker- und Basenmodifikationen und Strangbrücke) [64-66, 70, 75-78]. Somit besitzen reaktive Sauerstoffspezies mit der Förderung von Zelladaptationsmechanismen auf der einen Seite sowie Zellschädigung auf der anderen Seite eine duale Funktion [74].

Zusammenfassend kann bei kardiovaskulären Erkrankungen eine erhöhte Belastung oder auch eine insuffiziente Energieversorgung der Kardiomyozyten eine Imbalance zwischen Energieversorgung und -bedarf verursachen. Dies resultiert in einem erhöhten Zellmetabolismus, was zu einem Anstieg von ROS-Konzentrationen und somit zur Schädigung der Herzzellen führen kann [79, 80].

1.3.2 Rolle in der degenerativen Aortenklappenerkrankung

Verschiedene Studien legen nahe, dass oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Entwicklung früher (extra-)zellulärer Veränderungen der DAVD spielt [78, 81] und mit der Schwere der Aortenklappenstenose korreliert [73, 82]. Diese ist durch progressive fibrokalzifizierende Umbauprozesse der Aortenklappen gekennzeichnet und kann als aktiv regulierter Prozess mit ROS-induzierter Dedifferenzierung von VICs in Osteoblasten-ähnliche Zellen verstanden werden [73].

In explantierten humanen Aortenklappen sind die Superoxid- und Hydrogenperoxid-Level in Bereichen von Kalkablagerungen deutlich erhöht [83]. Zusätzlich zeigt sich eine deutliche Verringerung der Expression und Aktivität antioxidativer Enzyme wie der Superoxiddismutasen (SOD), der Katalase sowie der NADP(H)-Oxidasen 2 und 4 [50, 73, 81, 84]. Im Gegensatz dazu, weisen nicht verkalkte Bereiche stenosierter Aortenklappen ähnlich niedrige Superoxid- und H₂O₂-Konzentrationen wie das Gewebe gesunder Klappen auf [17, 81]. Branchetti et. al. zeigen in Aortenklappengewebe von Patient:innen mit pathologischer Klappenfunktion eine ortsspezifische Anreicherung von 3-Nitrotyrosin (indirekter Nachweis oxidativen Stresses) in der Fibrosa sowie oxidativer Schäden in verkalkten Klappenbereichen [78]. Außerdem wird eine Akkumulation von Markern früher osteogener Zell-Differenzierung (RunX2) nachgewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass VICs in sklerotisch und stenotisch veränderten Aortenklappen eine beeinträchtigte-/ verminderte Reparaturantwort auf oxidativ verursachte DNA-Schäden besitzen, da nach adenoviraler Transduktion antioxidativer Enzyme (SOD und Katalase) eine Reduktion der pro-osteoblastischen Marker beobachtet werden konnte.

Auch in tierexperimentellen Versuchsreihen sind nach cholesterinreicher und Vitamin D-haltiger Diät die ROS-Konzentrationen in verkalkten Taschenbereichen erhöht. In vitro fördert oxidativer Stress die Osteogenese vaskulärer Zellen [6, 81, 84].

1.4 Vergleich Atherosklerose und degenerative Aortenklappenerkrankung

Viele Studien suggerieren ähnliche pathophysiologische Prozesse in der DAVD wie sie auch in der Pathogenese der Atherosklerose vorkommen. Zum einen teilen beide Erkrankungen ähnliche epidemiologische Risikofaktoren wie höheres Lebensalter, männliches Geschlecht, Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörungen und Diabetes mellitus [3, 6, 10, 11, 33, 39]. Zum anderen wurden in bestimmten Untersuchungen humaner stenotischer Aortenklappen ähnliche Läsionen (Entzündungszellen, Lipid- und Kalkablagerungen) identifiziert, wie sie auch in atherosklerotischen Plaques vorkommen [11, 18, 42, 85]. Außerdem konnten Assoziationen zwischen valvulären Kalkablagerungen und atherosklerotischen Formationen in den Koronararterien sowie in der Aorta dargestellt werden [39, 86]. In der DAVD konnten Myofibroblasten-ähnliche Zellen nachgewiesen werden, die eine pro-osteoblastische Differenzierung aufweisen. Diese zeigen eine phänotypische Ähnlichkeit zu vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC, *vascular smooth muscle cells*), die sich unter dem Einfluss von

oxidativem Stress und ROS ebenfalls zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren und verschiedene osteogene Moleküle exprimieren können [11, 18, 48, 87-90].

Jedoch gibt es auch deutliche Unterschiede zwischen der DAVD und der Atherosklerose hinsichtlich bestimmter pathogenetischer Mechanismen, der Rolle degenerativer Prozesse und der aktiven Regulation von Initiierung und Progression der Verkalkungsprozesse [6, 10, 18, 85]. So treten Letztere in der Aortenklappendegeneration früher auf und stellen ein deutlicheres Merkmal in der Pathogenese der Erkrankung dar, als es bei der Atherosklerose der Fall ist. Sie ist durch eine allmähliche Progression mit zunehmender linksventrikulärer Ausflussbehinderung charakterisiert, während Ereignisse bei Patient:innen mit Atherosklerose, z.B. der Koronararterien, akut auftretend und im Zusammenhang mit einer Plaqueruptur und der damit verbundenen Thrombenbildung und Gefäßokklusion stehen [18].

1.4.1 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel ist ein aktives Gewebe, das in der Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Homöostase, der Regulation des Vasotonus und der Gewebsperfusion, der vaskulären Permeabilität, der myokardialen Funktion und der antikoagulativen Aktivität eine essenzielle Rolle spielt [67, 69, 91]. Die endotheliale Dysfunktion dient hier als Sammelbegriff verschiedener pathologischer Zustände und ist durch den Verlust von NO innerhalb der Gefäßwand charakterisiert [69, 92]. Dysfunktionales- bzw. erkranktes Endothel zeigt dabei pro-oxidative, pro-inflammatorische, pro-thrombotische und vasokonstriktorische Eigenschaften [67].

Poggianti et. al. zeigen durch eine signifikant verminderte flussvermittelte Dilatation eine Assoziation zwischen Aortenklappensklerose und einer systemischen endothelialen Dysfunktion [93]. Auch andere Forschungsgruppen beschreiben eine Endothelschädigung als Folge wiederholter mechanischer Belastung der Aortenklappe als Haupttriebkraft und primäres Ereignis in der Initiationsphase der DAVD [3, 14, 46]. Die Funktion der VICs ist durch eine einzelne Schicht valvulärer Endothelzellen reguliert. Sie dient als physikalische Barriere und schützt dabei das darunterliegende Gewebe vor hämodynamischem Stress und vor der Infiltration zirkulierender Faktoren [23, 25, 94]. Zusätzlich hat sie einen hemmenden Effekt auf die Aktivierung der Interstitialzellen [95]. Zum gleichen Ergebnis kommen Honda et. al. [96] in einem experimentellen Mausmodell, in dem die mechanische Abtragung der schützenden Endothelschicht zur Induktion der Aortenklappenverkalkung führt. Hierbei

scheint das von den VECs produzierte NO ein wichtiger Vermittler zu sein, um die valvuläre Homöostase durch parakrine Modulation der VICs aufrechtzuerhalten [14, 24, 73, 81, 83]. So wirkt es präventiv auf die Kalzifikation von VICs und führt zu einer reduzierten Formation von Kalkablagerungen [24, 83].

Oxidativer Stress zählt zu einem der Faktoren, die eine Endothelzellschädigung verursachen können [83, 97]. So tragen ROS und vor allem Superoxid-Anionen durch die Inaktivierung von NO zur endothelialen Dysfunktion bei [50, 65, 69, 75, 83, 98]. Dabei ist die NO-Bioverfügbarkeit anti-proportional mit der Konzentration von ROS korreliert [26, 94].

1.5 Photodynamische Reaktion (PDR)

1.5.1 Prinzip der PDR

Das Prinzip der photodynamischen Reaktion (PDR) ist das Aufeinandertreffen eines Photosensibilisators gefolgt von einer Laser-Bestrahlung einer bestimmten Wellenlänge, die auf den Absorptionsbereich des jeweiligen Photosensibilisators angepasst ist. Dieser wird dadurch von einem Grundzustand (*singlet* oder *ground state*) in einen erregten Zustand (*triplet state*) gebracht [99, 100]. Der erregte Zustand kann daraufhin zwei unterschiedliche Reaktionen zeigen: Die sogenannte Typ I Reaktion beschreibt die direkte Reaktion des Photosensibilisators mit einem Substrat bzw. Lösungsmittel durch Wasserstoff- oder Elektronenübertragung. Dadurch entstehen Radikale, die nach Wechselwirkung mit Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugen können. Die Typ II Reaktion ist der direkte Energietransfer auf elementaren Sauerstoff, der zur Bildung von Superoxid, einer hoch reaktiven Sauerstoffspezies, führt [99, 101].

Die PDR findet an dem Ort statt, an dem Sensibilisator, Laserbestrahlung mit optimaler Wellenlänge und Sauerstoff gleichzeitig vorhanden sind [99, 101]. Sauerstoff hat nach seiner Aktivierung einen sehr kleinen Aktions-/ Migrationsradius von $< 0,02 \mu\text{m}$. Der initiale Zell- und Gewebeschaden ist somit sehr nah mit der Lokalisation des Photosensibilisators verbunden und tritt relativ zeitnah zur Produktion von ROS auf [99, 102].

Dieser Effekt wird in der photodynamischen Therapie lokalisierter Tumoren genutzt [100]. Die verschiedenen Photosensibilisatoren unterscheiden sich hierbei bezüglich des Zeitintervalls zwischen Verabreichung und der maximalen Gewebekonzentration sowie hinsichtlich der jeweiligen Geweberetention. Dabei haben die Unterschiede in der Aufnahme und Ausscheidung wichtige Auswirkungen auf den Effekt der photodynamischen Therapie [99].

Das Zeitintervall zwischen Gabe des Sensibilisators und der Laserapplikation beeinflusst die Bioverteilung und konsequenterweise die Mechanismen der PDR-induzierten Gewebszerstörung [100, 103, 104].

1.5.2 PDR mit Temoporfin

Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) bzw. Temoporfin (Foscan®) ist ein Biosensibilisator mit definierter chemischer Struktur und einem großen Erregungskoeffizienten bei Wellenlängen von 652 nm (rotes Licht) [100, 104, 105]. Temoporfin ist aktuell einer der aktivsten und potentesten Photosensibilisatoren der zweiten Generation, da er auch bei geringen Medikamenten- (0,15 mg/kg Körpergewicht) und Lichtdosen (10 – 20 J/cm²) wirksam ist [102, 106, 107].

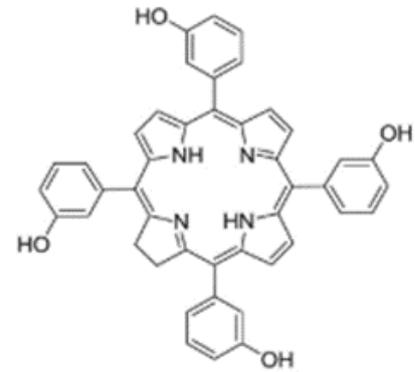


Abb. 4: Chemische Struktur von Temoporfin (mTHPC, Foscan®).

Direkt nach Applikation zeigt mTHPC die höchste Plasmakonzentration. Eine rasche Gewebsakkumulation zeigt sich vor allem in Geweben des retikuloendothelialen Systems (Leber und Milz), aber auch im Herzen und in den Nieren, mit Erreichen eines Spitzenwertes 24 – 48 Stunden nach der Verabreichung. Die höchste Wirksamkeit der PDR mit Temoporfin wird hierbei bei Verteilungsintervallen von sowohl zwei bis vier Stunden, als auch von 24 Stunden demonstriert [107]. Cramers et. al. und Morlet et. al. gelangen in der Untersuchung der Pharmakokinetik von Foscan® zu ganz ähnlichen Ergebnissen [100, 105]. In beiden Studien zeigt sich der größte Effekt der photodynamischen Therapie bei Zeitintervallen von 24 Stunden zwischen Verabreichung und Laserbestrahlung. Kübler et. al. dokumentieren in einem tierexperimentellen Rattenmodell bei m-THPC Dosierungen von 0,3 mg/kg, einem Intervall von 24 h und einer Lichtdosis von 20 J/cm² die signifikantesten histologischen Veränderungen [108].

1.6 Bisherige Tiermodelle

Zusammenfassend werden in der Forschung experimentelle Tiermodelle genutzt, um frühe pathophysiologische Veränderungen verschiedener Erkrankungen, deren Verlauf und Krankheitsprogression sowie Effekte neuartiger Therapien zu untersuchen [6].

In einem „klassischen“ Tiermodell zur Induktion einer Aortenklappenstenose wurde von verschiedenen Forschungsgruppen bei Hasen, die über einen Zeitraum von zwei bis sechs Monaten cholesterinreiche Nahrung mit oder ohne der Hinzugabe von Vitamin D erhalten haben, eine Proliferation von VICs mit Formation von Knochenmatrix und Verkalkung der Aortenklappen mit reduzierter systolischer linksventrikulärer Funktion beobachtet [109-111]. In einem Mausmodell gelang die Induktion einer DAVD durch direkte mechanische Verletzung der Aortenklappentaschen mit Hilfe eines Federführungsdrahtes. Dieser wurde ultraschallgestützt über die rechte Arteria carotis communis der Versuchstiere eingebracht und verursachte in den verletzten Aortenklappen über histologische Veränderungen in Form von Verdickung der Klappentaschen mit osteochondrogenen Veränderungen und Kalkeinlagerungen eine hämodynamisch relevante Stenose [96].

Ein anderes tierexperimentelles Versuchsmodell untersuchte in einem nicht-mechanischen Ansatz die Pathophysiologie von Endothelzellschädigung. So wurde in der Femoralarterie von Mäusen durch eine photodynamische Reaktion zwischen einem systemisch verabreichten Photosensibilisator (Rose Bengal) und einem transluminal appliziertem Grünlicht-Laser (Wellenlänge 540 nm) eine Endothelzellschädigung mit Neointimabildung beobachtet [112]. Pérez et. al. nutzte in einem Mausmodell die Wirkung der photodynamischen Reaktion von Rose Bengal und einem Grünlicht-Laser zur in vivo Thromboseinduktion [113].

In Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe gelang in der abdominalen Aorta von Ratten, die zuvor eine pro-degenerative Diät erhalten hatten, unter Zuhilfenahme der photodynamischen Reaktion eine fokale Induktion von oxidativem Stress ohne begleitende Endothelzellschädigung und ohne systemische Nebenwirkungen [114].

Der direkte Einfluss von oxidativem Stress und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf die DAVD wurde bisher in keinem experimentellen Tierversuchsmodell untersucht.

1.7 Ziele der Arbeit

Die degenerative Aortenklappenerkrankung ist als häufigste Klappenerkrankung mit einer zunehmenden Inzidenz innerhalb einer immer älter werdenden, komorbiden Bevölkerung von hoher klinischer Relevanz. Trotz zahlreicher Untersuchungen verschiedenster Risikofaktoren und deren Rolle in der Pathogenese der DAVD, stellt der interventionelle- bzw. chirurgische Klappenersatz weiterhin den einzig effektiven Therapieansatz dar. Aus diesem Grund ist die

weitere Forschung bezüglich früher pathophysiologischer Veränderungen und die Detektion möglicher medikamentöser Angriffspunkte umso wichtiger.

In vielen Studien wurde bereits ein Einfluss von oxidativem Stress auf die Entwicklung der DAVD festgestellt. Bisher fehlt es jedoch an einem Versuchsmodell, an dem der isolierte Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf (extra-) zelluläre Veränderungen in der frühen Genese von Aortenklappenverkalkung untersucht werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der photodynamischen Reaktion in einem experimentellen Kleintiermodell die isolierte Wirkung von ROS auf die Aortenklappe zu untersuchen. Dazu wurden männlichen Wistar-Ratten der Biosensibilisator Temoporfin systemisch verabreicht und die Aortenklappe nach einem Intervall von 24 Stunden fokal mit einem Rotlicht-Laser (652 nm) bestrahlt. In diesem Versuchsmodell sollte untersucht werden, ob fokal induzierte reaktive Sauerstoffspezies eine degenerative Aortenklappenerkrankung hervorrufen können. Unter Verwendung verschiedener histologischer und immunfluoreszierender Färbungen sowie echokardiografischer Untersuchungen wurden die Auswirkungen der PDR in Bezug auf osteochondrotische Zelldifferenzierung, die endotheliale Integrität und die hämodynamische Relevanz der zellulären und extrazellulären Veränderungen charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Im Rahmen dieses neuartigen Kleintiermodells wurden erwachsene, männliche Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von 250-300 g verwendet.

Um oxidativen Stress direkt und fokal zu induzieren, wurde im Rahmen einer photodynamischen Reaktion der Biosensitizer Temoporfin (mTHPC, Foscan®, 0,3 mg/kg KG) über die Schwanzvene injiziert. 24 Stunden nach der Applikation erfolgte die katheterbasierte Rotlichtlaserbestrahlung (CW, 652 nm, 1 mW). Nachdem in einer ersten Phase die optimale Bestrahlungsdauer für eine ausreichend hohe ROS-Konzentration an der Aortenklappe analysiert worden war (verglichen wurden Bestrahlungszeiten von 10 und 60 Minuten), wurden in einer zweiten Phase die akuten, frühen Gewebereaktionen sowie die Mittel- und Langzeiteffekte nach einer Bestrahlungsdauer von 60 Minuten untersucht.

Die Tiere wurden insgesamt in drei Gruppen, eine Interventions- und zwei Kontrollgruppen, unterteilt:

- „ROS“-Gruppe: Analyse der durch oxidativen Stress hervorgerufenen Umbauprozesse durch i.v. Applikation von Temoporfin und 60-minütige Laserbestrahlung über eine Laserfaser.
- „Laser“-Gruppe: Detektion potentieller degenerativer und thermischer Effekte durch den Laser und durch das Einbringen einer Laserfaser mit anschließender einstündiger Laserbestrahlung.
- „Sham“-Gruppe: Vergleich mit nativen Aortenklappen sowie Detektion von Auswirkungen durch mechanische Manipulation, Anästhesie, etc. durch das Einbringen einer inaktivierten Laserfaser vor die Aortenklappe ohne Bestrahlung.

Nach 0, 8, 84 und 168 Tagen wurden jeweils sieben Tiere pro Gruppe euthanasiert und die Aortenklappen mit dem umliegenden Gewebe des linksventrikulären Ausflusstraktes (LVOT) zur weiteren Analyse entnommen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über den Studienaufbau.

	Nachlaufzeit ($\Delta t/d$)	Dauer der Laserbestrahlung (Δt in min)	ROS	Laser	Sham
Phase I	0	60	n = 7	n = 7	n = 7
	8	60	n = 7	n = 7	n = 7
Phase II	84	60	n = 7	n = 7	n = 7
	168	60	n = 7	n = 7	n = 7

Tabelle 1: Übersicht Studiendesign.

Nachlaufzeitpunkte, Bestrahlungsdauer, Gruppeneinteilung und Anzahl der Tiere pro Gruppe.

Diese Arbeit konzentriert sich bei der Analyse der zellulären und extrazellulären Veränderungen durch ROS bzw. oxidativen Stress auf drei verschiedene Aspekte. Die Proliferation und Dedifferenzierung valvulärer Interstitialzellen (VICs) hin zu einem osteochondrogenen Phänotypen wurde mit Hilfe der Sox9 Fluoreszenzfärbung analysiert, während die Endstrecke der Kalzifikation mit der von Kossa Färbung untersucht wurde. Die endotheliale Integrität wurde mittels der Vimentin und von-Willebrand-Faktor (vWF) Doppelimmunfluoreszenzfärbung beurteilt und die Auswirkungen auf die Hämodynamik echokardiografisch gemessen. Dabei wurden die Ergebnisse der drei Gruppen nach den vier verschiedenen Nachlaufzeiten und einer Bestrahlungsdauer von 60 Minuten analysiert.

2.2 Modell

2.2.1 Tierversuch

Für das Modell wurden Ratten des Wistar-Stammes verwendet. Diese wurden über die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Janvier Labs aus Frankreich bestellt. Ausgewählt wurden männliche Ratten mit einem Gewicht von 250 g bis 300 g.

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. Dieses bestand aus Standard-Pellets, welche mit 2 % Cholesterin und 1,5 % Phosphat angereichert wurden (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, S3544-SO12 SMR/M-H). Alle Versuche wurden auf der Grundlage des genehmigten Tierversuchsantrages nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes mit dem Aktenzeichen 84-02.04.2017.A153 durchgeführt. Der für die Arbeit benötigte Tierversuchsantrag ist genehmigt

und unter der Referenznummer G153/17 gelistet. Alle Versuche wurden nach den ethischen 3R-Prinzipien *Reduce, Refine, Replace* vorgenommen.

2.2.2 Photodynamische Reaktion

Vor der Prozedur wurde das Körpergewicht (g) des jeweiligen Versuchstieres gemessen. Unter Inhalation von Isofluran (Einleitung: 2 – 3 Vol.-%, Erhaltung 1 – 1,5 Vol.-%) erfolgte die Injektion des Biosensibilisators Temoporfin (Foscan[®], mTHPC) unter sterilen Bedingungen über die Schwanzvene in einer Dosierung von 0,3 mg/kg KG (Injektionsvolumen von 0,3 ml/kg KG bei 1 mg mTHPC pro 1 ml NaCl 0,9 %).

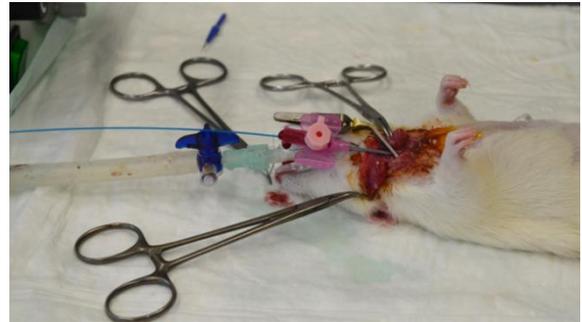


Abb. 5: Operationssitus eines intubierten, narkotisierten Versuchstieres.

Endovaskuläre Katheterisierung der rechten A. carotis communis mit Einbringen der Laserfaser.

24 Stunden nach der Applikation fand die 60-minütige Laserbestrahlung (CW, 652 nm, 1 mW) statt. Dafür wurden die Tiere 30 min vor der Operation mit Buprenorphin (0,05 mg/kg KG subkutan) analgesiert. Mittels Isofluran (Einleitung: 2 – 3 Vol.-%) wurde die Allgemeinnarkose eingeleitet und nach Intubation mit einer 14G-Kanüle per Inhalation (Erhaltung 1 – 1,5 Vol.-%) aufrechterhalten. Unter sterilen Bedingungen erfolgte eine 2 cm lange, zervikale Inzision auf der rechten Seite, um die rechte Vena jugularis interna freilegen und darstellen zu können. Nach Einlage eines zentralvenösen Katheters mit Hilfe einer 14G Kanüle, wurde Heparin (300 IE/kg KG) intravenös appliziert. Daraufhin wurde die rechte Arteria carotis communis dargestellt, inzidiert und ein Katheter (20G) retrograd bis zur Aortenklappenebene eingeschoben (siehe Abbildung 5). Darüber wurde eine Laserfaser ins Gefäß eingebracht und deren Lage wie in Abbildung 6 dargestellt echokardiografisch überprüft.

Nach der 60-minütigen Bestrahlung durch einen Rotlichtlaser wurde der Katheter entfernt, das Gefäß ligiert, die Haut darüber verschlossen und das Tier unter Ausschleichen der Narkose bei einsetzender Spontanatmung extubiert. Die postoperative Analgesie erfolgte subkutan mit Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) alle 12 Stunden über 2 Tage.



Abb. 6: Echokardiografische Lagekontrolle.

Darstellung der endovaskulären Lage der Laserfaser kurz vor der Aortenklappenebene.

2.2.3 Euthanasie und Gewebeexplantation

Die Explantation erfolgte nach 0, 8, 84, bzw. 168 Tagen (siehe Tabelle 1). Dabei wurde am jeweiligen Tag der Gewebeentnahme erneut das Körpergewicht (g) gemessen. Präoperativ wurden die Tiere mit Buprenorphin (0,05 mg/kg KG subkutan) analgesiert und 30 Minuten später über eine intraperitoneale Injektion von Xylazin (10 mg/kg KG) und Ketamin (100 mg/kg KG) in Narkose versetzt. Aufrechterhalten wurde diese per inhalationem mittels Isofluran (Einleitungs-dosis 2 - 3 Vol.%; Erhaltungs-dosis 1 - 1,5 Vol.-%). Nach dopplersonografischer Kontrolle mit Messung hämodynamischer Parameter und Rasur des zu operierenden Bereiches, gelang der Zugang unter sterilen Kautelen über eine mediane Sterno- und Laparotomie. Eine Antikoagulation wurde durch Injektion von Heparin (300 IE/kg KG) erreicht. Nach stattgehabter Euthanasie durch Ausbluten in tiefer Narkose erfolgte die Explantation des Herzens. Anschließend wurde die Aortenbasis mit Aortenklappe und umliegendem Gewebe des linksventrikulären Ausflusstraktes (LVOT) entnommen. Alle Gewebeproben wurden bis zur weiteren Aufbereitung in mit DBPS gefüllten 15 ml Falcons aufbewahrt, um diese vor dem Austrocknen zu schützen.

2.2.4 Probenaufbereitung

Um die explantierten Gewebepreparate histologisch aufbereiten und analysieren zu können, mussten diese zunächst für die Mikrotomie vorbereitet werden. Dazu erfolgte direkt nach der Explantation das Eindecken der Aortenklappenconduits mit Hilfe eines Kryo-Eindeckmediums

(KP-CryoCompound). Dieses wurde möglichst Luftblasen-frei in ein beschriftetes Kunststoffschälchen gefüllt und die Gewebeproben vorsichtig darin positioniert. Das Einfrieren erfolgte in Isopentan (2-Methylbutan), welches vorher in Flüssigstickstoff (N₂) herunter gekühlt worden war. Die gefrorenen Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

2.3 Histologie

2.3.1 Anfertigung histologischer Schnitte

Die Anfertigung 5 µm dicker histologischer Schnittpräparate wurde mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Kryostaten, Leica CM1950) durchgeführt. Dabei wurden die gefrorenen Proben auf eine vorgekühlte Objektplatte gebracht und diese anschließend in den Objektkopf eingespannt. Mittels eines Vorschubmechanismus wurde dieser gegen den Messerblock bewegt, wodurch gleichmäßig dicke Schnitte erstellt werden konnten. Diese wurden mit einem Objektträger aufgenommen und die korrekte Orientierung und Ausrichtung der Präparate unter einem Mikroskop kontrolliert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Aortenklappenring und alle drei Taschen wie in Abbildung 7 gleichmäßig angeschnitten wurden und zu sehen waren.

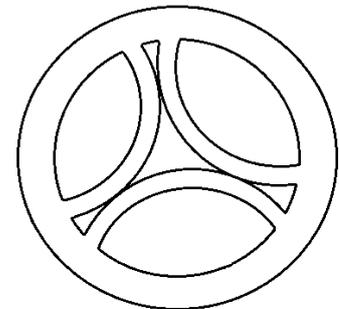


Abb. 7: Definierter Querschnitt der Aortenklappe.

Somit wurden zwei Schnitte pro Objektträger angefertigt und anschließend in einer Plastikbox bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Von Kossa Färbung

Mittels der von Kossa Färbung erfolgt der indirekte Nachweis von Kalziumablagerungen (Verkalkungen) in einem Gewebe. Dabei wird Kalzium durch Silber-Ionen aus seinen Phosphaten und Karbonaten verdrängt. Diese werden unter Lichteinwirkung zu elementarem, metallischem Silber reduziert, das in Form von schwarzbraunen Ablagerungen sichtbar wird. Durch eine Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat werden die Zellkerne und das Zytoplasma zur besseren Übersicht rötlich angefärbt.

Die 5 µm dicken Kryoschnitte wurden unter Mitführen einer Positivkontrolle zunächst für 8 min in vorgekühltem Aceton bei -20 °C behandelt. Anschließend wurden sie unter dem Abzug für 5 min getrocknet, kurz in Aqua dest. getaucht und in einer 5 %-igen Silbernitratlösung (200 ml Aqua dest. + 10 g Silbernitrat) für 60 min unter Neonlicht belassen. Darauf erfolgten ein 3-maliges Waschen mit Aqua dest. für jeweils 3 min und die Reduktion in einer Natriumkarbonat-Formaldehydlösung (150 ml Aqua dest. + 50 ml Formaldehyd + 10 g Natriumkarbonat) für 2 min.

Nach Spülung unter fließendem Leitungswasser für 10 min, wurden die Schnitte für 5 min in einer 5 %-igen Natriumthiosulfatlösung (200 ml Aqua dest. + 10 g Natriumthiosulfat) fixiert. Nachdem somit überschüssiges Silber entfernt wurde und die Objektträger erneut 15 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und für 3 min in Aqua dest. getaucht wurden, erfolgte die Gegenfärbung mittels Kernechtrot-Aluminiumsulfat für weitere 10 min. Daraufhin wurden sie erneut für 3 min in Aqua dest. gestellt und über eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %-, 70 %-, 90 %- und 100 %-iges Ethanol) und Xylol entwässert. Das Eindecken erfolgte mit Roti®-Histokit.

2.4 Immunfluoreszenzfärbungen

2.4.1 Sox 9

Das Sry-related HMG box 9 Protein (Sox9) ist ein chondrozytenspezifischer Transkriptionsfaktor, der sowohl in der Chondrozytendifferenzierung, als auch in der skelettalen Entwicklung eine Rolle spielt. Daher wurde diese Immunfluoreszenzfärbung mit dem Ziel durchgeführt, die Transformation und Differenzierung von VICs in einen osteochondrogenen Phänotypen zu analysieren.

Es wurden Objektträger mit je zwei 5 µm dicken Schnitten benutzt und ein Schnitt einer neonatalen Rattenpfote als Positivkontrolle mitgeführt. Alle Schnitte wurden zu Beginn mit einem Dako-Pen umrundet, um das Vermischen der Lösungen auf dem Objektträger zu vermeiden. Nach einer 10-minütigen Behandlung mit 4 %-igem Formalin, wurden die Schnitte 3x für 1 min mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und für weitere 10 min in 0,25 %-ige Triton-X-Lösung (100 ml PBS + 250 µl Triton-X-100) gestellt. Darauf folgten eine dreimalige Spülung mit PBS für je 1 min und der Proteinblock mit 5 %-igem BSA (100 ml 1 %-ige Tween20-Lösung + 5 g Bovines Serum Albumin) für 60 min. Nachdem die Objektträger mit 0,1 %-iger

Tween20-Lösung (700 ml PBS + 700 µl Tween20) 3x 1 min und anschließend 2x 1 min mit PBS gewaschen worden waren, erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Dabei wurde Sox 9 in einem Verhältnis von 1:200 in 1 %-iger BSA-Lösung verdünnt und 50 µl auf den ersten Schnitt der Objektträger pipettiert, während auf den zweiten Schnitt 50 µl der reinen 1 %-igen BSA-Lösung als Negativkontrolle aufgebracht wurden (siehe Abbildung 8 A). Nach dem Waschen am darauffolgenden Tag in 0,1 %-iger Tween20-Lösung für 3x 5 min und in PBS für 2x 1 min, wurden 50 µl des Sekundärantikörpers Alexa 546 in einer Verdünnung von 1:250 in 1 %-igem BSA auf beide Schnitte aufgetragen (siehe Abbildung 8 B) und diese für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Danach erfolgte die Kernfärbung mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS für 5 min. Schlussendlich wurden die Schnitte 3x 1 min mit PBS gewaschen, 1 min in Aqua dest. und kurz in 100 %-iges Ethanol getaucht sowie mit einem Leica-Eindeckmedium eingedeckt.

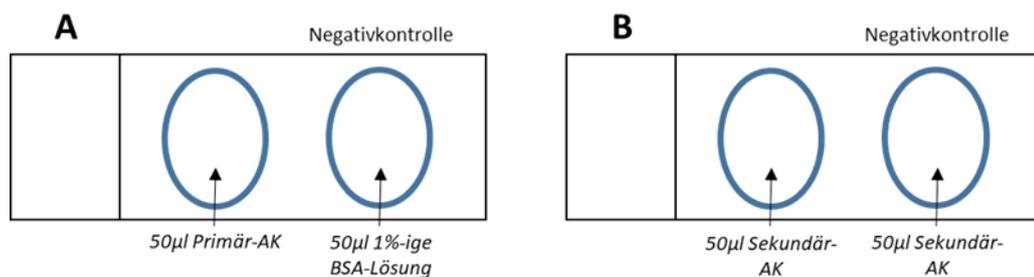


Abb. 8: Schema Antikörperverteilung.

Der Primär-AK wird nur auf den ersten Schnitt des Objektträgers pipettiert (A), während der Sekundär-AK auf beide Schnitte aufgebracht wird (B). Mit Hilfe der Negativkontrolle wird ausgeschlossen, dass der Zweitantikörper nicht unspezifisch an anderen Strukturen im Gewebe bindet.

2.4.2 Vimentin und von-Willebrand-Faktor

Da der Von-Willebrand-Faktor von Endothelzellen exprimiert wird und Vimentin in Zellen mesenchymalen Ursprungs vorkommt, wurde diese Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zur Analyse der endothelialen Integrität durchgeführt.

Mitgeführt wurde ein Ratten-Myokardpräparat als Positivkontrolle. Die Schnitte wurden jeweils mit einem Dako-Pen umrundet, damit aufpipettierte Lösungen nicht verlaufen und vermischt werden konnten. Danach wurden sie für 10 min in 4 %-iges Formalin gestellt und anschließend 3x 1 min mit PBS gewaschen. Es erfolgten eine Behandlung mit einer 0,25 %-

igen Triton-X-Lösung (100 ml PBS + 250 µl Triton-X-100) für weitere 10 min sowie eine erneute Spülung mit PBS für 3x 1 min. Für den Proteinblock wurden die Objektträger eine Stunde lang in 5 %-igem BSA (100 ml 1 %-ige Tween20-Lösung + 5 g BSA) stehen gelassen. Nach einer Spülung mit 0,1 %-iger Tween20-Lösung (700 ml PBS + 700 µl Tween20) für 3x 1 min sowie mit PBS für 2x 1 min, wurden die Schnitte für 60 min bei 37 °C in einer Feuchtkammer mit den Primärantikörpern inkubiert. Diese wurden 1:300 für vWF und 1:100 für Vimentin in 1 %-iger BSA-Lösung (100 ml Tween20-Lösung + 0,25 g BSA) verdünnt und 50 µl dieser Lösung jeweils auf den ersten Schnitt eines Objektträgers pipettiert. Auf den zweiten Schnitt wurden 50 µl 1 %-iges BSA als Negativkontrolle gebracht, wie in Abbildung 8 A dargestellt. Überschüssige Primär-AK wurden 3x mit 0,1 %-iger Tween20-Lösung für je 5 min und noch 2x 1 min mit PBS abgewaschen.

Alle weiteren Schritte erfolgten unter Vermeidung von direktem Licht. Es wurden 50 µl der Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 und 546) 1:200 in 1 %-iger BSA-Lösung verdünnt, wie in Abbildung 8 B auf beide Schnitte aufgebracht und diese anschließend erneut für 45 min in einer Feuchtkammer bei 37 °C inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS für 5 min. Nach dem Waschen mit PBS für 3x 5 min, wurden die Objektträger für 1 min in Aqua dest. gestellt und kurz in 100 %-iges Ethanol getaucht. Darauf folgte das Eindecken mit Leica-Eindeckmedium.

2.5 Echokardiografie

Eine echokardiografische Untersuchung der Aortenklappen und ihrer Hämodynamik erfolgte unter Allgemeinnarkose unmittelbar vor der PDR-Applikation sowie unmittelbar vor der Euthanasie der Tiere. In Tabelle 2 sind die bei den Untersuchungen gemessenen Parameter und ihre Definition dargestellt.

Parameter	Definition
AVA	Aortenklappenfläche (mm ²)
EF	Ejektionsfraktion (%)
FS	(linksventrikuläre) Verkürzungsfraktion (<i>fractional shortening</i> , %)
IVSd	Enddiastolische interventrikuläre Septumdicke (mm)
LVEDD	Linkventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (mm)
LVEDS	Linkventrikulärer endsystolischer Durchmesser (mm)
LV mass	Linkventrikuläre Masse (g)

LVOT	Breite des linksventrikulären Ausflusstraktes (cm)
Δp	Transvalvulärer Druckgradient (<i>pressure gradient</i> , mmHg)
PWd	Enddiastolische Hinterwanddicke (mm)
V1	Subvalvuläre Flussgeschwindigkeit (m/s)
V2	Supravalvuläre, maximale Flussgeschwindigkeit (m/s)
VTI 1	Geschwindigkeitszeitintegral = Fläche der subvalvulären Flussgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit (cm)
VTI 2	Geschwindigkeitszeitintegral = Fläche der maximalen Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe in Abhängigkeit von der Zeit (cm)

Tabelle 2: Echokardiografische Parameter mit Definition.

Da der transvalvuläre Druckgradient (Δp , *pressure gradient*, in mmHg) mit dem Ausmaß einer Aortenklappenstenose und der Blutflussrate über die Klappe hinweg korreliert, wurde dieser Messwert zur statistischen Auswertung genutzt und die prä-Explantations-Werte der Tiere der verschiedenen Gruppen über die Zeitpunkte hinweg miteinander verglichen.

2.6 Auswertung

2.6.1 Von Kossa Färbung

Die von Kossa gefärbten Objektträger wurden mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Leica Microsystems, Model DM 2000) mit einem 5-er bzw. 10-er Objektiv aufgenommen und die Kalzifizierung der Aortenklappen semi-quantitativ mittels eines Scores ausgewertet. Die Schnitte wurden dabei verblindet und mit folgenden Punkten bewertet.

- 0 Punkte: Kein Kalk
- 1 Punkt: Mikrokalk, schwache bräunliche Verfärbungen (Hinweis auf beginnende degenerative Prozesse)
- 2 Punkte: Stärkere, flächige Kalzifizierungen sowie stärkere, großflächigere Verfärbungen
- 3 Punkte: Kalkscholle, die < 50 % der Fläche in der entsprechenden Region einnimmt
- 4 Punkte: Kalkscholle, die 50 – 75 % der Fläche in der entsprechenden Region einnimmt
- 5 Punkte: Kalkscholle, die > 75 % der Fläche in der entsprechenden Region einnimmt

Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurde die Aortenklappe zur besseren Beurteilung in den Aortenring (Anulus), die Taschenklappen und die Kommissuren unterteilt.

Um Übersichtsbilder erstellen zu können, wurden die Einzelaufnahmen, die mit dem 5er-, bzw. 10-er Objektiv gemacht wurden, mit Hilfe des Stitching Tools von ImageJ zusammengefügt.

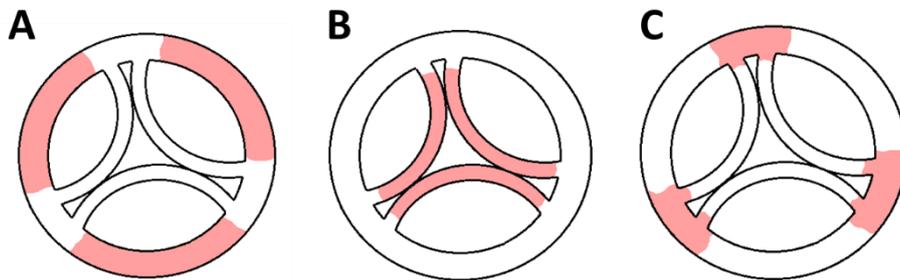


Abb. 9: Schema Unterteilung Aortenklappenschnitt.

A zeigt den jeweiligen Aortenring (Anulus), B die Taschenklappen und C die Kommissuren.

2.6.2 Sox 9

Die Objektträger wurden mit dem 40-er Objektiv mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops mit Fluoreszenzlampe nach dem gleichen Schema wie die Vimentin/ vWF Färbung aufgenommen. Ursprünglich war die Idee, die Sox 9 Immunfluoreszenzfärbung quantitativ mit Hilfe von ImageJ auszuwerten. Da Sox 9 als chondrozytenspezifischer Transkriptionsfaktor im Zellkern vorkommt und die Zellkerne mittels DAPI angefärbt wurden, sollte der prozentuale Anteil der Sox 9 positiven Bereiche an der Gesamtfläche des gefärbten Gewebes berechnet werden.

Wie in Abbildung 10 zu sehen, wurde dafür die ROI (*region of interest*) im DAPI-Bild manuell eingezeichnet (A) und auf das Sox 9-Bild übertragen (B). Mit Hilfe des automatischen *thresholds* „*Max Entropy*“ wurde das Signal in ein binäres Bild übersetzt (D), sodass nun der prozentuale Anteil errechnet werden konnte.

Es stellte sich allerdings heraus, dass das Sox 9 Signal nicht 1:1 übersetzt werden konnte. Obwohl das passendste *threshold* ausgewählt wurde, gab es Schnitte, bei denen auch das unspezifische Signal und welche, bei denen zu wenig Signal berechnet wurde. Aus diesem Grund erfolgte die Auswertung schlussendlich doch qualitativ.

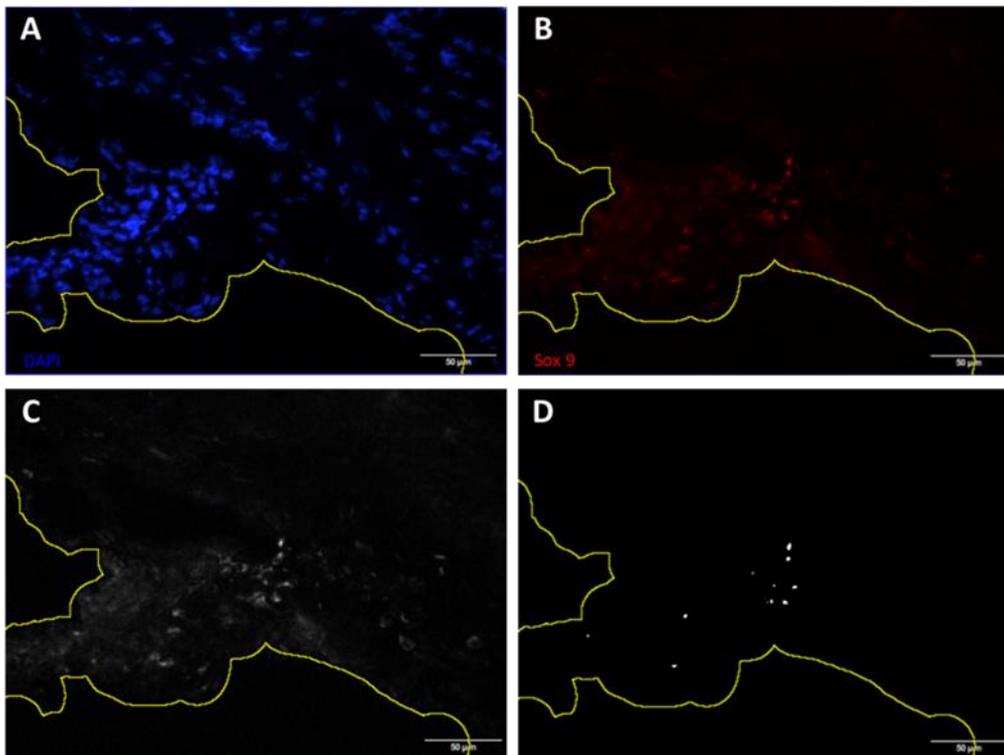


Abb. 10: Quantitative Auswertung der Sox 9 Immunfluoreszenz.

A zeigt die Gesamtfläche, an der der Anteil des Sox 9 Signals prozentual berechnet werden soll (B). C veranschaulicht das Sox 9 Signal in Graustufen und D das binäre Bild nach Anwendung des *thresholds*. Der Maßstab beträgt 50 µm.

2.6.3 Vimentin und von-Willebrand-Faktor

Die Auswertung der vWF und Vimentin Doppelfärbung erfolgte qualitativ. Die Aufnahmen wurden dafür fluoreszenzmikroskopisch (Leica Microsystems, Model DM 2000) mit dem 40-er Objektiv angefertigt. Abbildung 11 zeigt die definierten Bereiche eines Aortenklappenschnittes, die zur Beurteilung der Durchgängigkeit des Endothels fotografiert wurden.

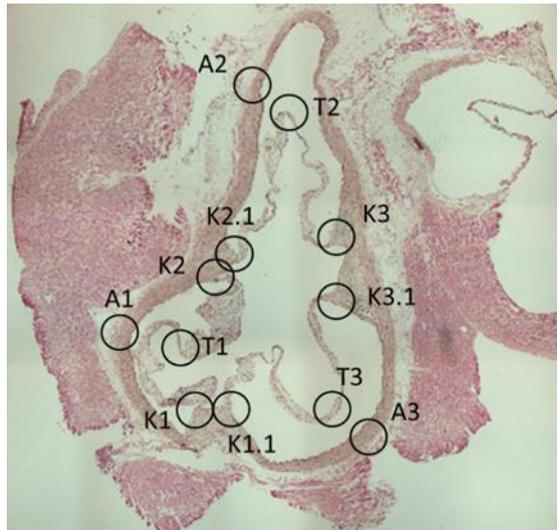


Abb. 11: Bildaufnahmen Immunfluoreszenz.

Abgebildet sind die Aufnahmebereiche für die Immunfluoreszenzfärbung einer Aortenklappe, hier beispielhaft an einem von Kossa gefärbten Schnitt dargestellt. Fotografiert wurden jeweils die zentralen Bereiche der Taschen (T1-3), der Anuli (A1-3) und die Kommissuren (K1-3.1).

2.6.4 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit Graphpad Prism6 statistisch ausgewertet. Die Gruppenvergleiche erfolgten mit Hilfe des nichtparametrischen *Kruskal-Wallis*-Testes. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler ($M \pm SEM$, *mean and standard error of mean*) dargestellt und mit einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

2.7 Eigenanteil der Methodik und Etablierungsarbeit

Nach Einarbeitung durch Postdocs, wissenschaftliche Mitarbeiter und andere Doktorand:innen des Forschungslabors der experimentellen Kardiochirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf, erfolgte die Aufarbeitung der gewonnenen Proben, die Durchführung der jeweiligen Färbungen sowie deren Ergebniserarbeitung und –auswertung selbstständig durch die Doktorandin. Die Protokolle der von Kossa- und Vimentin/ vWF-Färbungen waren bereits im Labor etabliert, während das Protokoll für die Sox 9 Immunfluoreszenzfärbung sowie deren quantitative Auswertung mittels ImageJ eigens erarbeitet wurde.

Die Durchführung der Tierversuche und der echokardiografischen Untersuchungen erfolgten aufgrund besonderer Fachkenntnisse durch Herrn Yukiharu Sugimura.

2.8 Material

2.8.1 Tierversuch

Buprenorphin	Animalcare Limited, York (Großbritannien), Art.-Nr. 401045.00.00
Continous Wave-Rotlichtlaser (1 mW), Wellenlänge 652 nm	Biolitec Pharma, Jena (Deutschland)
Futter: Standard-Pellets, mit 2 % Cholesterin und 1,5 % Phosphat angereichert	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest (Deutschland), Art.-Nr. S3544-SO12 SMR/M-H
Heparin 25.000 IE/ 5ml	Rotexmedica, Art.-Nr. PZN-3862340
Isofluran (Inhalationsnarkose)	Actavis, Langenfeld (Deutschland), Art.-Nr. 30372.00.00
Jod	Roth, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. 7935.1
Ketamin	Pfizer, New York (USA), Art.-Nr. 3151811
OP-Lampe	Dr. Mach GmbH & Co. KG, Ebersberg (Deutschland), Triaflex
OP-Mikroskop	Nikon Instruments, Amsterdam (Niederlande), SMZ-1-Zoom-Stereomikroskop
Ratten, männlich, Wistar	Bezogen von der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
Temoporfin (Foscan®), 0,3 mg/kg Körpergewicht	Biolitec Pharma, Jena (Deutschland), Zulassungsnummern (EU/1/01/197/003, EU/1/01/197/004, EU/1/01/197/005)
Xylazin	Bayer, Leverkusen (Deutschland), Art.-Nr. 1320422

2.8.2 Materialliste

Aceton	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. 5025.6
Aqua destillata, Ecotainer	Fischar Otto GmbH & Co. KG, Saarbrücken (Deutschland), Art.-Nr. 18880
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland), Art.-Nr. A9418-10G
DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. 6335.1
Eindeckmedium Roti®-Histokit	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. T160.1
Ethanol 50 %, 70 %, 90 %, 100 %	Fischar Otto GmbH & Co. KG, Saarbrücken (Deutschland)
Flüssigstickstoff	Linde GmbH, Pullach (Deutschland)
Formalin 4 % (Roti®-Histofix)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. P087.3

Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. 4979.1
Heparin 25.000 IE/ 5 ml	Rotexmedica, Art.-Nr. PZN-3862340
Kernechtrot - Aluminiumsulfat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. N069.1
KP-CryoCompound	VWR International, Radnor (USA), Art.-Nr. VWRK1620-C
Leica-Eindeckmedium	Leica, Wetzlar (Deutschland), Art.-Nr. 070937891
2-Methylbutan/ Isopentan	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. 3927.2
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland), Art.-Nr. 1.06392.1000
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland), Art.-Nr. 72049-250G
PBS (DPBS w/o Calcium and Magnesium 500 ml)	BioFroxx GmbH, Art.-Nr. 1445ML500
PBS (phosphate buffered saline)	<i>Gibco by life technologies, Darmstadt (Deutschland), Art.-Nr. 14190-094</i>
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. 9370.1
Triton-X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland), Art.-Nr. T9284
Tween20 Detergent, Calbiochem	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland), Art.-Nr. 655205
Xylol	VWR International, Radnor (USA), Art.-Nr. 28975.325

2.8.3 Antikörper

Alexa 488 (anti-guinea pig)	Life Technologies, Carlsbad (USA), Art.-Nr. A11073
Alexa 546 (anti-rabbit)	Invitrogen, Carlsbad (USA), Art.-Nr. A11010
Sox9 (rabbit)	Abcam, Cambridge (Großbritannien), Art.-Nr. ab3697
Vimentin (ginuea pig)	Progen, Heidelberg (Deutschland), Art.-Nr. Gp53
vWF (rabbit)	DakoCytomation, Glostrup (Dänemark), Art.-Nr. A0082

2.8.4 Software

ImageJ (open source)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Irfan View (open source)	Irfan Škiljan, Österreich
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft Inc., Redmond, USA
Microsoft Office Word 2016	Microsoft Inc., Redmond, USA

Prism6	Prism version 6 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA,
--------	---

2.8.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Dako-Pen	DakoCytomation, Glostrup (Dänemark), Art.-Nr. S2002
Deckgläser 24x60 mm	Engelbrecht GmbH, Edermünde, Art.-Nr. k12460
Durchlichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Model DM 2000, Art.-Nr. 331009-102010
Einbettgeschälchen, Kunststoff, 17x17x5 mm	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf (Deutschland), Art.-Nr. 48-6303-00
Eppendorfgefäß 1,5 ml/ 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Falcon 15 ml/ 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Filterpapier Ø240 mm	Macherey-Nagel, Düren (Deutschland), Art.-Nr. Y856.1
Fluoreszenzlampe	Leica Microsystems, Wetzlar (Deutschland), Art.-Nr. EL6000
Inkubator/ Wärmeschrank	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham (USA), Heracell 240i
Kryostat (Gefriermikrotom)	Leica, Wetzlar (Deutschland), Leica CM1950
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Biberach an der Riss (Deutschland), comfort KSD 3534
Magnetrührer, Rotilabo	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Deutschland), Art.-Nr. MH15
Mikroskopkamera	Leica, Wetzlar (Deutschland), DFC 425 C, Art.-Nr. 505374710
Mikroskop Software (LAS V3.8)	Leica Microsystems, Wetzlar (Deutschland)
Neonröhre, 30 Watt	Osram, München (Deutschland), cool wight
NitraTex Handschuhe, Micro Touch	Ansell, München (Deutschland), Art.-Nr. 700113
Objektplatte, rund, 30 mm	Technomed, Maastricht (Niederlande), Art.-Nr. 14037008587
Objektträger SuperFrost Plus, 75x25x1 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen (Deutschland), Art.-Nr. 03-0060
Objektträger 76x26x1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen (Deutschland), Art.-Nr. 0810000
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Pipettenspitzen (10/20 µl, 200 µl, 1000 µl)	STARLAB International GmbH, Hamburg (Deutschland)
Ultraschallgerät	Philips Healthcare, Hamburg (Deutschland), HD11 XE Ultrasound system, 15 MHz Schallkopf
Tiefkühltruhe (-20 °C)	Robert Bosch Healthcare GmbH, Waiblingen (Deutschland), automatic GTA 50

Tiefkühltruhe (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (Deutschland), Revco
Waage	Sartorius, Göttingen (Deutschland), Art.-Nr. BP 110 S
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland), Art.-Nr. 5804 R

3 Ergebnisse

3.1 Osteochondrogene Zelldifferenzierung

3.1.1 Sox9 Immunfluoreszenzfärbung

Um zelluläre Veränderungen der VICs in Form einer osteochondrogenen Transformation zu analysieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung des *sry-related transcription factor 9* (Sox9) durchgeführt.

Es erfolgte eine quantitative Berechnung des prozentualen Anteils der Sox9-positiven Bereiche an der Gesamtfläche des jeweiligen Gewebes (unterteilt in Tasche, Anulus und Kommissur).

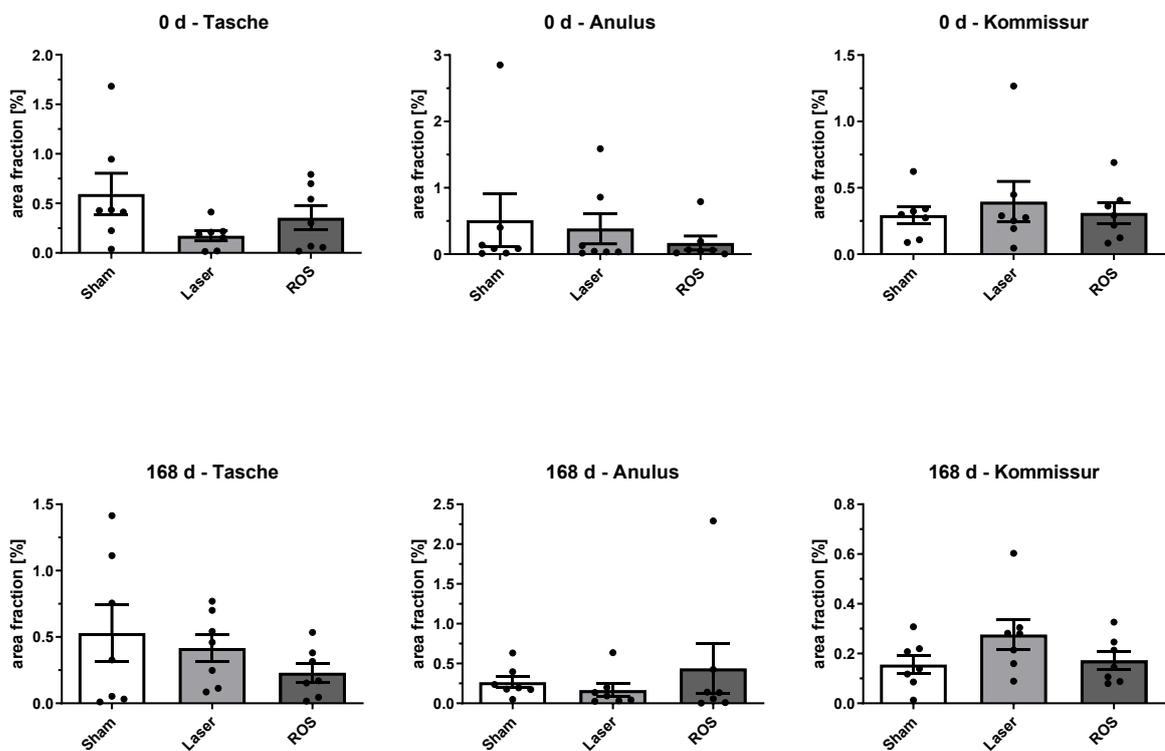


Abb. 12: Prozentualer Sox9-Anteil (area fraction in %) in Abhängigkeit der jeweiligen Interventionsgruppe.

Dargestellt ist der Vergleich des prozentualen Sox9-Anteils zwischen der ROS-, Laser- und Sham-Gruppe. Dieser ist in Bezug auf die drei untersuchten Klappenregionen (Tasche, Anulus und Kommissur) nach einer Bestrahlungsdauer von 60 min und mit einer Nachlaufzeit von 0 und 168 Tagen nach der PDR untersucht worden. Dabei zeigen sich innerhalb der Regionen zwischen den verschiedenen Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Der statistische Vergleich erfolgte mit dem *Kruskal-Wallis*-Test mit * $p < 0,05$, dargestellt sind $M \pm SEM$.

Abbildung 12 zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Sox9-positiven Anteils innerhalb einer Region der Aortenklappe zwischen den ROS-Tieren und den Kontrollgruppen nach einer Bestrahlungsdauer von 60 Minuten festgestellt werden konnten. Dies galt sowohl für den Explantationszeitpunkt unmittelbar nach der PDR, als auch für den nach 168 Tagen. Auch bei dem direkten Vergleich der verschiedenen Gruppe über die unterschiedlichen Nachlaufzeiten hinweg zeigten sich keine Signifikanzen. Insgesamt stellte sich eine große Streuung der Werte der einzelnen Tiere pro Gruppe und Region dar.

Auch in der qualitativen Analyse zeigte sich das Sox9-Immunfluoreszenz-Signal zu den unterschiedlichen Explantationszeitpunkten innerhalb einer jeweiligen Region der Aortenklappe (Tasche, Anulus oder Kommissur) der ROS-Tiere im Vergleich zu denen der Kontrollgruppen (Laser und Sham) heterogen verteilt (Abb. 13-15). In Bezug auf die Lokalisation, zeigte sich insgesamt das stärkste Sox9-Signal in den Kommissuren der Klappen.

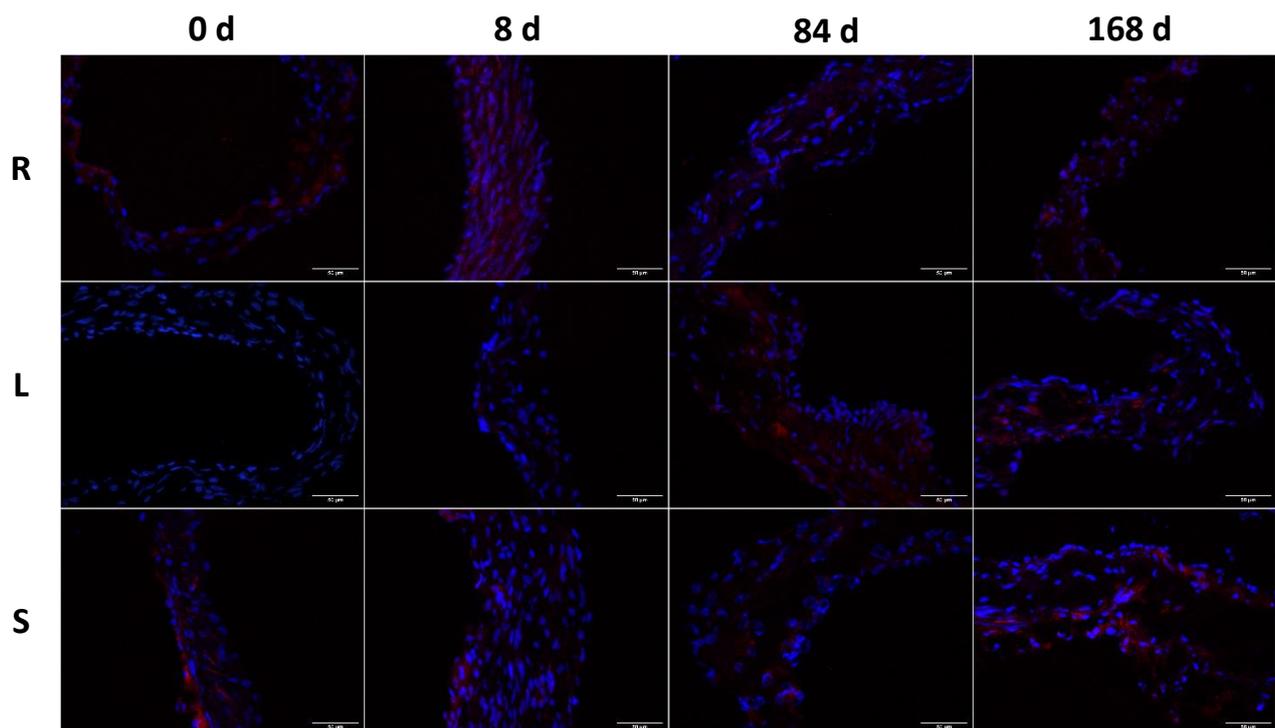


Abb. 13: Übersicht der Sox9 Immunfluoreszenzfärbung der Taschen-Region.

Gegenüberstellung von exemplarischen Aufnahmen der ROS- (R), Laser- (L) und Sham-Gruppe (S) zu den unterschiedlichen Explantationspunkten. Maßstab 50 µm.

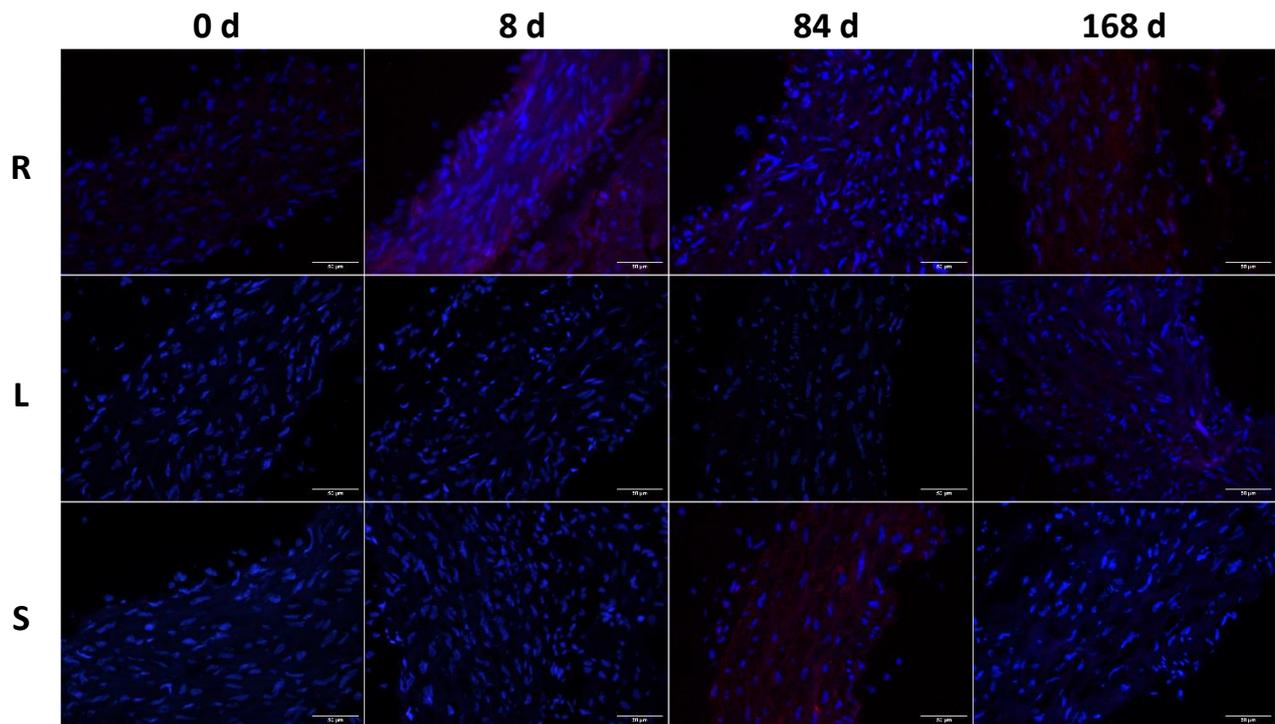


Abb. 14: Übersicht der Sox9 Immunfluoreszenzfärbung der Anulus-Region.

Gegenüberstellung von exemplarischen Aufnahmen der ROS- (R), Laser- (L) und Sham-Gruppe (S) zu den unterschiedlichen Explantationspunkten. Maßstab 50 µm.

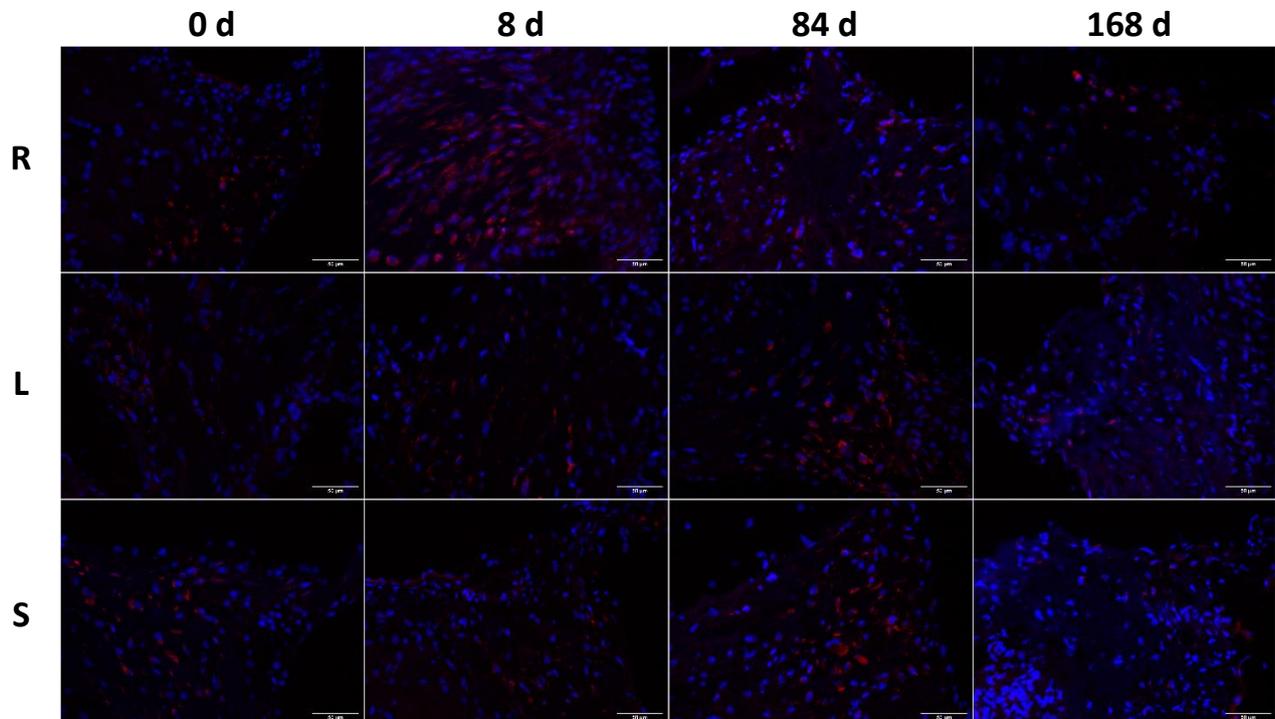


Abb. 15: Übersicht der Sox9 Immunfluoreszenzfärbung der Commissuren.

Gegenüberstellung von exemplarischen Aufnahmen der ROS- (R), Laser- (L) und Sham-Gruppe (S) zu den unterschiedlichen Explantationspunkten. Maßstab 50 µm.

Zusammenfassend konnten mit Hilfe der Sox9-Immunfluoreszenzfärbung keine adäquaten Rückschlüsse auf die osteochondrogene Transformation der VICs gezogen werden.

3.1.2 Von Kossa Färbung

Mit Hilfe der von Kossa Färbung lassen sich Gewebeverkalkungen darstellen. Diese Färbung wurde zur Untersuchung der Endstrecke der Pathogenese der DAVD, nämlich der Verkalkung des Klappentaschengewebes, genutzt. Es erfolgte die semi-quantitative Auswertung unter Zuhilfenahme eines Scores, der nach dem Ausmaß der Kalkablagerungen eingeteilt wurde. Insgesamt wurde nach einer Laserbestrahlungsdauer von 60 min in keinem der Aortenklappenschnitte unabhängig von der jeweiligen Region, der Interventionsgruppe und dem Explantationsdatum ein von Kossa Score ≥ 3 Punkten vergeben. Das bedeutet, dass zu keinem Zeitpunkt Kalkschollen, die $< 50\%$, $50 - 75\%$ oder $> 75\%$ der Fläche in der entsprechenden Region einnehmen, detektiert werden konnten (vergleiche Abbildung 16).

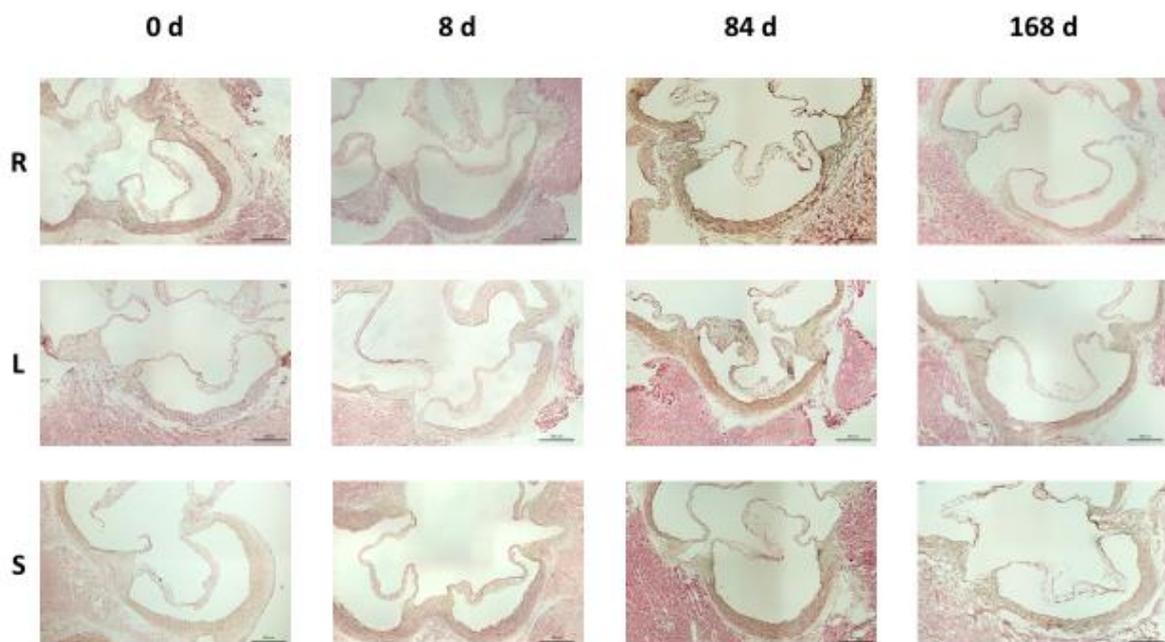


Abb. 16: Übersicht der von Kossa Färbung.

Zu sehen ist die exemplarische Gegenüberstellung einer jeweiligen Aortenklappentasche mit Darstellung der Anheftungsstellen (Kommissuren) an dem fibrösen Aortenring (Anulus). Der Vergleich erfolgt zwischen den drei Gruppen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten nach einer Bestrahlungsdauer von 60 Minuten. Maßstab 400 μm .

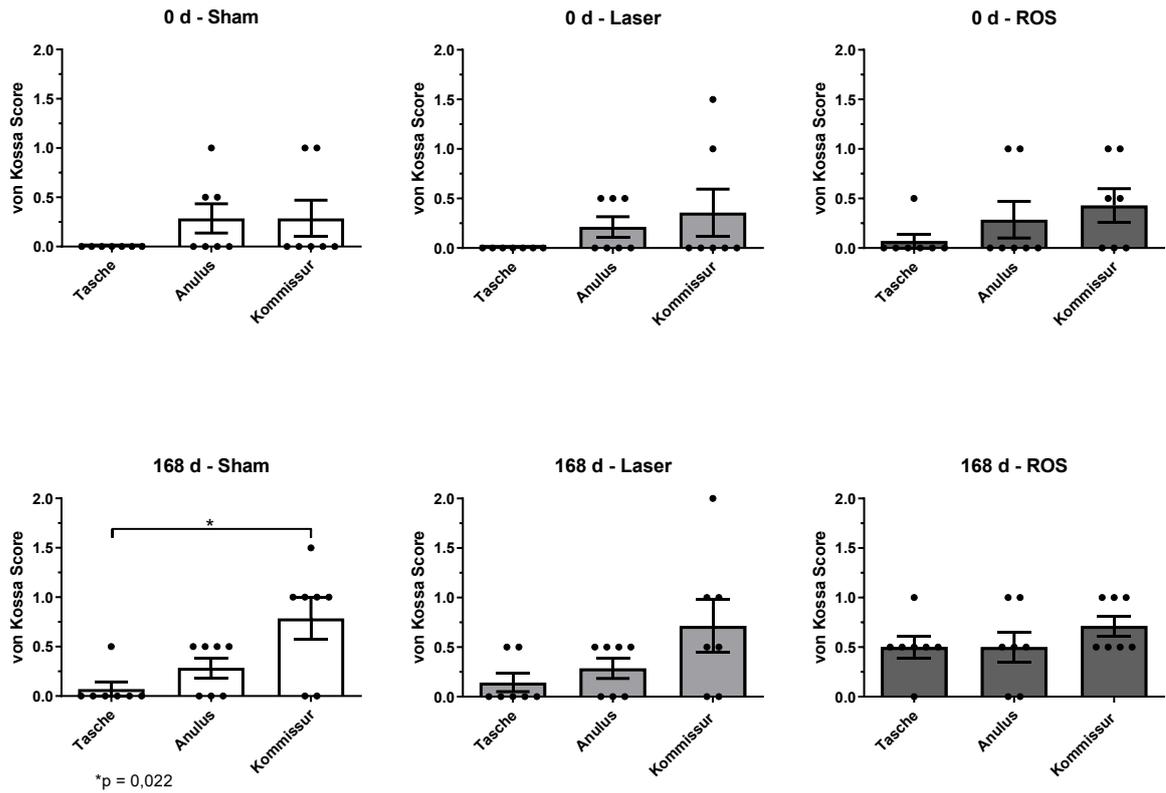


Abb. 17: Vergleich des von Kossa Scores der jeweiligen Gruppen in Abhängigkeit von der Region.

Semi-quantitative Gegenüberstellung der von Kossa Score-Werte einer jeweiligen Region (Tasche, Anulus, Kommissur) innerhalb einer Gruppe nach 0 und 168 Tagen mit einer Bestrahlungsdauer von 60 min. Die Kommissuren zeigen innerhalb der Sham-Gruppe nach 168 Tagen mit $p = 0,022$ einen signifikant höheren Wert, als die Aortenklappentaschen. Der statistische Vergleich erfolgte mit dem *Kruskal-Wallis-Test* mit $* p < 0,05$, dargestellt sind $M \pm SEM$.

Um die Verkalkung des Aortenklappengewebes innerhalb einer Gruppe zu untersuchen, erfolgte eine semi-quantitative Auswertung der Färbung mit Hilfe des von Kossa Scores. Nach 0 Tagen zeigten sich bei dem Vergleich der verschiedenen Regionen innerhalb einer Gruppe keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 17). Im Gegensatz dazu wiesen die Kommissuren der Sham-Gruppe nach 168 Tagen signifikant höhere Werte im von Kossa Score im Vergleich zu dem Taschengewebe auf (p -Wert = 0,022, *Kruskal-Wallis-Test*). In der Laser- und ROS-Gruppe konnten nach 168 Tagen keine signifikanten Unterscheidungen hinsichtlich der Gewebekalzifizierung dargestellt werden.

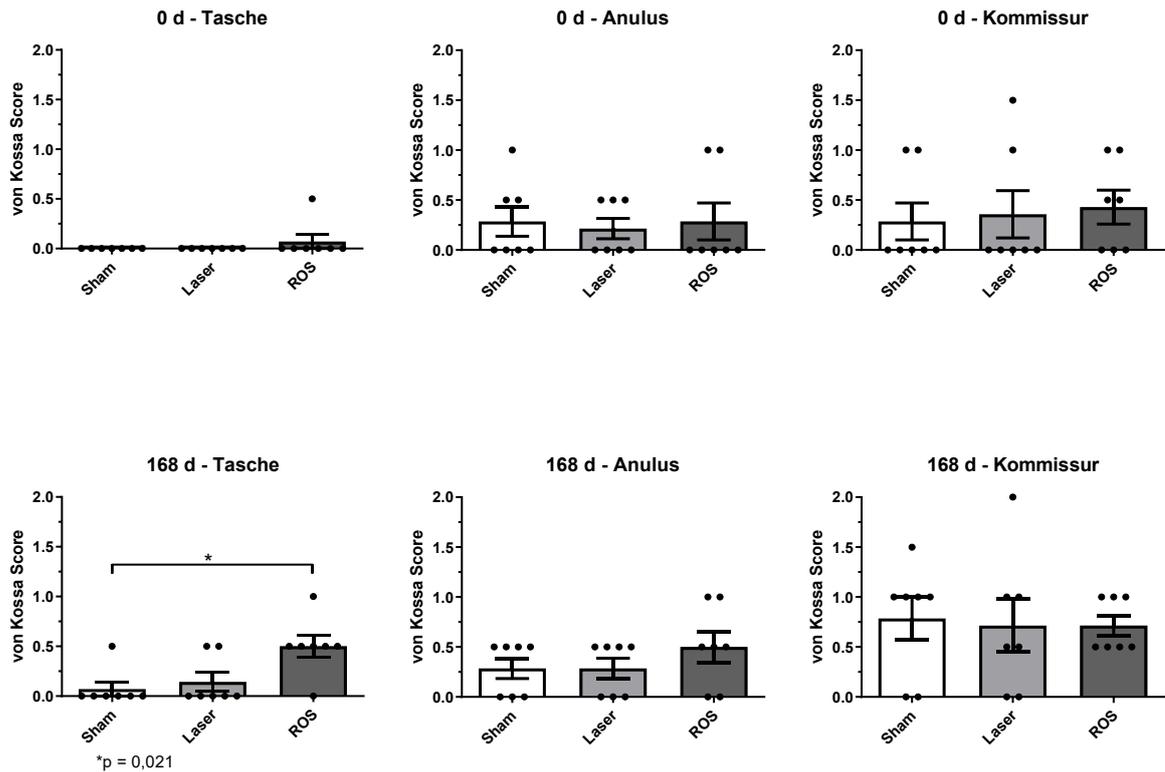


Abb. 18: Vergleich des von Kossa Scores der jeweiligen Aortenklappenregion in Abhängigkeit von der Gruppe.

Semi-quantitative Gegenüberstellung der von Kossa Score-Werte der ROS- sowie der Kontrollgruppen (Laser und Sham) innerhalb eines Aortenklappenabschnittes (Tasche, Anulus oder Kommissur) nach 0 und 168 Tagen und einer Bestrahlungsdauer von 60 min. Dabei zeigen die Aortenklappentaschen der ROS-Tiere nach 168 Tagen mit $p = 0,021$ signifikant höhere Werte im Von Kossa Score als die Taschen der Sham-Tiere. Der statistische Vergleich erfolgte mit dem *Kruskal-Wallis*-Test mit * $p < 0,05$, dargestellt sind $M \pm SEM$.

Bei der Gegenüberstellung der Werte der verschiedenen Interventionsgruppen innerhalb einer der drei Regionen der Aortenklappe konnten nach 0 Tagen keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Nach 168 Tagen zeigte sich hingegen eine signifikante „Mehr-Verkalkung“ ($p = 0,021$) in den Taschen der ROS-Tiere im Vergleich zu denen der Sham-Gruppe. In den Kommissuren und Anuli waren keine solcher Differenzen darzustellen.

Dies lässt Rückschlüsse auf eine beginnende Aortenklappenverkalkung in den Taschen der ROS-Gruppe 168 Tage nach fokaler Induktion oxidativen Stresses durch die PDR zu.

3.2 Endotheliale Integrität

Zur Beurteilung der endothelialen Integrität des Klappengewebes wurde eine immunfluoreszierende Vimentin- und vWF-Doppelfärbung durchgeführt. Der von-Willebrand-Faktor dient als endothelialer Marker, während Vimentin im Zytoplasma der valvulären Interstitialzellen vorkommt.

Um die Kontinuität des Klappenendothels zu analysieren, wurde das vWF-Immunfluoreszenz-Signal in den drei verschiedenen Regionen der Aortenklappe - den Taschen, den Anheftungsstellen (Kommissuren) und dem fibrösen Aortenring (Anulus) – unter den Interventionsgruppen zu den unterschiedlichen Nachlaufzeiten qualitativ beurteilt.

In den Klappentaschen wurde bei den ROS-Tieren ein diskontinuierliches vWF-Signal, unabhängig von den verschiedenen Explantationszeitpunkten, beobachtet. Diese Beobachtung spiegelte sich auch in den Kontrollgruppen (Laser und Sham) wieder (siehe Abb. 19).

Im Gegensatz dazu ließ sich in den Anuli unabhängig von den Interventionsgruppen und über die verschiedenen Nachlaufzeiten hinweg ein durchgängiges vWF-Signal darstellen (Abb. 20). Genau wie im Bereich der Taschen zeigte sich in den Kommissuren ein unterbrochenes Immunfluoreszenz-Signal des von-Willebrand-Faktors (Abb. 21). Hier ließen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen oder den Untersuchungszeitpunkten nach der PDR feststellen.

Folglich ließ sich mit Hilfe der Vimentin- und vWF-Doppelfärbung eine intakte Endothelzellschicht in den Anulus-Bereichen über die Gruppen und Zeitpunkte hinweg

darstellen, während die endotheliale Integrität in den Taschen und Kommissuren gestört zu sein scheint.

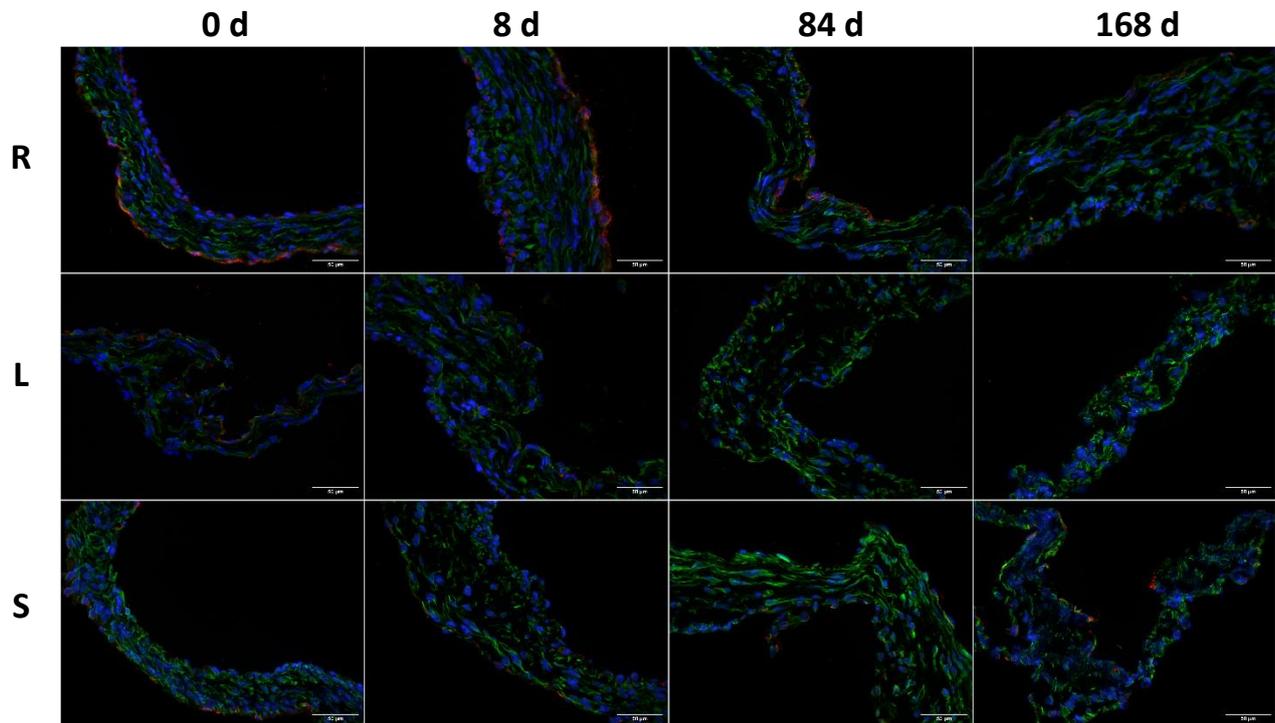


Abb. 19: Übersicht der Vimentin-vWF-Immunfluoreszenzfärbung der Taschen-Region.

Gegenüberstellung von exemplarischen Aufnahmen der ROS- (R), Laser- (L) und Sham-Gruppe (S) zu den unterschiedlichen Explantationspunkten. Maßstab 50 μm.

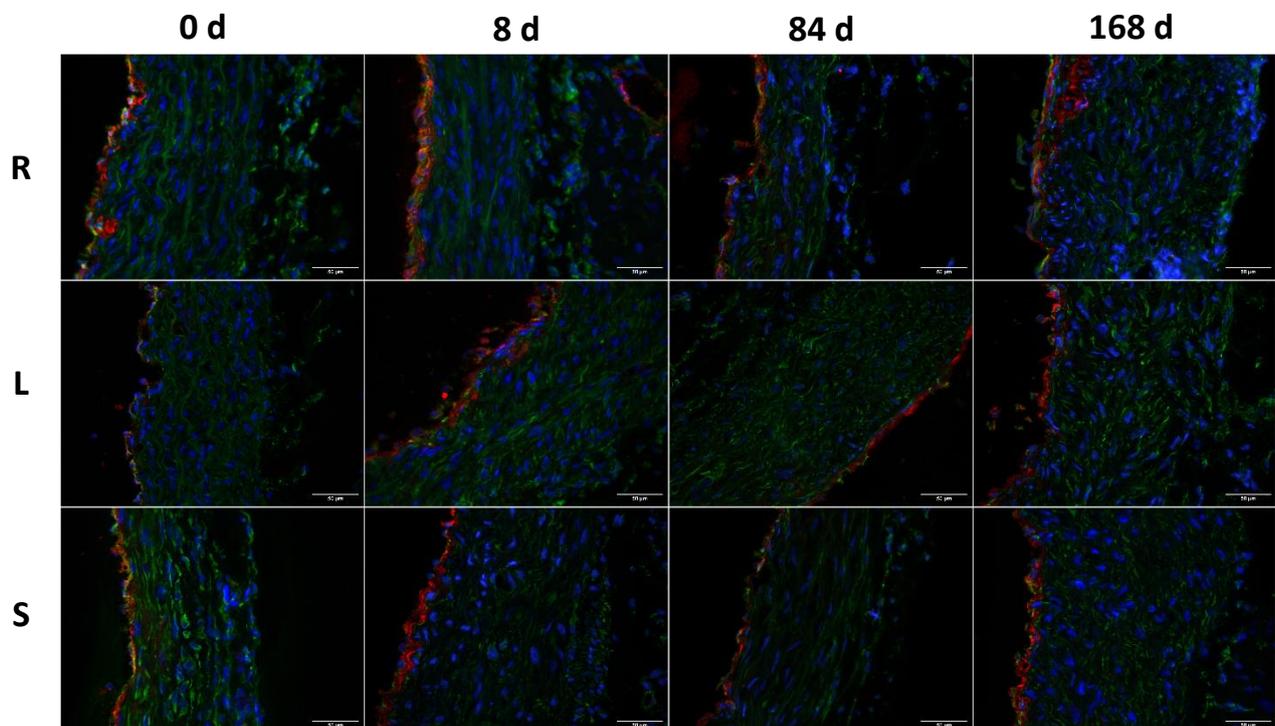


Abb. 20: Übersicht der Vimentin-vWF-Immunfluoreszenzfärbung der Anulus-Region.

Gegenüberstellung von exemplarischen Aufnahmen der ROS- (R), Laser- (L) und Sham-Gruppe (S) zu den unterschiedlichen Explantationspunkten. Maßstab 50 μm .

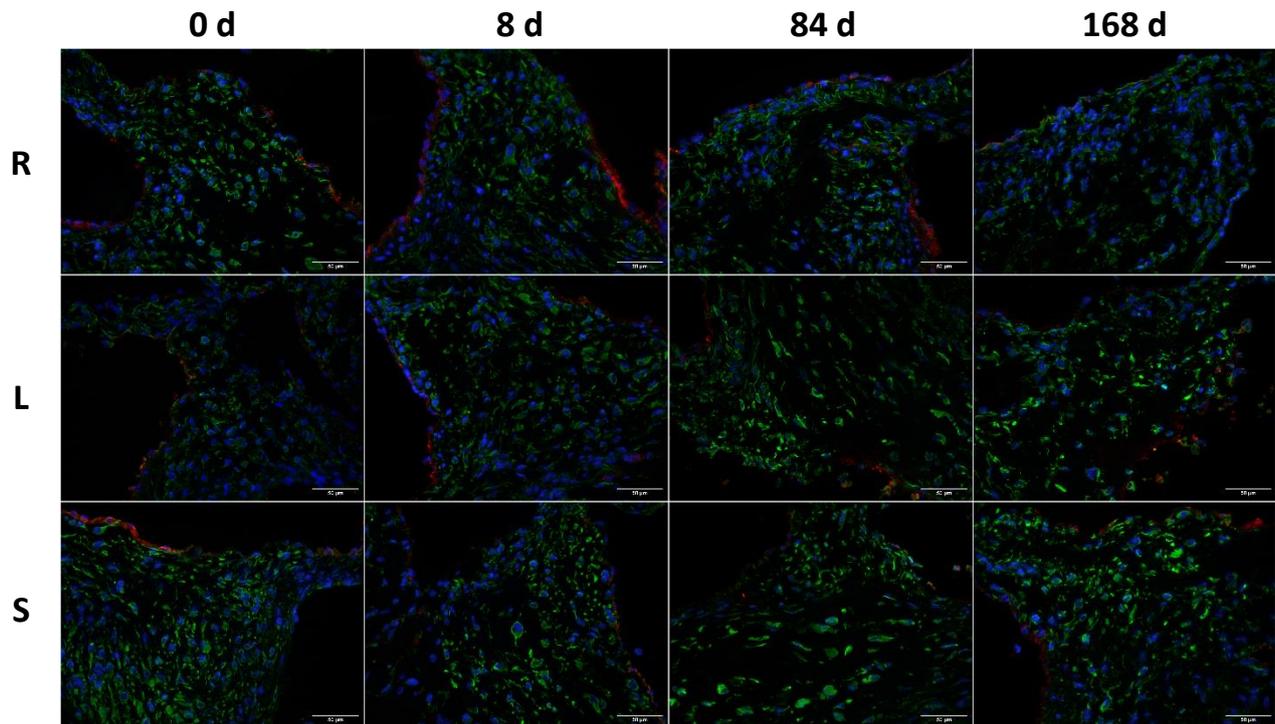


Abb. 21: Übersicht der Vimentin-vWF-Immunfluoreszenzfärbung der Kommissuren.

Gegenüberstellung von exemplarischen Aufnahmen der ROS- (R), Laser- (L) und Sham-Gruppe (S) zu den unterschiedlichen Explantationspunkten. Maßstab 50 μm .

3.3 Echokardiografie

Um die Auswirkungen des fokalen Einflusses reaktiver Sauerstoffspezies auf die Hämodynamik zu analysieren, wurden echokardiografische Untersuchungen durchgeführt und die transvalvulären Druckgradienten (Δp), die vor der Euthanasie der Tiere gemessen wurden, miteinander verglichen. Dieser korreliert mit dem Ausmaß einer Aortenklappenstenose.

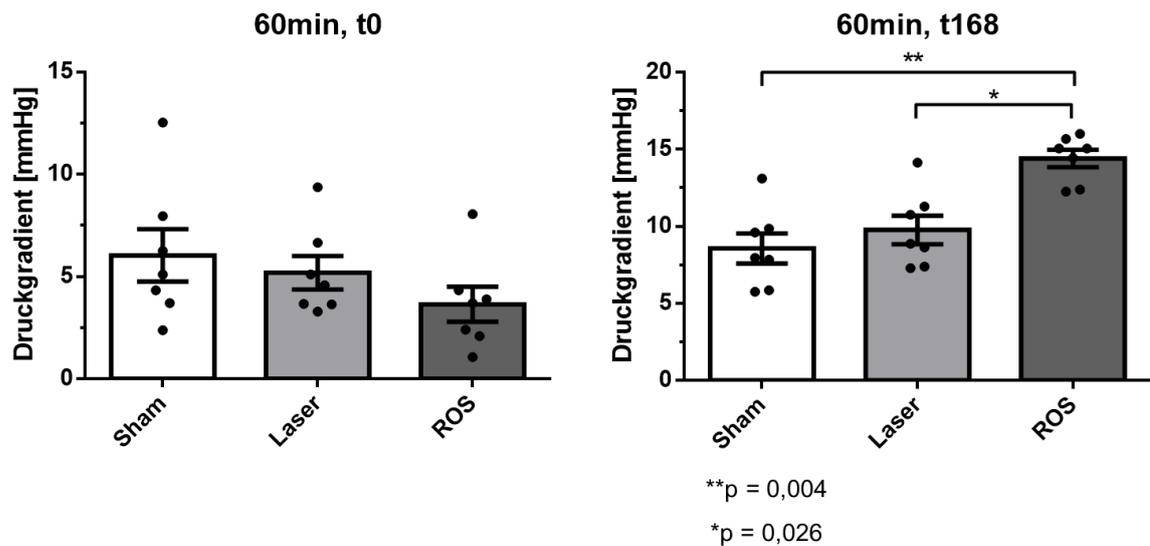


Abb. 22: Darstellung der transvalvulären Druckgradienten in Abhängigkeit der Interventionsgruppen.

Vergleich der echokardiografisch bestimmten Druckgradienten (in mmHg) zwischen der ROS- und den Kontrollgruppen (Laser und Sham) nach 0 und 168 Tagen mit einer Bestrahlungsdauer von 60 min. Dabei zeigt sich nach 168 Tagen ein signifikanter Anstieg in der ROS-Gruppe im Vergleich zur Sham- ($p = 0,004$) und Laser-Gruppe ($p = 0,026$). Der statistische Vergleich erfolgte mit dem *Kruskal-Wallis-* und *Dunn's multiple comparisons-*Test mit $* p < 0,05$ und $** p < 0,01$, dargestellt sind $M \pm SEM$.

Abbildung 22 zeigt bei den ROS-Tieren 168 Tage nach der PDR eine signifikante Druckerhöhung im Vergleich zur Sham- ($p = 0,004$) und Laser-Gruppe ($p = 0,026$). Dieser Effekt war nach unmittelbarer Explantation der Aortenklappen nach der photodynamischen Therapie (0 Tage) nicht zu beobachten.

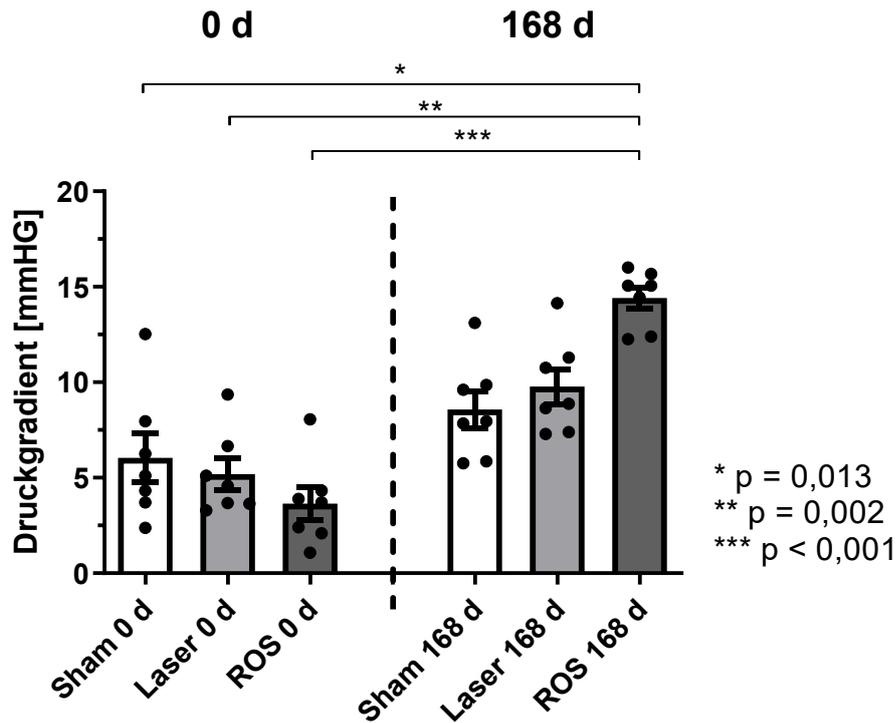


Abb. 23: Vergleich der Druckgradienten der Gruppen zu den Zeitpunkten 0 d und 168 d.

Dargestellt ist ein direkter Vergleich der transvalvulären Druckgradienten [mmHg] der jeweiligen Gruppen zum Zeitpunkt 0 Tage mit der Nachlaufzeit von 168 Tagen. Hierbei zeigt die ROS-Gruppe nach 168 Tagen signifikant höhere Werte als alle 3 Gruppe bei 0 Tagen (ROS 0d vs ROS 168d: $p < 0,001$, Laser 0d vs ROS 168d: $p = 0,002$, Sham 0d vs ROS 168d: $p = 0,013$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *Kruskal-Wallis*- und *Dunn's multiple comparisons*-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, dargestellt sind $M \pm SEM$.

Insgesamt wurde bei den ROS-Tieren nach 168 Tagen im Vergleich zu allen drei Interventionsgruppen nach 0 Tagen eine signifikante Erhöhung des transvalvulären Druckgradienten festgestellt. Die höchste statistische Signifikanz zeigte sich dabei mit einem p-Wert von 0,0001 zwischen den beiden ROS-Gruppen (0 vs. 168 Tage nach PDR).

Daraus lässt sich schließen, dass oxidativer Stress in der ROS-Gruppe 168 Tage nach der PDR im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Laser und Sham) zu einer hämodynamisch signifikanten Aortenklappenstenose geführt hat.

4 Diskussion

Die degenerative Aortenklappenerkrankung ist aufgrund der ansteigenden Inzidenz in einer durch den demografischen Wandel immer älter werdenden Bevölkerung von hoher klinischer Relevanz [7, 8, 31, 32].

Unterschiedliche Forschungsgruppen untersuchten, neben verschiedenen anderen Risikofaktoren, bereits den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der DAVD [73, 78, 81, 84]. Dabei bleibt der detaillierte Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf pathophysiologische Veränderungen weiterhin unklar.

Das Ziel dieser Arbeit war, in einem tierexperimentellen Versuchsmodell unter Zuhilfenahme der photodynamischen Reaktion lokal ROS an den Aortenklappen zu induzieren und deren Auswirkungen auf die osteochondrotische Zelldifferenzierung von VICs, die endotheliale Integrität und die Hämodynamik zu analysieren.

4.1 Entwicklung eines neuartigen Tiermodells

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges Tierversuchsmodell unter Zuhilfenahme der photodynamischen Reaktion verwendet. So wurde männlichen Ratten vom Wistar-Stamm der Biosensibilisator Foscan® systemisch über die Schwanzvene injiziert. 24 Stunden nach Verabreichung erfolgte eine 60-minütige fokale Laserbestrahlung der Aortenklappe. Die dazu verwendete Laserfaser wurde zuvor unter echokardiografischer Kontrolle über die Arteria carotis communis bis vor die Klappe vorgeschoben. Diese Tiere wurden der ROS-Gruppe zugeordnet. Zusätzlich existierten zwei Kontrollgruppen: Eine Gruppe erhielt die einstündige Laserbestrahlung ohne die vorherige Applikation des Sensibilisators (Laser-Gruppe). Der Zweiten wurde nur die inaktivierte Laserfaser implantiert (Sham-Gruppe). Die Explantation der Aortenklappen erfolgte unmittelbar nach der photodynamischen Therapie (0 Tage) sowie 8, 84 und 168 Tage danach zur weiteren histologischen und immunfluoreszierenden Untersuchung.

4.1.1 Vergleich Anatomie Ratte Vs. Mensch

In diesem Tierversuchsmodell wurde die Analyse pathophysiologischer Veränderungen innerhalb der Aortenklappe durch den Einfluss von ROS an Ratten durchgeführt. Das Herz-Kreislauf-System sowie der Aufbau des Herzens und der Herzklappen sind denen von Menschen ähnlich [115]. Die Aortenklappe besteht ebenfalls aus drei Taschen [116].

4.1.2 Die Photodynamische Reaktion als ROS-Induktor

Das Prinzip der PDR ist die Verabreichung eines Photosensibilisators, gefolgt von einem Verteilungsintervall mit anschließender Laser-Bestrahlung einer bestimmten Wellenlänge. Dadurch wird der Sensibilisator in einen erregten Zustand versetzt, was zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies führt [99-101]. In unserem Versuchsmodell wollten wir uns diesen Effekt zu Nutzen machen, um fokal oxidativen Stress an der Aortenklappe zu generieren.

Minol et. al. konnten bereits unter Verwendung des Sensibilisators Rose Bengal und eines Grünlicht-Lasers ROS in der Bauchaorta erzeugen, ohne dabei das Gefäßendothel zu verletzen [114]. Wir verwendeten mit Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) bzw. Temoporfin (Foscan®) einen der potentesten Biosensibilisatoren, der sich auch in geringen Medikamenten- und Lichtdosen noch hoch wirksam zeigt [102], und einen damit korrespondierenden Rotlicht-Laser, da mTHPC bei Wellenlängen von 652nm den höchsten Erregungskoeffizienten bzw. die höchste Fluoreszenzemission zeigt [105].

Die Bioverteilung sowie das Ausmaß der PDR-induzierten Nebenwirkungen werden maßgeblich durch das Zeitintervall zwischen Medikamentengabe und Laserbestrahlung beeinflusst [100, 103, 104]. Mit einer Zunahme dieses Intervalls nehmen die schädlichen Effekte auf das umliegende Gewebe ab [108]. In einer Untersuchung der Pharmakokinetik von Temoporfin in Ratten konnten Jones et. al. zwei Zeitpunkte definieren, bei denen die höchste Gewebskonzentration zu detektieren war, nämlich zwei bis vier und 24 Stunden nach der mTHPC-Applikation [107]. Die Leber, die Nieren und das Herz zeigten sich hierbei als bevorzugte Anreicherungsorte. Insgesamt erwies sich die photodynamische Reaktion bei einem Verteilungsintervall von 24 Stunden wirksamer als nach zwei Stunden [107]. Hierfür wurde eine höhere intrazelluläre Foscan®-Konzentration verantwortlich gemacht. In einem anderen tierexperimentellen Modell wurden in Hasen die größtmöglichen Effekte der photodynamischen Reaktion unter Verwendung von Temoporfin analysiert [108]. Dabei

zeigte sich jeweils ein Effektmaximum bei einer Medikamentendosierung von 0,3 mg/kg KG, einem Verteilungsintervall von 24 Stunden und Lichtdosen von 20 J/cm². In der darauffolgenden histologischen Untersuchung des gesamten Behandlungsfeldes stellten sich starke Gewebsreaktionen in Form von Zelluntergang (Nekrosen), Ödemen innerhalb der Gefäßwände und Schädigung der Endothelzellschicht sowie Demyelinisierung von Nervenstrukturen dar. Rupturen der Blutgefäße wurden nicht beobachtet. Trotz der starken schädlichen Wirkung der PDR auf das umliegende Gewebe, konnten keine klinischen Symptome hervorgerufen werden.

In Anlehnung daran wählten wir in unserem Tiermodell eine Foscan[®]-Dosis von 0,3 mg/kg KG sowie ein Intervall von 24 Stunden bis zur Laserbestrahlung, um den größtmöglichen Effekt der photodynamischen Reaktion im Hinblick auf fokale ROS-Induktion zu erlangen. In der ersten Phase dieser Untersuchung (bislang unveröffentlichte Daten von L.A. Jacobi) konnten darunter ein stärkerer Effekt der PDR mit Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies nach einer Laserbestrahlungsdauer von 60 Minuten (im Vergleich zu 10 Minuten) ohne Gewebsreaktionen im Sinne von Zellnekrosen oder Apoptose detektiert werden.

4.2 ROS-bedingte VIC Aktivierung und Transformation

Die Pathogenese der degenerativen Aortenklappenerkrankung ist ein progressiver und aktiv regulierter Prozess [2, 18, 32, 35, 41] und durch die Aktivierung valvulärer Interstitialzellen gekennzeichnet [16, 46, 47]. Diese kann von reaktiven Sauerstoffspezies induziert werden [73].

4.2.1 Expression osteochondrogener Marker – die Rolle von Sox9

Der *sry-related transcription factor 9* (Sox9) ist ein chondrozytenspezifischer Transkriptionsfaktor und spielt in frühen sowie späten Stadien der Knorpel- und Knochenentwicklung eine wichtige Rolle [117]. In der Entwicklung der degenerativen Aortenklappenerkrankung kommt es zu einer Aktivierung ruhender Interstitialzellen (VICs) und dadurch zu deren Transformation in Osteoblasten-ähnliche Zellen [16, 46, 47]. Diese exprimieren osteochondrogene Marker wie Sox9, RunX2, BMP2, Osteopontin, Osteocalcin und alkalische Phosphatase [22, 48].

Um die Transformation von VICs in einen osteochondrogenen Phänotypen in Folge der ROS-Exposition zu detektieren, wurde eine Sox9-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Das Sox9-Signal stellte sich hierbei insgesamt sehr heterogen und unspezifisch über die jeweiligen Gruppen und Explantationszeitpunkte hinweg verteilt dar. Lediglich die Kommissuren der ROS-Tiere zeigten im Vergleich zu deren Taschengewebe und zum fibrösen Anulus eine ausgeprägte Sox9-Immunfluoreszenz. Zusammenfassend konnte im Vergleich zu den Sham- und Kontrollgruppen mithilfe dieser Färbung keine belastbare Aussage über das Aktivitätsverhalten der VICs getroffen werden.

Verschiedene Forschungsgruppen konnten feststellen, dass Sox9 in valvulären Interstitialzellen hoch exprimiert ist und eine reduzierte Funktion dieses Transkriptionsfaktors in der Entwicklung der DAVD eine kausale Rolle spielt [25, 117, 118].

In der Knochenentwicklung hemmt Sox9 die RunX2-vermittelte Aktivierung osteogener Zielgene und wirkt dadurch transkriptionsunterdrückend auf die Osteoblastendifferenzierung und Chondrozytenhypertrophie [119].

Sox9 ist als Transkriptionsfaktor an der Reifung und Funktion der Herzklappen in späteren Stadien der Herzklappenentwicklung beteiligt und für die Differenzierung der Zelllinien sowie die Organisation der extrazellulären Matrix erforderlich [117].

Huk et. al. untersuchten die Expression von Sox9 in explantiertem humanem Aortenklappengewebe und detektierten eine verringerte Konzentration in VICs nahe verkalkter Regionen sowie eine Verlagerung des Expressionsortes vom Zellkern ins Zytoplasma [25]. In vitro führte eine verminderte Sox9-Expression zum Verlust der nukleären Lokalisation und zu erhöhten RunX2-Konzentrationen. Valvuläre Endothelzellen konnten durch eine Verminderung der RunX2-Level die Kernlokalisierung von Sox9 beibehalten und so die VICs vor Verkalkungsprozessen schützen.

Gegensätzlich zu diesen Ergebnissen detektierten Wirrig et. al. eine Hochregulation von Sox9 und einen daraus resultierenden Einfluss auf die Aktivierung und Differenzierung von VICs in erkrankten adulten Herzklappen [51].

Zusammenfassend scheint eine Assoziation von Sox9 mit der Aktivierung valvulärer Interstitialzellen zu existieren, die genaue Rolle in den pathophysiologischen Prozessen ist in der Literatur allerdings umstritten. So sind sowohl eine verminderte Sox9 Funktion mit konsekutiv erhöhten RunX2-Konzentrationen, als auch eine Hochregulation des

Transkriptionsfaktors mit der Entwicklung einer kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung beobachtet worden. Diese Diskrepanz lässt sich auch auf die Ergebnisse unserer Immunfluoreszenzfärbung übertragen. Es konnten keine Unterschiede im Sox9-Signal zwischen der ROS- und den Kontrollgruppen (Laser und Sham) über die verschiedenen Nachlaufzeiten hinweg detektiert werden. Dies könnte auf das widersprüchliche Expressionsverhalten von Sox9 nach Aktivierung von VICs zurückzuführen sein.

4.2.2 Fibrose und Kalzifikation

Zunehmende fibrotische Umbauprozesse und Verkalkungen der Aortenklappe stellen die Endstrecke der Pathogenese der DAVD dar, die letztendlich zur Klappendysfunktion und hämodynamischen Veränderungen führt [63]. Mithilfe der von Kossa Färbung lassen sich indirekt Kalkeinlagerungen im Gewebe nachweisen.

In dieser Arbeit konnte eine signifikant stärkere Kalzifikation des Taschengewebes in der ROS-Gruppe nach 168 Tagen als in der parallelen Sham-Gruppe festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die fokale Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch die photodynamische Reaktion zu (extra-) zellulären Veränderungen führt, die letztendlich in der Verkalkung des Klappengewebes münden.

Der Kalzifikationsprozess beginnt auf der aortalen Seite der Klappentaschen in der Lamina Fibrosa [11, 45]. Lerman et. al. [2] beschrieben ebenfalls das initiale Auftreten von Verkalkungsherden an der Basis der Taschen. Die Progression von der Aortenklappenfibrose hin zu einer manifesten Stenose ist durch aktive Prozesse der Biomineralisation und Verknöcherung gekennzeichnet. Dabei ist die Aktivierung von Regulationswegen der Knochenmineralisierung beobachtet worden [22, 48]. Chakraborty et. al. stellten bei differenzierten Herzklappen ein ähnliches Genexpressions-Profil wie in Osteoblasten fest [120].

In einem tierexperimentellen Modell zeigten Aortenklappen von Hasen, die über acht Wochen eine Cholesterin- und Vitamin D-haltige Diät erhalten haben, eine vermehrte Einlagerung von Kollagen und subendothelialen Kalkkonglomeraten im Bereich der Taschen [84]. Zusätzlich wurden erhöhte Superoxid-Konzentrationen in Verkalkungsherden umgebenden Zellen

detektiert. Miller et. al. [26] stellten bereits erhöhte ROS-Konzentrationen in gesundem Klappengewebe von Mäusen fest und deuteten oxidativen Stress somit als einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Aortenklappenverkalkung, der nicht unbedingt nur die Folge bzw. eine Konsequenz erhöhten Klappenstresses ist.

Die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen decken sich hierbei mit den Ergebnissen unserer von Kossa Färbung. Limitierend könnte hierbei die Auswertungsmethode sein. Zum einen konnten keine Punktwerte im von Kossa Score von ≥ 3 vergeben werden, was bedeutet, dass in dieser Arbeit eher Mikroverkalkungen als größere Kalkschollen beobachtet wurden. Zum anderen wurde die Auswertung zwar verblindet durchgeführt, allerdings lassen sich Fehlinterpretationen bei semi-quantitativen Methoden (von Kossa Score) durch untersucherabhängige Unter- bzw. Überbewertungen von morphologischen Veränderungen nicht ausschließen.

4.3 Die Rolle von ROS und der endothelialen Integrität auf die Entwicklung der DAVD

Es wird angenommen, dass eine Unterbrechung der endothelialen Integrität als Folge wiederholter mechanischer Belastungen der Aortenklappe auftritt und ein primäres Ereignis in der Initiationsphase der degenerativen Aortenklappenerkrankung darstellt [3, 14, 46, 121]. Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies erweisen sich durch eine Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit als eine der Ursachen der endothelialen Dysfunktion [50, 69, 97, 98].

Um Störungen der endothelialen Integrität nach fokaler ROS-Generation durch die photodynamische Reaktion zu detektieren, wurde eine Vimentin- und vWF-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Der von-Willebrand-Faktor ist ein Glykoprotein, das in Endothelzellen vorkommt und normalerweise die Thrombozytenadhäsion vermittelt [122]. Vimentin ist ein zytoplasmatisches Intermediärfilament und befindet sich auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen, unter anderem von VICs und VECs [123]. In der qualitativen Auswertung zeigte sich im Bereich der Anuli ein durchgängiges vWF-Signal, das zu den Kommissuren und Taschenklappen immer diskontinuierlicher wurde. Dabei war kein Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen oder über die Nachlaufzeitpunkte hinweg zu beobachten.

In verschiedenen Studien wurde der Einfluss oxidativen Stresses auf die Endothelfunktion untersucht. Li et. al. stellten fest, dass das Endothel in Gefäßen über verschiedene enzymatische Reaktionen selbst reaktive Sauerstoffspezies generiert und analysierten hierbei die Rolle von Superoxid-Anionen (O_2^-) [91]. Diese haben zum einen physiologische Funktionen, indem sie über den Hypoxie-induzierten-Faktor 1 (HIF-1) essentiell die vaskuläre Homöostase und über Interaktion mit NO den Gefäßtonus regulieren. Zum anderen führen sie zu oxidativen Schäden an Makromolekülen, Membranen und der DNA.

Durch die Reaktion von ROS (O_2^-) mit NO entsteht Peroxynitrit ($ONOO^-$). Infolgedessen kommt es zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit und zur endothelialen Dysfunktion, die mit dem Beginn einer der DAVD assoziiert ist [24, 67, 81, 83, 94, 124]. O_2^- kann über die Superoxiddismutase ebenso weiter zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagieren. H_2O_2 führt dabei zur einer verminderten NO-Sekretion in valvulären Endothelzellen sowie zu einer verminderten Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) [83]. Sowohl Superoxid-Anionen, als auch Wasserstoffperoxid sind in verkalkten Regionen der Aortenklappe erhöht und tragen zur osteogenen Aktivierung von VICs bei [65, 78, 81, 83, 84, 125]. Umgekehrt kann ein endothelialer Mangel an Stickstoffmonoxid, verstärkt durch die Entkopplung der eNOS, zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen. Dieser Effekt ist typischerweise in perikalkulären Regionen in humanen degenerativ veränderten Aortenklappen zu beobachten [14, 73, 81, 83]. Auch in anderen kardiovaskulären Erkrankungen wie z.B. der Atherosklerose, der arteriellen Hypertonie oder der Herzinsuffizienz konnte eine endotheliale Dysfunktion durch eine verstärkte Inaktivierung von NO durch ROS beobachtet werden [50, 69, 98].

Folglich könnte die von uns beobachtete Diskontinuität des von-Willebrand-Faktors im Bereich des Taschengewebes und der Kommissuren ein Hinweis auf eine geschädigte Endothelzellschicht und somit ein möglicher Indikator für die Entwicklung einer Aortenklappenstenose sein. Zusätzlich wird die endotheliale Dysfunktion infolge erhöhter mechanischer Belastung als Haupttriebkraft für die Entwicklung der DAVD angesehen. Dafür spricht, dass vermehrter Scherstress vor allem an der Basis der Taschenklappen herrscht, der Stelle der Aortenklappe, an der die Verkalkungsprozesse zuerst auftreten [14]. Diese Aussage deckt sich mit den Ergebnissen unserer Doppelfärbung, da im Bereich der Kommissuren Unterbrechungen des vWF-Layers, also der Endothelzellschicht, festgestellt wurden. Allerdings ließen sich keine Diskrepanzen zwischen der ROS- und den beiden Kontrollgruppen

über die unterschiedlichen Explantationszeitpunkte hinweg finden. Dieser nicht vorhandene Unterschied zeigt, dass die fokale ROS-Exposition offensichtlich keinen morphologischen Schaden gesetzt hat.

Insgesamt ist zu beachten, dass es bei dem histologischen Aufarbeitungsprozess der Gewebeproben zur Schädigung des Endothels etwa durch das Einfrieren oder die Herstellung der Schnitte mittels Gefriermikrotom kommen und so die histo-chemische Beurteilung erschweren kann. So ist die von uns beobachtete Diskontinuität des vWF-Layers möglicherweise auch präparationsbedingt. Folglich muss diskutiert werden, ob die von uns gewählte Methode der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung hinreichend zur Beurteilung der endothelialen Integrität ist, da sie anfällig für aufarbeitungsbedingte Schädigungen des Gewebes sein kann und Aussagen hinsichtlich der Endothelfunktion in gewisser Weise limitiert. Weil diese, wie oben beschrieben, maßgeblich von der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid abhängt, wäre eine Analyse der NO- oder eNOS-Expression vielleicht zielführender gewesen. Da es mehrere Ursachen der endothelialen Dysfunktion gibt, hätte durch eine zusätzliche Untersuchung der Peroxynitrit-Level somit gegebenenfalls auch eine Aussage über den direkten Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die NO-Bioverfügbarkeit getroffen werden können.

4.4 Hämodynamisches Monitoring – der transvalvuläre Druckgradient

Die Herzklappen haben einen essentiellen Anteil an der Aufrechterhaltung eines unidirektionalen Blutflusses [2, 7]. Die Aortenklappe bildet dabei die Schaltstelle zwischen dem Herzen (linke Herzkammer) und dem Körperkreislauf (Aorta). Bei der DAVD muss der linke Ventrikel mehr Druck aufbringen, um dasselbe Schlagvolumen pro Zeit aufrechterhalten zu können. Dies führt im Verlauf zu einer Linksherzhypertrophie und endet langfristig in einer linksventrikulären Dysfunktion [27, 53].

Der diagnostische Goldstandard zur Beurteilung der Schwere einer Aortenklappenstenose ist die transthorakale Echokardiografie [53]. Mithilfe der Bestimmung verschiedener Parameter kann das Ausmaß der hämodynamischen Auswirkungen abgeschätzt werden [28]. Am aussagekräftigsten sind dabei die Klappenöffnungsfläche, die aortale Ausflussgeschwindigkeit und der transvalvuläre Druckgradient [53, 57].

In dieser Arbeit wurde der transvalvuläre Druckgradient echokardiografisch bestimmt, um hämodynamische Konsequenzen der durch oxidativen Stress hervorgerufenen (extra-) zellulären Veränderungen der Aortenklappe zu analysieren. Die ROS-Gruppe wies hierbei 168 Tage nach der PDR signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppen zu diesem Zeitpunkt auf. Auch im direkten Vergleich zeigten die ROS-Tiere nach 168 Tagen signifikant höhere transvalvuläre Druckgradienten als in der Sham-, Laser- und ROS-Gruppe zum Explantationszeitpunkt unmittelbar nach der fokalen ROS-Induktion (0 Tage). Folglich scheinen reaktive Sauerstoffspezies langfristig zu hämodynamisch relevanten Veränderungen der Aortenklappe zu führen.

Der transvalvuläre Druckgradient beschreibt den systolischen Druckunterschied zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta und steigt quadratisch mit der Erhöhung der Blutdurchflussgeschwindigkeit (V , *velocity*) und lässt sich mit Hilfe der Formel $\Delta p = 4 \times V^2$ berechnen [53, 57]. Dabei hängt die Blutdurchflussgeschwindigkeit direkt von der Klappenöffnungsfläche der Aortenklappe ab [13, 53]. Somit eignet sich der Δp gut zur Beurteilung des Schweregrades der Aortenklappenstenose [126]. Otto et. al. zeigten in echokardiografischen Untersuchungen von 42 Patient:innen mit einer gesicherten Stenose der Aortenklappe über ein mittleres Zeitintervall von 20 Monaten eine Erhöhung des durchschnittlichen transvalvulären Druckgradienten [28]. Darunter entwickelten die Hälfte eine Progression der Symptome, die einen chirurgischen Klappenersatz notwendig machte. Bei diesen Patient:innen wurde eine stärkere Erhöhung des mittleren Druckgradienten beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass in unserem Modell eine signifikante Druckerhöhung in der ROS-Gruppe nach 168 Tagen auf eine morphologische Veränderung der Aortenklappen mit daraus resultierender Stenose zurückzuführen ist, die in den Kontrollgruppen zum selben Zeitpunkt nicht vorzuliegen scheint. Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse der von Kossa Färbung. Hier zeigten sich ebenfalls bei den ROS-Tieren im Vergleich zur Sham-Gruppe nach 168 Tagen signifikant höhere Kalzifikationsgrade im Bereich der Taschen.

Es gibt allerdings auch in der Klinik Fälle, in denen trotz einer Zunahme der Schwere der Aortenklappenstenose kein Anstieg oder sogar eine Verminderung der Druckgradienten gemessen wird [28]. Dieser ist unter anderem abhängig von der Klappenfläche und dem transaortalen Volumenfluss, der bei Stenose-Progression trotz einer verminderten

Klappenöffnungsfläche abnehmen kann. Dieses Phänomen wird vor allem bei linksventrikulärer Dysfunktion beobachtet und auch als „*Low-Flow/ Low-Gradient-Aortenklappenstenose*“ (niedriger Fluss und niedriger Δp) bezeichnet [28, 57].

Das gleichzeitige Vorliegen einer arteriellen Hypertonie, wie es bei 35 – 45 % der Patient:innen mit DAVD der Fall ist, kann den echokardiografisch bestimmten transvalvulären Druckgradienten verfälschen und damit die Diagnostik der Aortenklappenstenose erschweren [13, 53]. Erhöhte systolische Blutdrücke senken den Druckunterschied zum linken Ventrikel und vermindern so den Druckgradienten.

Aus diesem Grund könnte es irreführend sein, einzig Δp in Bezug auf die Diagnose und das Monitoring der DAVD zu betrachten. Dies könnte eine Limitation in unserer Untersuchung der Hämodynamik darstellen, da weder die Klappenöffnungsfläche, noch die aortale Blutflussgeschwindigkeit mit in unseren Analysen einbezogen wurden. Dabei ist es empfohlen, alle drei Parameter hinzuzuziehen [53, 56, 57].

4.5 Limitierungen der Arbeit

Die Pathogenese der degenerativen Aortenklappenerkrankung ist multifaktoriell bedingt und zeichnet sich durch einen aktiven, progredient verlaufenden Krankheitsprozess aus. Mit Hilfe des von uns entwickelten Kleintiermodells konnte durch die photodynamische Reaktion oxidativer Stress lokal in der Aortenklappe generiert werden.

Der Nachweis einer Aktivierung der VICs gelang nicht über die immunfluoreszierende Darstellung von Sox9. Ähnlich verhielt es sich in der Analyse der endothelialen Integrität mittels der Vimentin-vWF-Doppelfärbung. Ein Grund dafür könnte sein, dass die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen eventuell nicht mit ausreichender Genauigkeit per immunhistologischer Analysen erfasst werden können. Da sich frühe pathophysiologische Veränderungen zunächst auf Gen- bzw. Proteinbasis demarkieren, wäre eine Untersuchung mittels PCR oder Western-Blot gegebenenfalls zielführender gewesen.

Im Hinblick auf die Pathogenese der DAVD werden während der Aktivierung von VICs zum Beispiel BMP2 und RunX2 in der Literatur als die dominierenden exprimierten Marker beschrieben [47, 49]. So wurden in unserem Tiermodell vielleicht nicht genug Faktoren untersucht, um eine genauere Einordnung des Untersuchungszeitpunktes innerhalb der Signalkaskaden vornehmen zu können. Hierfür müsste ein Modell mit hinreichender Tierzahl

aufgestellt werden, um genug Material für etwaige Analysen zu erhalten und um ausreichende Populationsgrößen zu erreichen, sodass auch geringere Effekte detektiert werden können.

4.6 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde der Einfluss lokal generierter reaktiver Sauerstoffspezies auf die Entwicklung einer Aortenklappenstenose mit besonderem Augenmerk auf die osteochondrale Differenzierung von VICs, die endotheliale Integrität und die Hämodynamik analysiert. Hierfür wurde ein neuartiges Tiermodell verwendet, bei dem oxidativer Stress direkt an der Aortenklappe von Ratten mit Hilfe der photodynamischen Reaktion induziert wurde.

Zusammenfassend konnte eine hämodynamische Relevanz, im Sinne einer Aortenklappenstenose, von möglichen (extra-) zellulären Veränderungen mit der morphologischen Evidenz einer Taschen-Kalzifikation im Vergleich zu den Kontrollgruppen detektiert werden. Eine Aktivierung der valvulären Interstitialzellen mit Transformation in einen Osteoblasten-ähnlichen knochenaufbauenden Phänotypen sowie die Auswirkungen auf die Integrität der Endothelzellschicht waren mit den gewählten Methoden in dieser Untersuchung nicht erkennbar.

Oxidativer Stress und ROS traten als Einflussfaktoren in der Entwicklung einer degenerativen Aortenklappenerkrankung bereits in mehreren Arbeiten immer weiter in den Vordergrund und konnten nun auch mit Hilfe dieses Modells als solche identifiziert werden. Nichtsdestotrotz bleiben die exakten frühen pathophysiologischen Mechanismen weiterhin unklar, sodass spezifischere Studien zukünftig erforderlich sind, um medikamentöse Zielpunkte oder -gene zu detektieren, die präventiv einer klinisch relevanten DAVD vorbeugen können. So bietet diese Möglichkeit der fokalen ROS-Induktion durch die PDR eine Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Pathogenese.

5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

5.1 Abbildungen

Abb. 1: Anatomischer Aufbau des Herzens.	1
Abb. 2: Histologischer Aufbau der Aortenklappentaschen.	3
Abb. 3: Pathophysiologie der degenerativen Aortenklappenerkrankung.	6
Abb. 4: Chemische Struktur von Temoporfin (mTHPC, Foscan®).	14
Abb. 5: Operationssitus eines intubierten, narkotisierten Versuchstieres.	19
Abb. 6: Echokardiografische Lagekontrolle.	20
Abb. 7: Definierter Querschnitt der Aortenklappe.	21
Abb. 8: Schema Antikörperverteilung.	23
Abb. 9: Schema Unterteilung Aortenklappenschnitt.	26
Abb. 10: Quantitative Auswertung der Sox 9 Immunfluoreszenz.	27
Abb. 11: Bildaufnahmen Immunfluoreszenz.	28
Abb. 12: Prozentualer Sox9-Anteil (area fraction in %) in Abhängigkeit der jeweiligen Interventionsgruppe.	33
Abb. 13: Übersicht der Sox9 Immunfluoreszenzfärbung der Taschen-Region.	34
Abb. 14: Übersicht der Sox9 Immunfluoreszenzfärbung der Anulus-Region.	35
Abb. 15: Übersicht der Sox9 Immunfluoreszenzfärbung der Kommissuren.	35
Abb. 16: Übersicht der von Kossa Färbung.	36
Abb. 17: Vergleich des von Kossa Scores der jeweiligen Gruppen in Abhängigkeit von der Region.	37
Abb. 18: Vergleich des von Kossa Scores der jeweiligen Aortenklappenregion in Abhängigkeit von der Gruppe.	38
Abb. 19: Übersicht der Vimentin-vWF-Immunfluoreszenzfärbung der Taschen-Region.	40
Abb. 20: Übersicht der Vimentin-vWF-Immunfluoreszenzfärbung der Anulus-Region.	40
Abb. 21: Übersicht der Vimentin-vWF-Immunfluoreszenzfärbung der Kommissuren.	41
Abb. 22: Darstellung der transvalvulären Druckgradienten in Abhängigkeit der Interventionsgruppen.	42
Abb. 23: Vergleich der Druckgradienten der Gruppen zu den Zeitpunkten 0 d und 168 d.	43

5.2 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht Studiendesign.	18
Tabelle 2: Echokardiografische Parameter mit Definition.	25

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Misfeld, M. and H.H. Sievers, *Heart valve macro- and microstructure*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007. **362**(1484): p. 1421-36.
2. Lerman, D.A., S. Prasad, and N. Alotti, *Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Eur Cardiol, 2015. **10**(2): p. 108-112.
3. Mohler, E.R., 3rd, *Mechanisms of aortic valve calcification*. Am J Cardiol, 2004. **94**(11): p. 1396-402, a6.
4. Behrends, J.C., et al., *Duale Reihe - Physiologie*. Vol. 1. 2010, Deutschland: Thieme.
5. Schoen, F.J., *Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 161-83.
6. Aikawa, E. and F. Schoen, *Calcific and Degenerative Heart Valve Disease*. Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease, 2014: p. 161-180.
7. Hinton, R.B. and K.E. Yutzey, *Heart valve structure and function in development and disease*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 29-46.
8. Chen, J., W. Li, and M. Xiang, *Burden of valvular heart disease, 1990-2017: Results from the Global Burden of Disease Study 2017*. J Glob Health, 2020. **10**(2): p. 020404.
9. Song, F., et al., *Clinical, sonographic characteristics and long-term prognosis of valvular heart disease in elderly patients*. J Geriatr Cardiol, 2019. **16**(1): p. 33-41.
10. Rajamannan, N.M., et al., *Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update*. Circulation, 2011. **124**(16): p. 1783-91.
11. Aikawa, E., et al., *Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease*. Circulation, 2007. **115**(3): p. 377-86.
12. Dutta, P., et al., *Genetic and Developmental Contributors to Aortic Stenosis*. Circ Res, 2021. **128**(9): p. 1330-1343.
13. Gould, S.T., et al., *Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease*. Circ Res, 2013. **113**(2): p. 186-97.
14. Kraler, S., et al., *Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy*. Eur Heart J, 2021.
15. Sacks, M.S., W. David Merryman, and D.E. Schmidt, *On the biomechanics of heart valve function*. J Biomech, 2009. **42**(12): p. 1804-24.
16. Leopold, J.A., *Cellular mechanisms of aortic valve calcification*. Circ Cardiovasc Interv, 2012. **5**(4): p. 605-14.
17. Fernández Esmerats, J., J. Heath, and H. Jo, *Shear-Sensitive Genes in Aortic Valve Endothelium*. Antioxid Redox Signal, 2016. **25**(7): p. 401-14.
18. Freeman, R.V. and C.M. Otto, *Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies*. Circulation, 2005. **111**(24): p. 3316-26.
19. Serviere. *Servier Medical Art*. 2020; Available from: <https://smart.servier.com/>.
20. Rabkin-Aikawa, E., et al., *Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves*. J Heart Valve Dis, 2004. **13**(5): p. 841-7.
21. Liu, A.C., V.R. Joag, and A.I. Gotlieb, *The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology*. Am J Pathol, 2007. **171**(5): p. 1407-18.
22. Yutzey, K.E., et al., *Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(11): p. 2387-93.

23. Hjortnaes, J., et al., *Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2015. **242**(1): p. 251-260.
24. Bosse, K., et al., *Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **60**: p. 27-35.
25. Huk, D.J., et al., *Valve Endothelial Cell-Derived Tgfb1 Signaling Promotes Nuclear Localization of Sox9 in Interstitial Cells Associated With Attenuated Calcification*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(2): p. 328-38.
26. Miller, J.D., R.M. Weiss, and D.D. Heistad, *Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms*. *Circ Res*, 2011. **108**(11): p. 1392-412.
27. Nkomo, V.T., et al., *Burden of valvular heart diseases: a population-based study*. *Lancet*, 2006. **368**(9540): p. 1005-11.
28. Otto, C.M., A.S. Pearlman, and C.L. Gardner, *Hemodynamic progression of aortic stenosis in adults assessed by Doppler echocardiography*. *J Am Coll Cardiol*, 1989. **13**(3): p. 545-50.
29. Roger, V.L., et al., *Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association*. *Circulation*, 2012. **125**(1): p. e2-e220.
30. Coffey, S., B. Cox, and M.J. Williams, *The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **63**(25 Pt A): p. 2852-61.
31. Iung, B., et al., *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease*. *Eur Heart J*, 2003. **24**(13): p. 1231-43.
32. Carabello, B.A., *Introduction to aortic stenosis*. *Circ Res*, 2013. **113**(2): p. 179-85.
33. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study*. *J Am Coll Cardiol*, 1997. **29**(3): p. 630-4.
34. Otto, C.M., et al., *Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(3): p. 142-7.
35. Lindman, B.R., et al., *Calcific aortic stenosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16006.
36. Rajamannan, N.M., et al., *Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype*. *Circulation*, 2003. **107**(17): p. 2181-4.
37. Coffey, S., B. Cox, and M.J. Williams, *Lack of progress in valvular heart disease in the pre-transcatheter aortic valve replacement era: increasing deaths and minimal change in mortality rate over the past three decades*. *Am Heart J*, 2014. **167**(4): p. 562-567.e2.
38. Pomerance, A., *Ageing changes in human heart valves*. *Br Heart J*, 1967. **29**(2): p. 222-31.
39. Allison, M.A., et al., *Mitral and aortic annular calcification are highly associated with systemic calcified atherosclerosis*. *Circulation*, 2006. **113**(6): p. 861-6.
40. Zhang, P.Y., X. Xu, and X.C. Li, *Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014. **18**(20): p. 3091-6.
41. Helske, S., et al., *Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process*. *Curr Opin Lipidol*, 2007. **18**(5): p. 483-91.
42. Otto, C.M., et al., *Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies*. *Circulation*, 1994. **90**(2): p. 844-53.
43. Yip, C.Y., et al., *Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(6): p. 936-42.
44. Otto, C.M., *Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(13): p. 1395-8.

45. Mohler, E.R., 3rd, et al., *Bone formation and inflammation in cardiac valves*. *Circulation*, 2001. **103**(11): p. 1522-8.
46. Pawade, T., et al., *Why and How to Measure Aortic Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis*. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2019. **12**(9): p. 1835-1848.
47. Dharmarajan, S., et al., *Role of Runx2 in Calcific Aortic Valve Disease in Mouse Models*. *Front Cardiovasc Med*, 2021. **8**: p. 687210.
48. Byon, C.H., et al., *Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(22): p. 15319-27.
49. Osman, L., et al., *Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin*. *Circulation*, 2006. **114**(1 Suppl): p. I547-52.
50. Heistad, D.D., et al., *Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases*. *Circ J*, 2009. **73**(2): p. 201-7.
51. Wirrig, E.E., R.B. Hinton, and K.E. Yutzey, *Differential expression of cartilage and bone-related proteins in pediatric and adult diseased aortic valves*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **50**(3): p. 561-9.
52. Balogh, E., et al., *Heme-Mediated Activation of the Nrf2/HO-1 Axis Attenuates Calcification of Valve Interstitial Cells*. *Biomedicines*, 2021. **9**(4).
53. Otto, C.M., *Valvular aortic stenosis: disease severity and timing of intervention*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **47**(11): p. 2141-51.
54. Dunning, J., et al., *Aortic valve surgery: marked increases in volume and significant decreases in mechanical valve use--an analysis of 41,227 patients over 5 years from the Society for Cardiothoracic Surgery in Great Britain and Ireland National database*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011. **142**(4): p. 776-782.e3.
55. Ross, J., Jr. and E. Braunwald, *Aortic stenosis*. *Circulation*, 1968. **38**(1 Suppl): p. 61-7.
56. Cosmi, J.E., et al., *The risk of the development of aortic stenosis in patients with "benign" aortic valve thickening*. *Arch Intern Med*, 2002. **162**(20): p. 2345-7.
57. Baumgartner, H., et al., *Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2009. **22**(1): p. 1-23; quiz 101-2.
58. Dweck, M.R., et al., *Assessment of valvular calcification and inflammation by positron emission tomography in patients with aortic stenosis*. *Circulation*, 2012. **125**(1): p. 76-86.
59. Otto, C.M. and B. Prendergast, *Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(8): p. 744-56.
60. Badylak, S.F., *Regenerative medicine approach to heart valve replacement*. *Circulation*, 2005. **111**(21): p. 2715-6.
61. Brown, J.M., et al., *Isolated aortic valve replacement in North America comprising 108,687 patients in 10 years: changes in risks, valve types, and outcomes in the Society of Thoracic Surgeons National Database*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. **137**(1): p. 82-90.
62. de Oliveira Sá, M.P.B., et al., *Calcific Aortic Valve Stenosis and Atherosclerotic Calcification*. *Curr Atheroscler Rep*, 2020. **22**(2): p. 2.
63. Peeters, F., et al., *Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment*. *Eur Heart J*, 2018. **39**(28): p. 2618-2624.
64. Dąbrowska, N. and A. Wiczowski, *Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage*. *Adv Clin Exp Med*, 2017. **26**(1): p. 155-166.

65. Förstermann, U., *Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 923-39.
66. Guarnieri, C., C. Muscari, and C.M. Caldarera, *Oxygen radicals and tissue damage in heart hypertrophy*. Adv Myocardiol, 1985. **5**: p. 191-9.
67. Donato, A.J., et al., *Cellular and molecular biology of aging endothelial cells*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **89**(Pt B): p. 122-35.
68. Zhao, W., et al., *Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction: role of NADPH oxidase*. Cardiovasc Pathol, 2009. **18**(3): p. 156-66.
69. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
70. Dizdaroglu, M., et al., *Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(11): p. 1102-15.
71. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
72. Holmström, K.M. and T. Finkel, *Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(6): p. 411-21.
73. Greenberg, H.Z.E., et al., *Role of oxidative stress in calcific aortic valve disease and its therapeutic implications*. Cardiovasc Res, 2021.
74. Sena, L.A. and N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 158-67.
75. Cai, H., *Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(1): p. 26-36.
76. Yermilov, V., et al., *Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro*. Carcinogenesis, 1995. **16**(9): p. 2045-50.
77. Martinet, W., et al., *Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering*. Circ Res, 2001. **88**(7): p. 733-9.
78. Branchetti, E., et al., *Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(2): p. e66-74.
79. Wasmus, C. and J. Dudek, *Metabolic Alterations Caused by Defective Cardiolipin Remodeling in Inherited Cardiomyopathies*. Life (Basel), 2020. **10**(11).
80. Chiang, Y.F., et al., *Protective Effects of Fucoxanthin on Hydrogen Peroxide-Induced Calcification of Heart Valve Interstitial Cells*. Mar Drugs, 2021. **19**(6).
81. Miller, J.D., et al., *Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(10): p. 843-50.
82. Siudut, J., et al., *Impaired Fibrinolysis in Patients with Isolated Aortic Stenosis is Associated with Enhanced Oxidative Stress*. J Clin Med, 2020. **9**(6).
83. Farrar, E.J., G.D. Huntley, and J. Butcher, *Endothelial-derived oxidative stress drives myofibroblastic activation and calcification of the aortic valve*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123257.
84. Liberman, M., et al., *Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 463-70.
85. Olsson, M., J. Thyberg, and J. Nilsson, *Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1218-22.

86. Yamamoto, H., et al., *Valvular and thoracic aortic calcium as a marker of the extent and severity of angiographic coronary artery disease*. *Am Heart J*, 2003. **146**(1): p. 153-9.
87. Watson, K.E., et al., *TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(5): p. 2106-13.
88. Proudfoot, D., et al., *Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(3): p. 379-88.
89. Madamanchi, N.R., Z.S. Hakim, and M.S. Runge, *Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(2): p. 254-67.
90. Collin-Osdoby, P., *Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin*. *Circ Res*, 2004. **95**(11): p. 1046-57.
91. Li, J.M. and A.M. Shah, *Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **287**(5): p. R1014-30.
92. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis*. *Am J Cardiol*, 1995. **75**(6): p. 67b-70b.
93. Poggianti, E., et al., *Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **41**(1): p. 136-41.
94. Anstine, L.J., et al., *Growth and maturation of heart valves leads to changes in endothelial cell distribution, impaired function, decreased metabolism and reduced cell proliferation*. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **100**: p. 72-82.
95. El Accaoui, R.N., et al., *Aortic valve sclerosis in mice deficient in endothelial nitric oxide synthase*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **306**(9): p. H1302-13.
96. Honda, S., et al., *A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(2): p. 270-8.
97. Nomura, J., et al., *Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates experimental atherosclerosis in mice*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 4554.
98. Gielis, J.F., et al., *Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **50**(7): p. 765-76.
99. Henderson, B.W. and T.J. Dougherty, *How does photodynamic therapy work?* *Photochem Photobiol*, 1992. **55**(1): p. 145-57.
100. Cramers, P., et al., *Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(2): p. 283-90.
101. Yoon, I., J.Z. Li, and Y.K. Shim, *Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy*. *Clin Endosc*, 2013. **46**(1): p. 7-23.
102. Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic therapy*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(12): p. 889-905.
103. Peng, Q., et al., *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): p. 2620-6.
104. Andrejevic-Blant, S., et al., *Photodynamic therapy of early squamous cell carcinoma with tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin: optimal drug-light interval*. *Br J Cancer*, 1997. **76**(8): p. 1021-8.
105. Morlet, L., et al., *Correlation between meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) biodistribution and photodynamic effects in mice*. *J Photochem Photobiol B*, 1995. **28**(1): p. 25-32.

106. Hopkinson, H.J., D.I. Vernon, and S.B. Brown, *Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma*. Photochem Photobiol, 1999. **69**(4): p. 482-8.
107. Jones, H.J., D.I. Vernon, and S.B. Brown, *Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics*. Br J Cancer, 2003. **89**(2): p. 398-404.
108. Kübler, A.C., et al., *Experimental evaluation of possible side effects of intra-operative photodynamic therapy on rabbit blood vessels and nerves*. Lasers Surg Med, 2003. **33**(4): p. 247-55.
109. Guerraty, M. and E.R. Mohler Iii, *Models of aortic valve calcification*. J Investig Med, 2007. **55**(6): p. 278-83.
110. Hakuno, D., et al., *Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(1): p. 17-24.
111. Drolet, M.C., M. Arsenault, and J. Couet, *Experimental aortic valve stenosis in rabbits*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(7): p. 1211-7.
112. Kikuchi, S., et al., *Photochemically induced endothelial injury in the mouse as a screening model for inhibitors of vascular intimal thickening*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(7): p. 1069-78.
113. Pérez, P., et al., *Thrombus formation induced by laser in a mouse model*. Exp Ther Med, 2014. **8**(1): p. 64-68.
114. Minol, J.P., et al., *Focal induction of ROS-release to trigger local vascular degeneration*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0179342.
115. Katz, M.G., et al., *Surgical and physiological challenges in the development of left and right heart failure in rat models*. Heart Fail Rev, 2019. **24**(5): p. 759-777.
116. Altman, N.H., et al., *The Laboratory Rat*, ed. H.J. Baker, J.R. Lindsey, and S.H. Weisbroth. Vol. 2. 2006: College of Laboratory Animal Medicine.
117. Lincoln, J., et al., *Sox9 is required for precursor cell expansion and extracellular matrix organization during mouse heart valve development*. Dev Biol, 2007. **305**(1): p. 120-32.
118. Peacock, J.D., et al., *Reduced sox9 function promotes heart valve calcification phenotypes in vivo*. Circ Res, 2010. **106**(4): p. 712-9.
119. Zhou, G., et al., *Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 19004-9.
120. Chakraborty, S., et al., *Shared gene expression profiles in developing heart valves and osteoblast progenitor cells*. Physiol Genomics, 2008. **35**(1): p. 75-85.
121. Tao, G., J.D. Kotick, and J. Lincoln, *Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells*. Curr Top Dev Biol, 2012. **100**: p. 203-32.
122. Da, Q., et al., *Platelet adhesion involves a novel interaction between vimentin and von Willebrand factor under high shear stress*. Blood, 2014. **123**(17): p. 2715-21.
123. Podor, T.J., et al., *Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7529-39.
124. Lee, T.C., et al., *Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2345-8.
125. Price, D.T., J.A. Vita, and J.F. Keaney, Jr., *Redox control of vascular nitric oxide bioavailability*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(4): p. 919-35.
126. Garcia, D., et al., *Analytical modeling of the instantaneous maximal transvalvular pressure gradient in aortic stenosis*. J Biomech, 2006. **39**(16): p. 3036-44.