

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

# **Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Extrazelluläre Matrix der Aortenklappe und assoziierte Zelldifferenzierung**

Dissertation

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

vorgelegt von

Marco Polidori

2022

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

gez.: Marco Polidori  
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Stephan Sixt

## Zusammenfassung: deutsch

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (*DAVD*) hat zunehmenden Einfluss auf unsere Bevölkerung. Wichtige Risikofaktoren für die Entstehung der *DAVD*, wie ein hohes Lebensalter, Hypertonie und Rauchen, sind bereits bekannt. Reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*) sind mit der Pathogenese der *DAVD* assoziiert. Über ihren genauen Mechanismus ist jedoch wenig bekannt. Folgen von oxidativem Stress sind die endotheliale Dysfunktion, die Inflammation, die Proliferation valvulärer Interstitialzellen (*Valvular Interstitial Cells VICs*), das Remodelling der extrazellulären Matrix (*EZM*) und die Lipidperoxidation.

In unserem Versuchsaufbau etablierten wir ein *in vivo* Modell, in welchem lokal, ohne systemische Nebeneffekte oxidativer Stress appliziert und dessen Folgen an der Aortenklappe analysiert werden konnten. Für eine adäquate *ROS*-Induktion verwendeten wir eine photodynamische Reaktion (*PDR*), die durch *in vivo* Kombination eines Rotlicht-Lasers mit dem Photosensibilisator (*PS*) Temoporfin (Foscan®) erreicht werden konnte. Die Laserfaser wurde, via *Arteria carotis communis* vor die Aortenklappe männlicher Ratten platziert. Der *PS* wurde 24 Stunden zuvor präoperativ intravenös appliziert. Die Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe erhielt die *PDR* mit Laser-Bestrahlung und *PS*-Applikation (*ROS*-Gruppe). Die erste Kontrollgruppe erhielt die Bestrahlung, in Abwesenheit des *PS* (*Laser*-Gruppe). In der zweiten Kontrollgruppe, wurde den Tieren eine inaktivierte Laserfaser zur Aortenklappe vorgeschoben. Die Tiere wurden 0, 8, 84 und 168 Tage nach der Bestrahlung euthanasiert.

Um die spezifischen *ROS*-Effekte auf die Aortenklappe zu detektieren, analysierten wir Veränderungen der *EZM*-Komponenten, der *VIC*-Aktivierung, der Lipidperoxidation und der Integrität valvulärer Strukturen. Die explantierten und konservierten Gewebeproben wurden histologisch und immunhistochemisch untersucht. Analysiert wurden Komponenten der *EZM*, die *VIC*-Aktivität und die Lipidperoxidation. Zu quantitativen Bestimmung einer potentiell induzierten Herzinsuffizienz wurde ein *sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* hinsichtlich des N-terminalen Endes des Prohormons des *brain natriuretic peptide (NT-proBNP)* durchgeführt.

Wir fanden Lipidinvasionen in allen drei Gruppen. Obwohl hier keine Unterschiede zwischen der *ROS*- und den Kontrollgruppen gezeigt werden konnten, zeigten sich signifikant höhere Lipid-Signale im Bereich um die Aortenklappe nach 84 und 168 Tagen. Analysen von immunhistochemisch untersuchtem Gewebe zeigten signifikante regionale Mehranreicherungen von *MMP-9* als Marker eines *EZM*-Remodellings in der Bestrahlungs- und den Kontrollgruppen überwiegend in den Aortenklappentaschen. Die weiteren histologischen (Movat Pentachrom) und immunhistochemischen Untersuchungen zeigten jedoch keinen Einfluss von oxidativem Stress auf Komponenten der *EZM* der Aortenklappe oder Aktivierung von *VICs*. Ebenso wenig konnte

eine Assoziation zwischen ROS-Exposition und einer nachfolgenden Herzinsuffizienz erkannt werden.

## Zusammenfassung: englisch

Degenerative aortic valve disease (DAVD) has increasing impact on our population. Age, male gender, hyperlipidemia and smoking are already known as main risk factors for DAVD. Though reactive oxygen species (ROS) are associated with DAVD, little is known about specific mechanisms. Aspects of oxidative stress are endothelial dysfunction, inflammation, remodeling of extracellular matrix (ECM), activation of valvular interstitial cells (VICs) and lipidperoxidation. In order to detect specific effects of ROS on aortic valves, we analyzed alterations of ECM components, VIC activation and lipid invasion. For adequate ROS-induction we generated a photodynamic reaction (PDR), combining a red-light laser and the biosensitizer Temoporfin *in vivo*. Therefore, a laser fiber was operatively placed in front of the aortic valve of male rats. Temoporfin was injected intravenously. Rats were subdivided in three groups: one group exposed to the PDR by laser-irradiation after application of Temoporfin (ROS-group); one control group exposed to laser-irradiation without any application of a biosensitizer (Laser-group) and a sham group, in which a deactivated laser fiber was inserted without any application of a biosensitizer, either. Animals were euthanized 0, 8, 84 and 168 days after irradiation and tissue sample was edited and conserved. Histological and immunohistochemical techniques were used to examine ECM components (collagen, fibrin, elastin, MMP-9), VIC-activation and lipid invasion. For substantiation of N-terminal fragment of the prohormone of brain natriuretic peptide (NT-proBNP), a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay was used. We found increased lipid invasion in all groups. Although we couldn't find differences between irradiation and control group, we detected significantly more lipid signal surrounding the valves, especially after 84 and 168 days. Furthermore, we saw differences in regional dispensations within the aortic valves. Semi-quantitative analyses of immunohistochemical treated tissue revealed significant regional distinction of MMP 9 in aortic valves. We detected higher signals of MMP-9 in aortic valve cusps than in commissure and annulus region in both the irradiation and the control group. Our data show no influences of ROS on ECM components or VIC activation of aortic valves. But we could constitute a higher level of MMP-9 in aortic valve cups compared to the annulus region. This may constitute a generally higher enzyme activity in cusps than in other regions within aortic valves.

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	alpha smooth muscle actin
Abb	Abbildung
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AHA	American Heart Association
ANOVA	analysis of variance
ApoB	Apolipoprotein B
Aquadest	Destilliertes Wasser
aVIC	activated valvular interstitial cell
BMP	bone morphogenic protein
BNP	brain natriuretic peptide
BSA	bovines Serumalbumin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAVD	Degenerative Aortic Valve Disease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	fibroblast growth factor
GAG	Glykosaminoglykan
HDL	high density lipoprotein
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
Kat.Nr.	Katalognummer
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein a
LPS	Lipopolysaccharide
mTHPC	<i>meta</i> -tetra(hydroxyphenyl)chlorine
MMP	Matrix Metalloprotease
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
NOX	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Oxidase
NT-proBNP	N-terminales Ende des Prohormons des brain natriuretic peptide

OPN	Osteopontin
oVIC	osteoblastic valvular interstitial cell
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
PBS	phosphatbuffered saline
PDR	photodynamische Reaktion
PS	Photosensibilisator
PTH	Parathyroidhormon
qVIC	quiescent valvular interstitial cell
ROI	region of interest
ROS	reactive oxygen species
RunX	runt-related transcription factor
SM	smooth muscle protein
SMC	smooth muscle cell
SOD	Superoxid Dismutase
Sox	SRY BOX Transcription factor
TAVI	transcatheter aortic valve implantation
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloprotease
TiP	pituitary-specific positive transcription factor
TLR	tolle like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TnT	Troponin T
tPA	tissue plasminogen activator
uPA	trokinase type plasminogen activator
UV	ultraviolet
VEC	valvular endothelial cell
VIC	valvular interstitial cell
VLDL	very low density lipoprotein
VDR	Vitamin D Rezeptor
Wnt	wingless-integrated relation site
XO	Xanthin Oxidase
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Die Degenerative Aortenklappenerkrankung .....	1
1.1.1	Epidemiologie der DAVD .....	1
1.1.2	Aufbau und Funktion der Aortenklappe .....	2
1.1.3	Pathogenese der DAVD .....	4
1.1.4	Klinik und Therapie der DAVD .....	6
1.2	Die Extrazelluläre Matrix.....	7
1.2.1	Aufbau und Funktion der Extrazellulären Matrix.....	8
1.2.2	Matrix Metalloproteasen .....	9
1.3	Oxidativer Stress .....	10
1.3.1	Reaktive Sauerstoffspezies.....	10
1.3.2	Prinzip der Photodynamischen Reaktion .....	11
1.3.3	Temoporfin.....	12
1.4	Funktionelle Aspekte der DAVD.....	13
1.4.1	Oxidativer Stress – Entkoppelung der NO Synthase .....	13
1.4.2	Die Lipidperoxidation im Rahmen valvulärer Degeneration.....	13
1.4.3	Remodelling der Extrazellulären Matrix.....	15
1.4.4	Valvulärer Interstitialzellen .....	16
1.4.4.1	Funktion der valvulären Interstitialzellen.....	16
1.4.4.2	Aktivierung der valvulären Interstitialzellen .....	16
1.4.4.3	Relevanz des $\alpha$ -smooth muscle actin.....	17
1.5	Die Bedeutung von NT-proBNP im degenerativen kardialen Prozess .....	18
1.6	Ziele der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Modell .....	20
2.2	Ratten.....	21
2.3	Anwendung der Photodynamischen Reaktion.....	21
2.4	Explantation und Kryokonservierung.....	22
2.5	Histologische Analysen.....	23
2.5.1	Movat Pentachrom.....	23
2.5.2	Oil Red O.....	26
2.5.4	$\alpha$ -SMA / Vimentin.....	28
2.5.5	Matrix Metalloprotease 9 .....	31
2.7	Sandwich EILSA.....	33

2.7.1	NT-proBNP EILSA .....	33
2.8	Evaluation und Statistik.....	35
2.8.1	Movat Pentachrom.....	35
2.8.2	Oil Red O.....	35
2.8.3	$\alpha$ -SMA/Vimentin .....	35
2.8.4	MMP 9 .....	38
3	Ergebnisse .....	40
3.1	Auswirkungen auf Bindegewebe .....	40
3.2	Nachweis von Lipidperoxidation.....	41
3.3	Auswirkungen auf VICs und mesenchymale Zellen .....	44
3.3.1	Aktivierung von $\alpha$ -SMA .....	44
3.3.2	$\alpha$ -SMA.....	49
3.4	MMP 9.....	50
3.4.1	NT-proBNP-ELISA.....	55
4	Diskussion.....	56
4.1	Untersuchung der <i>DAVD</i> .....	56
4.2	Etablierung eines Tiermodells – Induktion der <i>DAVD</i> .....	56
4.2.1	Mensch und Ratte – Beschränkung der Anatomie.....	56
4.2.2	Frühere Modelle.....	58
4.2.2.1	Die lipidgestützte <i>DAVD</i> -Induktion – Diät und Knockout .....	58
4.2.2.1.1	Die Rolle von Vitamin D in der fettreichen Ernährung.....	59
4.2.2.2	Die mechanische <i>DAVD</i> -Induktion.....	61
4.2.2.3	Induktion von oxidativem Stress .....	62
4.3	Die Lipidinvasion .....	64
4.3.1	Histologie und Funktion – die Detektion des <i>oxLDL</i> .....	65
4.4	<i>NT-proBNP</i> – ein Biomarker der <i>DAVD</i> ?.....	66
4.5	Quantifizierung aktivierter VICs .....	68
4.6	VICs und ROS – Das Remodelling der EZM.....	69
4.6.1	Die elastische Integrität der Aortenklappe .....	69
4.6.2	Der Einfluss des Endothels auf die VIC-Aktivierung .....	70
4.6.3	Die enzymatische Aktivität von oxidativem Stress.....	71
4.7	Die lokale Distribution der MMP's in der Aortenklappe.....	72
5	Schlussfolgerungen .....	75
6	Literaturverzeichnis.....	76

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Degenerative Aortenklappenerkrankung

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (*degenerative aortic valve disease, DAVD*) geht mit morphologischen und funktionellen Veränderungen der Aortenklappe einher [1]. In der Aortenklappe führen strukturelle Dysfunktionen und Inflamationsprozesse mit resultierender Verdickung, Versteifung und Kalzifizierung, zu einer veränderten valvulären Struktur und können die Entstehung einer Aortenklappenstenose begünstigen [1-3].

Die Aortenklappenstenose stellt die klinische Manifestation der *DAVD* dar und ist das Endprodukt degenerativer Umbauprozesse mit hämodynamischer Auswirkung sowohl auf die Aortenklappe, als auch auf die kardiale Integrität [4].

Risikofaktoren der *DAVD* entsprechen teilweise denen der Atherosklerose. Ein hohes Lebensalter, das männliche Geschlecht, die arterielle Hypertonie, der Nikotinabusus und die Hyperlipidämie [3, 5], gelten, wie auch der oxidativer Stress als relevante Risikofaktoren [6-10].

Makroskopisch wird die *DAVD* durch drei morphologische Besonderheiten definiert: eine vermehrte Klappendicke, Steifheit und Kalzifizierung [3]. Mikroskopisch lassen sich bereits in frühen Stadien der Erkrankung Läsionen in Form von Lipideinlagerungen, Protein- und Kalziumakkumulationen nachweisen [11]. Im Zusammenspiel mit chronischer Inflammation wird die Pathogenese der *DAVD* als aktiver Erkrankungsprozess wahrgenommen [11].

### 1.1.1 Epidemiologie der DAVD

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die führende Todesursache der westlichen Welt [12]. Die Aortenklappenstenose, als häufigste Klappenerkrankung mit therapeutischer Konsequenz, nimmt in diesem Spektrum einen wichtigen gesundheitsökonomischen Stellenwert ein [12-15]. Bei einer derzeitigen Prävalenz von 4,3 % und steigenden Inzidenzen, prognostiziert die *American Heart Association (AHA)* eine Verdopplung der Krankheitsfälle in Europa und den USA bis 2050 [12]. Unter diesem Gesichtspunkt werden Früherkennung und Prävention der *DAVD* immer bedeutungsvoller. Gleichzeitig steigt das wissenschaftliche Interesse, die genauen pathogenetischen Mechanismen der *DAVD* weiter zu erforschen.

## 1.1.2 Aufbau und Funktion der Aortenklappe

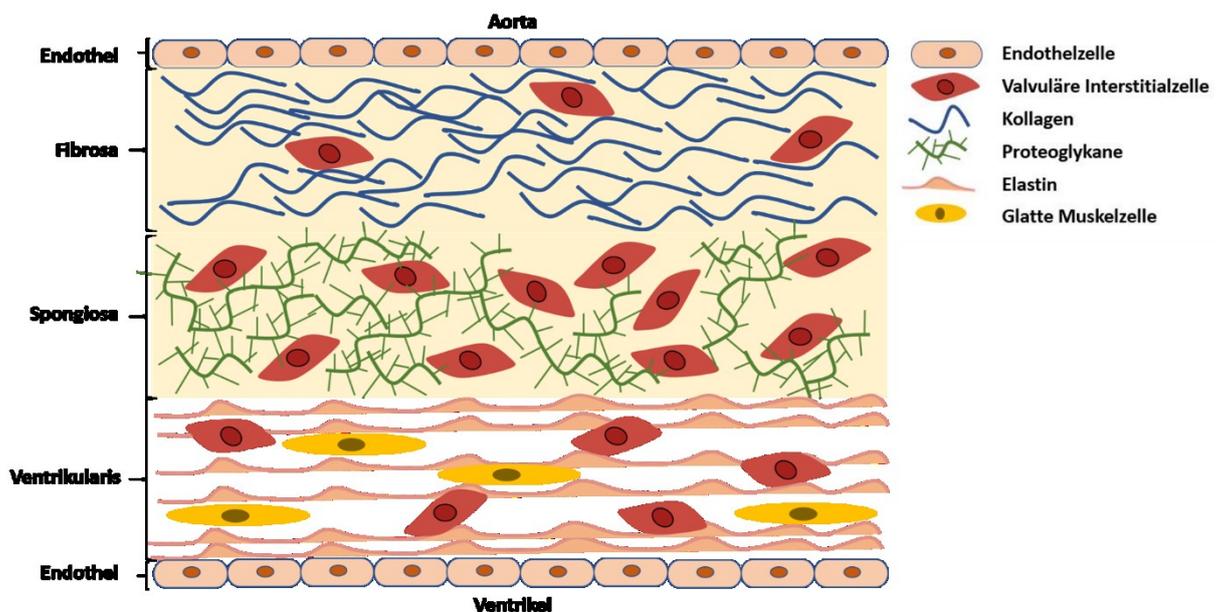
Anatomisch liegt die Aortenklappe zentral an der Herzbasis und tangential zu den anderen Herzklappen [2]. Sie besteht aus drei wesentlichen Komponenten: dem Annulus, den Taschen und den Kommissuren [2, 16]. Der Annulus ist Teil des fibrösen Herzskeletts, in dem die Taschen eingebettet sind [2, 16]. Die drei Klappentaschen bestehen aus fibrösem Gewebe und sind halbmondförmig im Herzskelett eingespannt [2, 16]. Im Zentrum jeder Aortenklappentasche befindet sich eine verdickte Struktur, das sogenannte Arantius-Knötchen [2, 16]. Die Kommissuren entsprechen dem Bereich der drei Taschenseiten, in dem die Tasche in den Annulus übergeht [2, 16]. Im Sinne einer fakultativen Barriere verhindert die Aortenklappe einen diastolischen Rückfluss in den linken Ventrikel. Während der Öffnungsphase ziehen sich die Taschen zur Kommissur und der aortalen Wand an der Aortenwurzel hin zurück [2, 16]. Hinter den geöffneten Taschen befindet sich der Sinus Valsalve, eine Ausbuchtung der klappennahen Aortenwand. Verwirbelungen des systolisch ausgeworfenen Blutflusses erleichtern dort den passiven Schluss der Aortenklappentaschen [2, 16].

Die funktionelle Integrität der Aortenklappentaschen wird durch ihren histologischen Aufbau gewahrt. Sie besteht aus drei Schichten: der Lamina Fibrosa, der Lamina Spongiosa und der Lamina Ventrikularis [17]. Die Lamina Fibrosa befindet sich an der aortalen Seite der Aortenklappe [17]. Sie besteht überwiegend aus Kollagenfasern, deren zirkumferente Anordnung Zugfestigkeit bietet [17]. Die Lamina Ventrikularis auf der Klappeninnenseite ist reich an elastischen Fasern [17]. Die dadurch erreichte Dehnbarkeit der Klappe erlaubt Anpassungen an die kardiale Vorlast [17]. Zwischen Lamina Fibrosa und Ventrikularis befindet sich die Lamina Spongiosa [17]. Darin enthaltene Glykosaminoglykane und Proteoglykane haben eine funktionelle Bedeutung für die Flexibilität der Aortenklappe und die Dämpfung während des Klappenschlusses [17]. Um den unidirektionalen Blutfluss zwischen dem linken Ventrikel und Körperkreislauf zu gewährleisten, verfügen die Schichten der Aortenklappentaschen über unterschiedliche Eigenschaften. Diese erlauben eine Adaption der Aortenklappe an den systolischen Scherstress, die diastolische Komprimierung, sowie Änderungen der Zugspannung und der Flexion [17]. Die einzelnen Schichten unterliegen folglich einer Dynamik, die sich dem Herzzyklus anpasst [18, 19].

In der Aortenklappe gibt es drei wesentliche Zellarten: Valvuläre Interstitialzellen (*valvular interstitial cells, VICs*), valvuläre Endothelzellen (*valvular endothelial cells, VECs*) und glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells, SMC's*). *VICs* sind in allen drei Schichten enthalten, hauptsächlich aber in der Spongiosa zu finden [20]. Sie induzieren das Remodelling der extrazellulären Matrix [21]. *VECs* befinden sich an der aortalen und ventrikulären Oberfläche der Klappe. Sie verhindern die lokale Thrombenbildung, transportieren Nährstoffe und transduzieren

biomechanische Signale [21, 22]. *SMC's* befinden sich ausschließlich in der Ventrikularis [23, 24].

Physiologisch ernährt sich die Aortenklappe hauptsächlich über Diffusion, da sie nur über wenige versorgende Gefäße verfügt. Eine vermehrte Angiogenese wird als pathologisch betrachtet [25]. Die Innervation der Aortenklappe erfolgt über den Plexus ventricularis [26]. Mechanische Reize werden als Teil physiologischer Vorgänge in biochemische Signale transduziert und auf Zellebene vermittelt. Rezeptoren erkennen vasoaktive Stoffe wie Endothelin-1, Noradrenalin, Adrenalin und Histamin und können Kontraktionen der Aortenklappen induzieren. [27]. Erhalt der Homöostase und Anpassung an mechanische Veränderung führen zu Bildung, Umbau und Reparatur verschiedener Matrixkomponenten, mit dem Ziel, die Integrität und Funktion der Aortenklappe zu erhalten. Strukturelle Veränderungen in der Umgebung der Aortenklappe resultieren in erhöhten Adaptionsprozessen, die eine pathologische Klappenstruktur bedingen können [21].



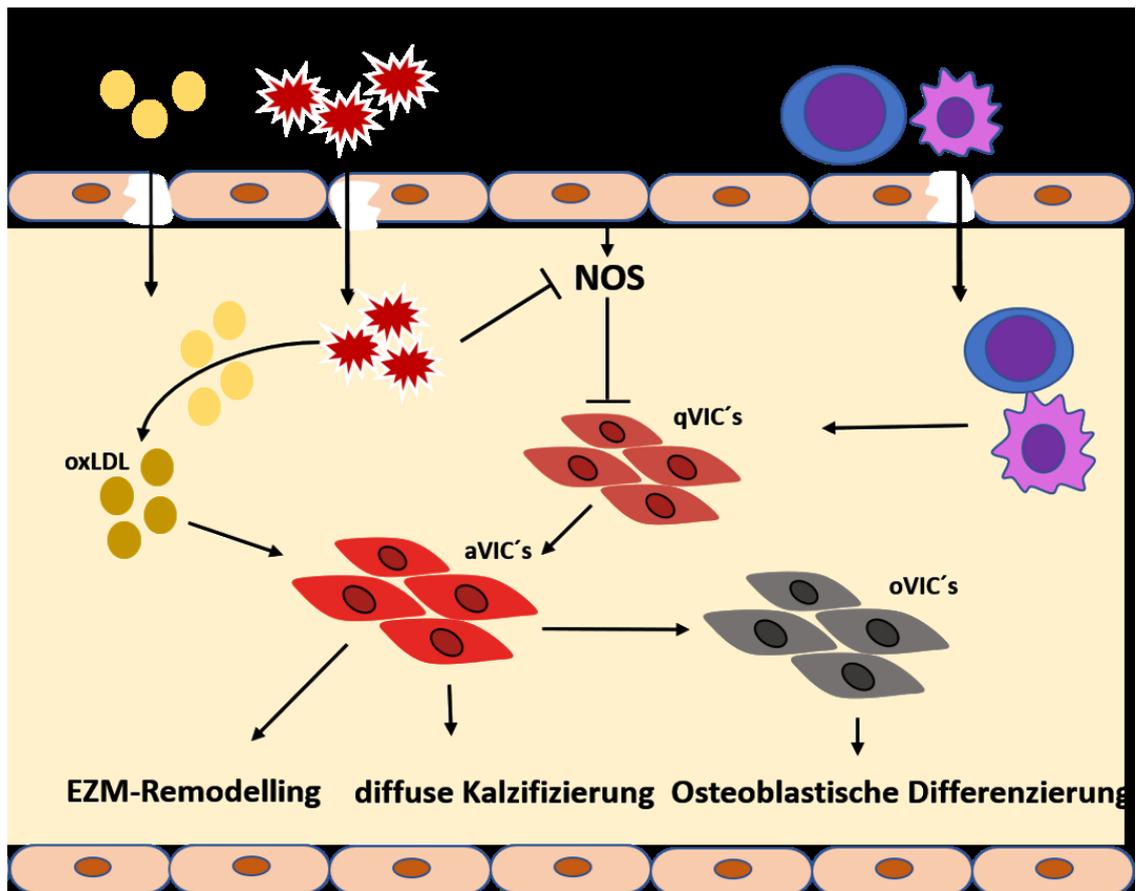
**Abb. 1 – Mikroskopischer Aufbau der Aortenklappe**

Darstellung des dreischichtigen Aufbaus der Aortenklappe mit Lamina Fibrosa, Lamina Spongiosa und Lamina Ventrikularis. Die aortal gelegene Lamina Fibrosa besteht zu überwiegenden Teilen aus Kollagenfasern. Die Lamina Spongiosa bildet die mittlere Schicht und besteht aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (in der Abbildung nicht dargestellt). Der überwiegende Teil der VICs ist in der Lamina Spongiosa angesiedelt. Die Lamina Ventrikularis ist dem linken Ventrikel des Herzens zugewandt. Sie enthält vor allem elastische Fasern. Die Schichten der Aortenklappe sind aortal und ventrikulär durch eine endotheliale Schicht bedeckt. Die Abbildung wurde angelehnt an [28] erstellt.

### 1.1.3 Pathogenese der *DAVD*

Pathologische Prozesse der Aortenklappe führen zu Verdickungen, Versteifungen und Kalzifizierungen der Aortenklappentaschen [3]. Die Aortenklappenstenose, mit morphologischen Charakteristika, wie einer verminderten Klappenöffnungsfläche, ist meist die Konsequenz dieser Veränderungen [21, 29]. Die Kalzifizierung betrifft vornehmlich die Stellen, an denen der mechanisch einwirkende Scherstress und die Flexion der Klappentaschen am höchsten sind [30]. Es wird angenommen, dass die frühpathologischen Prozesse der Aortenklappendegeneration denen der Atherosklerose ähneln [11]. Die endotheliale Dysfunktion wird als maßgeblicher Initiator der *DAVD* vermutet [11]. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und abnormale Strömungsverhältnisse des Blutflusses erhöhen die Permeabilität des Endothels und verändern das biochemische Zellverhalten [31]. Folge der endothelialen Dysfunktion ist unter anderem die Infiltration von Zellen des Immunsystems und Lipiden. Letztere werden in einem anschließenden Schritt oxidiert [32, 33]. Der Inflamationsprozess begünstigt die Aktivierung von *VICs*, die mit der extrazellulären Matrix (EZM) kommunizieren [34-36]. Sie sind in der Lage Matrixstrukturen zu sezernieren und Umbauprozesse zu induzieren [35, 37-40]. In nicht pathologisch veränderten Herzklappen liegen die meisten *VICs* in einer nicht aktiven Form vor, deren Hauptaufgabe der strukturelle und funktionelle Erhalt der Herzklappe ist [36, 39, 41, 42]. In pathologisch veränderten Klappen reagieren die *VICs* mit vermehrter Aktivierung. Sie ändern ihre Morphologie von einem Fibroblasten- zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, der vermehrt *alpha-smooth muscle actin* (*α-SMA*) exprimiert [35-37]. Qualitative und quantitative Änderungen der EZM, die zur Versteifung der Klappentaschen und damit zur Obstruktion des linksventrikulären Ausflusses führen, sind die wesentlichen Kennzeichen der *DAVD*, an dessen Ende die Kalzifizierung der Aortenklappe steht [43].

Pathophysiologisch werden zwei Mechanismen unterschieden, die eine Kalzifizierung der Klappen begünstigen: die dystrophe Kalzifizierung und die osteochondrogene Differenzierung von *VICs* mit osteogener Neogenese [28, 44]. Bei der dystrophen Kalzifizierung kommt es zu einer passiven Ablagerung kristalliner Substanzen. Im Blutsystem vorkommendes Kalzium und Phosphat kann durch endotheliale Defekte und pathologisch veränderte Strukturen der EZM in die Aortenklappe eindringen und Hydroxylapatit bilden [28, 45]. Hinzukommende Ablagerungen von Cholesterol-Kristallen und apoptotischen Zellen können diesen Vorgang unterstützen [28]. Die osteogene Differenzierung von *VICs* kann als eigenständiger Prozess innerhalb der *DAVD* auftreten oder sich an die Kalzifizierung anschließen [28, 44, 46]. Ruhende *VICs* ändern ihren Aktivitätszustand mit der Fähigkeit osteogene und chondrogene Prozesse zu induzieren. Proteine der Knochenbildung, wie Osteopontin, Alkalische Phosphatase und *bone morphogenic protein 2* und *4* (*BMP-2* und *BMP-4*) begünstigen die osteochondrogene *VIC*-Differenzierung und die Bildung ossärer Strukturen an den Aortenklappen [32, 36, 44].



**Abb. 2 - Pathogenese der DAVID**

Störungen der endothelialen Integrität bedingen die vermehrte Invasion von *Low-density-Lipoprotein* (*LDL*) und Zellen des Immunsystems (z.B. T-Zellen, Makrophagen). Der im Rahmen der Inflammation freigesetzte oxidative Stress entkoppelt die Stickstoffmonoxid Synthase (*nitric oxygen synthase*, *NO* Synthase, *NOS*) und führt zur Lipidperoxidation. Oxidiertes *LDL* (*oxLDL*) und eingewanderte Leukozyten sezernieren proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, die zu einer Aktivierung der ruhenden valvulären Interstitialzellen (*qVICs*) führen. Aktivierte *VICs* (*aVICs*) induzieren das Remodelling der Extrazellulären Matrix (*EZM*) und die diffuse Kalzifizierung. Sie können im weiteren Krankheitsverlauf zu osteoblastischen *VICs* (*oVICs*) transdifferenzieren und die osteochondrogene Differenzierung der Aortenklappe fördern. Die Abbildung wurde angelehnt an [44, 47] erstellt.

### 1.1.4 Klinik und Therapie der *DAVD*

Die frühen Kennzeichen der *DAVD* – endotheliale Dysfunktion, Lipidinvasion und Inflammation – führen über Kalzifizierungen, zu Versteifungen und Einengungen der Aortenklappe [13]. Die klinische Manifestation der *DAVD*, die Aortenklappenstenose, zeichnet sich durch verringerten ventrikulo-aortalen Ausstrom mit Erhöhung des linksventrikulären Blutvolumens aus [13]. Die Belastung des linken Ventrikels führt mit der Zeit zu einer Hypertrophie und im weiteren Verlauf zu einer Dilatation des linksventrikulären Myokards [13]. Typische Symptome der Aortenklappenstenose, wie die Angina pectoris, die Synkope und das Herzversagen, treten oft erst in fortgeschrittenen Stadien auf [13]. Der lange, klinisch inapparente Krankheitsverlauf der *DAVD*, erschwert ein frühzeitiges therapeutisches Eingreifen [13]. Interventionell oder operativ gestützte Behandlungsform, finden daher oft erst im klinisch manifesten Krankheitsstadium der Aortenklappenstenose statt, in dem die Überlebenschancen der Patienten bereits deutlich reduziert sind [48, 49].

Beim operativen Aortenklappenersatzverfahren wird die nicht mehr adäquat funktionierende Aortenklappe durch eine biologische oder eine mechanische Klappe ersetzt. Unterschiede zwischen den Klappen bestehen vor allem in der Haltbarkeit und der benötigten Medikation [50]. Mechanische Prothesen zeichnen sich durch ihre lange Haltbarkeit aus, sie bedürfen jedoch aufgrund ihrer Thrombogenität einer lebenslange Antikoagulation [50]. Dies erfordert eine adäquate Therapieadhärenz der Patienten, um thromboembolische Ereignisse, wie sie durch mangelnde Medikamenteneinnahme entstehen, zu vermeiden [50]. Indes, erhöht sich durch die kontinuierliche Antikoagulation das Risiko relevanter Blutungsereignisse und damit die Morbidität und Mortalität [50]. Biologische Herzklappen sind bovinen oder porkinen Ursprungs und benötigen nur eine temporäre Antikoagulationsbehandlung [50]. Die Allostase des biologischen Transplantats verringert allerdings seine Haltbarkeit. Die mittlere Überlebensdauer biologischer Klappenprothesen wird mit 15 Jahren angegeben und kann mitunter weitere Operationen erforderlich machen [50].

Junge Patienten mit klinisch manifester Erkrankung der Aortenklappen, sind aufgrund ihrer hohen Lebenserwartung nicht primär für das Einsetzen einer Klappenprothese geeignet [51]. Eine Alternative zum Klappenersatz stellt die Ross-Operation dar [51]. Diese beschreibt den Ersatz der Aortenklappen durch die patienteneigene Pulmonalklappe, im Sinne eines autologen Transplantats [51]. Anstelle der früheren Pulmonalklappe wird ein Homograft implantiert, der aufgrund der geringere hämodynamische Krafteinwirkungen im rechten Herzen, eine lange Haltbarkeit aufweist [51].

Eine Möglichkeit der interventionellen Therapie ist die kathetergestützte Aortenklappenimplantation (*transcatheter aortic valve implantation, TAVI*) [49]. Das

minimalinvasive Einbringen einer Bioprothese eignet sich besonders für schwer erkrankte und multimorbide Patienten, deren klinischer Zustand, das Risiko, eines großen operativen Eingriffes, deutlich erhöht [49].

## 1.2 Die Extrazelluläre Matrix

Die EZM ist die nicht-zelluläre Komponente, die sich zwischen Geweben und Organen befindet [52]. Als dreidimensionales, makromolekulares Netzwerk aus Kollagen, Proteoglykanen, Elastin, Fibronectin, Laminin und anderen Glykoproteinen [53] besitzt die EZM neben einer physikalischen Stützfunktion auch eine wesentliche Bedeutung für biochemische und biomechanische Prozesse [52, 54]. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die EZM lediglich als Aufhängeapparat von Strukturen dient [55]. Ihre weitere Bedeutung für zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Morphogenese wurde erst im Verlauf erkannt [56-58]. Zellkomponenten der EZM interagieren mit epithelialen Zellen, um als Liganden für Zellrezeptoren Prozesse der Adhäsion, Migration, Proliferation, Apoptose, und Differenzierung zu regulieren [59]. Die Kommunikation zwischen Zellen und Komponenten der EZM wird maßgeblich durch Integrine bestimmt [60-62]. Integrine sind eine Gruppe nicht-kovalent gebundener Heterodimere mit einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die als Transmembranproteine lange extrazelluläre und kurze intrazelluläre Domänen aufweisen [61-63]. Ihre bidirektionale Verbindung ermöglicht eine Kommunikation des Zellinneren mit extrazellulären Komponenten [61, 62, 64]. Der EZM-Abbau findet durch spezifische Proteasen wie Serin- (*tissue-type-plasminogen-activator*, *tPA*, *urokinase-type-plasminogen-activator*, *uPA*) und Matrix-Metalloproteasen (MMP's) statt [62, 65]. Dysregulierte Ab- und Umbauprozesse mit einhergehendem Differenzierungsverlust von Zellen bedingen pathologische Veränderungen wie zum Beispiel die Fibrose, die Osteoarthritis und die Tumorentstehung [59, 66]. Komponenten der EZM können von allen Zellen sezerniert werden. Ihre Zusammensetzung richtet sich nach dem Ursprung ihres Gewebes, und erklärt ihre unterschiedliche Spezifität [62, 67].

Das Remodelling der EZM ist sowohl Teil physiologischer als auch pathologischer Prozesse [53]. Matrixkomponenten werden hauptsächlich durch Fibroblasten sezerniert, wobei alle Zellen einen Einfluss auf die EZM-Bildung zu tragen scheinen [54]. So führt eine Dysregulation physiologischer Auf- und Abbauprozesse zu Pathologien [59].

### 1.2.1 Aufbau und Funktion der Extrazellulären Matrix

Die EZM besteht aus Glykoproteinen (Laminine, Fibronectin), Proteoglykanen und Faserproteinen (Kollagene, Elastin, Fibrillin) [62].

Glykosaminoglykane (GAG's) sind Polysaccharide, die aus repetitiven Disaccharideinheiten bestehen [68]. Sie können als freie Ketten oder als Teil von Proteoglykanen vorliegen [68]. Ihre Monosacchariduntereinheiten können sulfatiert vorliegen und bilden mit ihrer stark negativen Ladung biomechanische Gewebeeigenschaften [62, 68].

Laminine sind Heterodimere, die zur Familie der Glykoproteine gehören. Sie sind überwiegend in Basalmembranen lokalisiert, denen sie als nicht-kollagene Hauptkomponente organspezifische Funktionen verleihen [62, 69].

Fibronectin wird zu den Glykoproteinen gerechnet und ist ein Heterodimer aus zwei Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Fibronectin interagiert mit EZM-Proteinen, Zellrezeptoren, Fibronectin und anderen Glykosaminoglykanen. Es ist damit essentiell für die zellulären Adhäsions- und Proliferationsprozesse der EZM [62, 70, 71].

Proteoglykane gehören zu den wichtigsten strukturellen und funktionellen Makromolekülen im Gewebe [53]. Sie finden sich in intrazellulären Kompartimenten, an Zelloberflächen und innerhalb der EZM [53, 62]. Ihre negativ geladenen GAG-Ketten interagieren mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren [68]. In membrangebundener Form interagieren sie mit Wachstumsfaktoren wie *fibroblast growth factor (FGF)* und *transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )* [62, 72].

Kollagene sind die am häufigsten vorkommenden Proteine in Säugetieren [73]. Sie sind funktionell bedeutsam für den Gerüstbau des Gewebes, die Zelladhäsion, die Zellmigration, die Angiogenese und die Gewebereparatur [74]. Kollagene sind strukturelle Moleküle der EZM mit einer *triple-helix*-Domäne [75], die in der Lage sind zu polymerisieren [60]. Sie gelten als elastische Proteine, die über intra- und intermolekulares *Cross-linking* die strukturellen Besonderheiten einzelner Gewebearten bestimmen [62, 73, 74]. Interaktion von Kollagen mit Proteoglykanen und anderen Matrix-Molekülen organisieren die EZM und geben jedem Gewebe eine bestimmte mechanische Eigenschaft [62, 73, 75]. Sowohl unter physiologischen, als auch unter pathologischen Bedingungen unterliegen Kollagene ständigen Auf- und Abbauprozessen [76]. Der Kollagenabbau wird durch proteolytische Enzyme wie Serinproteasen (z.B. Plasmin), Zysteinproteasen (Kathepsin B und L) und Matrix Metalloprotease (MMP's, z.B. Kollagenase, Gelatinase) bestimmt [76]. Unter physiologischen Bedingungen, besteht ein Gleichgewicht zwischen Kollagenaufbau und -abbau, wobei der intrazelluläre Abbau hierbei eine tragende Rolle einnimmt [76]. Der extrazelluläre Abbau wird relevanter, wenn große Mengen Kollagen in kurzer

Zeit abgebaut werden müssen, wie es zum Beispiel bei Inflammationsprozessen der Fall ist [76]. Kollagen-Typ-III scheint vor allem im Rahmen schnell ablaufender Kollagensynthese anzufallen [77]. Im Herzgewebe ist Kollagen für die mechanischen Zugkräfte in den Klappen wichtig. Die am häufigsten vertretenen Kollagene sind die Subtypen I (74%), II (24%) und zu einem geringeren Teil der Subtyp V [18].

Elastin ist ein unlösliches Polymer, in dem die monomeren Strukturen des löslichen Vorläufers Tropoelastin über *Cross-linking* miteinander verbunden sind [62, 78]. Die hydrophoben Bereiche weisen hohe Anteile an  $\beta$ -Faltblattstrukturen auf, die durch ihre Konformationsvielfalt die Flexibilität von Elastin erklären [62, 78].

Fibrillin ist ein Glykoprotein, das elastische Fasern ausbildet. Seine Monomere polymerisieren zu Mikrofibrillen und lagern Tropoelastin-Moleküle ein. [62, 79, 80]. Die Fibrillin-reichen Mikrofibrillen sind vor allem in elastischem Bindegewebe zu finden. Die elastischen Fasern ermöglichen eine Dehnbarkeit der Aortenklappe [18].

## 1.2.2 Matrix Metalloproteasen

Matrix Metalloproteasen (MMP's) sind eine Familie strukturell verwandter, Zink-abhängiger Endopeptidasen [62, 81, 82]. MMP's sind in der Lage, zahlreiche extrazelluläre Substrate und Proteine abzubauen [81], weshalb sie als Hauptabbauenzyme der EZM gelten [59, 62]. Unter physiologischen Bedingungen ist ihre Aktivität niedrig. Sie steigt jedoch im Rahmen von Reparatur- oder Remodelling-Prozessen, oder als Folge von pathologisch verändertem oder inflammatorischem Gewebe an [59]. Bisher wurden 23 menschliche MMP's identifiziert, von denen die meisten als Zymogene sezerniert und anschließend im extrazellulären Raum aktiviert werden [59, 62]. Die Proform enthält eine N-terminale Domäne, die das katalytische Zentrum mit der Zink-abhängige Domäne hemmt [59, 65, 81]. Die Aktivierung erfolgt primär durch proteolytische Abspaltung des Cys-enthaltenden Propeptids im Extrazellulärraum. Sie kann aber auch durch Oxidation der Thiol-Gruppe, zum Beispiel durch reaktive Sauerstoffspezies stattfinden [59, 62]. Die enzymatische Spezifität der einzelnen MMP's wird durch das katalytische Zentrum bestimmt [65, 81]. Die Expression der MMP's wird durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen kontrolliert. Ebenfalls spielen die Aktivierung der Zymogene als Vorläuferstufen und die Hemmung durch endogene Inhibitoren, wie die *tissue inhibitors of Metalloproteases (TIMPs)* eine Rolle [65, 81, 83]. Nach aktuellem Forschungsstand werden MMP's als die wesentlichen Einflussfaktoren im Remodelling der EZM beschrieben [43].

## 1.3 Oxidativer Stress

Als oxidativen Stress bezeichnet man das Ungleichgewicht zwischen im Körper herrschenden Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der oxidativen Agenzien, das mit der Möglichkeit einer Gewebeschädigung einhergeht [84]. Als Oxidantien werden Stoffe bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen, andere Verbindungen zu oxidieren – sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*) [84]. *ROS* sind ein normales Produkt des aeroben Metabolismus, können im Körper aber auch durch externe Einflüsse, durch Röntgenstrahlen oder UV-Licht entstehen [84]. Antioxidantien sind Verbindungen, die die Oxidation von Substraten verlangsamen oder verhindern [84]. Zu dieser Gruppe werden enzymatische und nicht-enzymatische Verbindungen gezählt [84]. Im Körper gibt es mehrere enzymatische Systeme, die einer Anhäufung von oxidativem Stress entgegenstehen, wie die Glutathion-Peroxidase, die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Katalase [84-86]. Nicht-enzymatische Antioxidantien wie Ascorbat (Vitamin C) und  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) können Radikale abfangen und die Oxidationskette unterbrechen [86].

### 1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

*ROS* sind ein Überbegriff für Sauerstoffradikale und nicht-radikale Sauerstoffverbindungen mit der Fähigkeit Redoxreaktionen eingehen zu können [87, 88]. Als freie Radikale bezeichnet man Agenzien, mit mindestens einem ungepaarten Elektron. Superoxid- ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hydroxyl- ( $OH^{\cdot}$ ), Peroxyl- ( $RO_2^{\cdot}$ ) und Hydroperoxyl-Radikale ( $HO_2^{\cdot}$ ) werden zu dieser Gruppe gezählt [87]. Freie Radikale zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, mit ihrem ungepaarten Elektron leicht an andere Moleküle zu binden [88]. Hierbei können Kettenreaktionen entstehen, wobei eine Vielzahl ursprünglich stabiler Moleküle in einen reaktiven Status versetzt werden [88]. Neben den Sauerstoffradikalen besitzen auch nicht-radikale Sauerstoffspezies die Fähigkeit der Oxidation [88]. Ihre Bindung zu freien Radikalen wie  $O_2^{\cdot-}$  kann, katalysiert durch die Beteiligung eisenhaltiger Proteine wie Transferrin, Ferritin oder Lactoferrin, Sauerstoffradikale freisetzen [89-91]. Die Fenton- und Harber-Weiss-Reaktion bezeichnet die Bildung hochreaktiver Hydroxyl-Radikale ( $OH^{\cdot}$ ) durch Interaktion von Superoxid-Radikalen mit dem nicht-radikalen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), unter der Anwesenheit von Transferrin oder Lactoferrin [90, 91]. In der Fenton-Reaktion reagiert zweiwertiges Eisen ( $Fe^{2+}$ ) mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) unter anderem zu dreiwertigem Eisen ( $Fe^{3+}$ ) und dem sehr reaktiven Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\cdot}$ ) [92]. In der Harber-Weiss-Reaktion reagieren Superoxide mit  $Fe^{3+}$  zu Sauerstoff und  $Fe^{2+}$  [92]. Diese  $Fe^{2+}$  kann nun als erneut mit Wasserstoffperoxid reagieren und ein redoxartigen Kreislauf entsteht [92].

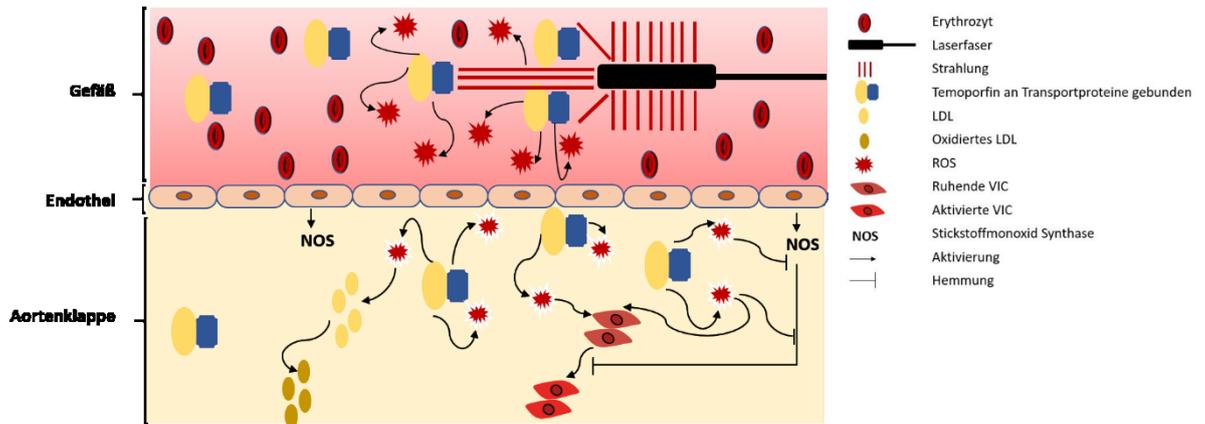
*ROS* werden kontinuierlich produziert; sowohl im normalen Metabolismus, als auch durch externe Stimuli [88, 90, 93]. Physiologische Ursachen endogener *ROS*-Produktion sind Reaktionen, die durch Enzyme wie die Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat- (NADPH)

Oxidase oder die Xanthin Oxidase (XO) katalysiert werden [87, 88]. In Leukozyten wird die membranständige NADPH Oxidase durch Lipopolysaccharide (LPS) oder proinflammatorische Zytokine wie *TNF- $\alpha$*  und Interleukin-6 aktiviert. Enzymgekoppelt wird dabei  $O_2$  zu  $O_2^-$  reduziert, das zur Abwehr von Mikroorganismen verwendet wird [87, 94]. Die ROS-Bildung konnte auch in valvulären, glatten Muskelzellen [95] und Fibroblasten nachgewiesen werden, wo sie regulatorische Funktionen wie die Signalmodulation übernehmen [96]. In physiologischer Konzentration wirken ROS als *second Messenger* im Gewebe und sind an Signaltransduktionen und zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt [97, 98]. In Mitochondrien produzierte ROS sind wichtig für Autophagie- und Differenzierungsprozesse, Immunfunktionen und den Alterungsprozess [99]. In höheren Konzentrationen führt der daraus resultierende oxidative Stress zur Beschädigung von Proteinen, Lipiden und der Desoxyribonukleinsäure (DNS) [88, 90, 93]. ROS induzieren Modifikationen am aktiven Zentrum von Proteinen oder ändern deren Raumstruktur [86]. Fettsäureradikale modifizieren Membranstrukturen in der als Lipidperoxidation bezeichneten Kettenreaktion [86]. ROS-Einwirkungen auf die DNS können zu Strangbrüchen und Basen-Fehlpaarungen führen [86].

### 1.3.2 Prinzip der Photodynamischen Reaktion

Die PDR erfordert Sauerstoff, Licht und einen Photosensibilisator (PS) [100]. Eine geeignete Lichtzufuhr kann über Laserstrahlen erfolgen [100]. Lichtquelle und Bestrahlungsdauer bestimmen die Energie [100]. Die verwendete Wellenlänge ist von der molekularen Struktur des PS abhängig [100]. Der PS absorbiert die Photonenenergie des Lasers und wird aus einem nicht-erregten Zustand in einen erregten versetzt [101]. In diesem erregten Zustand ist der PS in der Lage mit Sauerstoffmolekülen zu reagieren und z.B. Singulett Sauerstoff freizusetzen [101]. Singulett Sauerstoff kann zwei Zustände annehmen, die sich durch die Spins der Elektronen und deren Position in den Orbitalen unterscheiden [102]. Nach der Induktion von Singulett Sauerstoff kehrt der PS in den nicht-erregten Zustand zurück, und kann nun ein weiteres Photon absorbieren [101]. Der freigesetzte Singulett Sauerstoff kann mit einem Substrat reagieren oder seine Energie durch Wärmeabgabe verlieren [101]. In Zellen reagiert Singulett Sauerstoff sehr schnell mit umliegenden Molekülen [101]. In erregtem Zustand kann der PS grundsätzlich zwei Reaktionen eingehen [103]. In der Typ-I-Reaktion reagiert der PS direkt mit Zellmolekülen unter Elektronen- oder Protonentransfer [103]. Die dabei freiwerdenden Radikale können mit weiteren Sauerstoffmolekülen reagieren [103]. In der Typ-II-Reaktion wird der PS durch den Energietransfer auf molekularen Sauerstoff, aus dem exzitierten Zustand in einen Triplett-Zustand angehoben und dadurch der stark reaktive Singulett Sauerstoff freigesetzt [103]. Die freigesetzte Menge an Singulett Sauerstoff ist von der Photonen-Absorptionsrate des PS und dem Energietransfer abhängig [101]. Die photodynamische Reaktion ist auch eine Möglichkeit zur Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) *in vivo* [104]. Klinisch findet sie z.B. bei der

Behandlung von Tumorpatienten Verwendung [100, 105]. Das Charakteristikum eines PS ist die Reaktion mit Sauerstoff. Dabei freiwerdende Radikale können Zellschäden und Nekrosen verursachen [105]. Diese Eigenschaften werden in der Tumorthherapie genutzt, um gezielt Tumornekrosen zu induzieren [105].



**Abb. 3 - PDR-induzierte ROS-Freisetzung**

Die Photodynamische Reaktion (PDR) ist das Produkt aus Bestrahlung und einem Photosensibilisator (PS). Die Laserfaser wird retrograd zur Aortenklappe vorgeschoben. Der intravenös applizierte PS bindet an Transportproteine. Die Strahlung des Rotlichtlasers hebt den Grundzustand des PS an und führt zur ROS-Freisetzung. Im Gewebe der Aortenklappe induziert der oxidative Stress pathogene Effekte, wie die Lipidperoxidation von LDL und die Entkopplung der Stickstoffmonoxid Synthase. Die ruhenden VICs werden in einen aktivierten Zustand versetzt und induzieren die Pathogenese der DAVD. [100-102, 105]

### 1.3.3 Temoporfin

5,10,15,20-Tetra - [m-hydroxyphenylchlorin (mTHPC, Temoporfin, Foscan®) ist ein Photosensibilisator der zweiten Generation, der Mitte der 1980er Jahre erstmals getestet wurde [106]. 2001 wurde er in Europa zur Behandlung fortgeschrittener Kopf-Hals-Tumoren zugelassen [106]. Die Applikation von Temoporfin kann intraperitoneal oder intravenös erfolgen [106]. Temoporfin hat einen stark lipophilen Charakter und muss für eine adäquate Applikation in gelöster Form (zum Beispiel mit Alkohol) verabreicht werden [106]. Die Zellaufnahme nach erfolgter Applikation erfolgt weitestgehend pH-unabhängig, wobei Intensitätsverluste bei pH-Werten unter 6 beobachtet wurden [107, 108]. Nach der Applikation bindet Temoporfin an Plasmakomponenten bevor es im Gewebe aufgenommen wird [109]. Messungen in der Verteilung von radioaktiv markiertem mTHPC zeigten eine schnelle Elimination aus dem Blut [110]. Die höchsten Verteilungswerte von mTHPC wurden in Leber, Lunge, Niere und Myokard beobachtet [109], wobei das Konzentrationsmaximum nach 10-24 Stunden erreicht wurde [106]. Generell hängt die Pharmakokinetik eines PS von seiner Ladung, den hydrophilen und lipophilen und molekularen Eigenschaften, sowie dem Aggregationszustand ab [106]. Die lipophilen

Eigenschaften von Temoporfin erklären seine Bindung an Lipoproteine und bestimmen seine Verteilung und Aufnahme im Gewebe [106, 111]. Untersuchungen konnten eine Lipid-abhängige Verteilung von Temoporfin feststellen. Etwa 22% werden über *low density lipoprotein (LDL)* gebunden transportiert, 17 % über Lipoprotein a (Lp[a]), 16 % über *high density lipoprotein (HDL)* und 6 % über *very low density lipoprotein (VLDL)* [112]. Die lipidabhängige Bindung scheint jedoch keine Auswirkung auf Schwankungen in der Verteilung zu haben. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Temoporfin zeigten, dass weder die Substanzverteilung über die Lipoproteine oder noch der Lipid-Metabolismus einen Einfluss auf die Plasmaverteilung haben [113].

## 1.4 Funktionelle Aspekte der *DAVD*

### 1.4.1 Oxidativer Stress – Entkoppelung der *NO* Synthese

Oxidativer Stress entsteht im Rahmen von kardiopulmonalen Erkrankungen durch die enzymatisch erhöhte *ROS*-Produktion bei gleichzeitig verminderter Aktivität antioxidativer Enzymsysteme [47]. Folgende pathophysiologische Mechanismen spielen hierbei eine Rolle: Zum einen die Überproduktion freier Sauerstoffradikale durch Enzyme wie die NADPH Oxidase, die Xanthin Oxidase, die Zyklooxygenase, sowie die Entkopplung der Stickstoffmonoxid Synthese (*NOS*). Zum anderen durch vermehrte Freisetzung von Leukozyten als Reaktion auf inflammatorische Prozesse. Dabei spielen die Mechanismen je nach kardiovaskulärer Entität eine unterschiedliche Rolle [47]. So bilden die variierenden *ROS*-Freisetzungsformen ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen *DAVD* und Atherosklerose [47]. Während die Plaquebedingte atherosklerotische Okklusion überwiegend durch, über die NADPH Oxidase produzierten *ROS* erfolgt, ist im Erkrankungsprozess der *DAVD* hauptsächlich die Entkopplung der *NOS* für die vermehrte Bildung von oxidativem Stress verantwortlich [47]. Die vermehrt anfallenden Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid und Superoxid, wurden in und um kalzifizierte Areale stenotischer Aortenklappen nachgewiesen [8, 10]. Zusätzlich zur enzymatischen Überproduktion von *ROS* spielt auch das antioxidative Enzymsystem eine relevante Rolle in der Genese der *DAVD* [47]. Antioxidative Enzyme wie die SOD, die Katalase und die Glutathion Peroxidase werden im Rahmen der fortgeschrittenen *DAVD* typischerweise mit vermindert exprimiert [8, 47]. Gleichzeitig werden Redox-sensible Transkriptionsfaktoren, wie *TGF-β* und *RUNX2* werden durch den oxidativen Stress vermehrt exprimiert und begünstigen die fibrotischen und kalzifizierenden Abläufe der *DAVD* [6, 47, 114].

### 1.4.2 Die Lipidperoxidation im Rahmen valvulärer Degeneration

Lipidperoxide sind ein Produkt der *ROS*-Einwirkung auf mehrfach ungesättigte Fettsäuren [86]. Durch Aufspaltung von Doppelbindungen und Abstraktion von Wasserstoffatomen durch Hydroxylradikale werden Alkyradikale und Wasser gebildet [86]. Alkyradikale können

molekularen Sauerstoff binden und so Perhydroxylradikale bilden [86]. Perhydroxylradikale sind sehr reaktiv und können unter Bildung von Lipidhydroperoxid Wasserstoffatome von Lipidmolekülen abstrahieren [86]. In dieser als Lipidperoxidation bezeichneten Kettenreaktion können mehrere Lipidmoleküle durch ein einziges Radikal modifiziert werden [86]. Daraus resultierende Funktionsbeeinträchtigung der Zelle werden beim Oxidationsprozess des *low density lipoprotein (LDL)* deutlich [86].

Die Oxidation von Lipoproteinen wurde besonders für den Pathomechanismus der Atherosklerose untersucht. [115] Zunehmende Infiltration von Lipiden und Zelladhäsions-Molekülen führen zu Chemotaxis und fördern das *Recruitment* von T-Lymphozyten und Monozyten in der Intima [116]. Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen, nehmen das oxidierte *LDL (oxLDL)* über den *scavenger*-Rezeptor auf und werden zu Schaumzellen [117].

Im Rahmen der *DAVD* ist die Infiltration von Lipiden, ähnlich wie bei der Atherosklerose, ein Resultat der endothelialen Dysfunktion. [32, 33]. So konnten erhöhte *LDL*- und *Lp(a)*- Werte im Rahmen der *DAVD* gezeigt werden [3]. *Lp(a)* ähnelt, als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor, dem *LDL* und kann ebenfalls oxidativ moduliert werden [118]. Der *Lp(a)*-Peroxidationsprozess verläuft langsamer als der von *LDL*. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass *Lp(a)* aufgrund seiner größeren Affinität zu Matrix-Strukturen einer erhöhten *ROS*-Freisetzung ausgesetzt wird [118]. Die Bindung von *LDL* an Komponenten der extrazellulären Matrix entsteht durch Ladungsunterschiede. Als wichtige Komponente von *LDL* bindet das Apolipoprotein B-100 (*ApoB-100*) mit seinen positiv geladenen Seitenketten, bevorzugt an die negativ geladenen Proteoglykane Decorin und Biglykan [119-121]. Erhöhte Lipidansammlungen der Aortenklappe sind zum Teil altersbedingt, finden sich aber deutlich verstärkt im Rahmen einer Degeneration. Es konnten Korrelationen zwischen valvulärer *LDL*-Oxidation und dem Grad der Inflammation in stenotischen Aortenklappen gezeigt werden [122]. Eine Prädilektionsstelle der Lipidakkumulation scheint die subendotheliale Fibrosa zu sein, wo vermehrte Lipidinfiltrationen und -oxidationen nachgewiesen wurden [123]. Die Bindung von *LDL*-Molekülen erfolgt über *Toll-like*-Rezeptoren (*TLR's*), die von Monozyten und Makrophagen exprimiert werden [124]. Die Fähigkeit aktivierter *TLR's* mit dem C-terminalen Ende der NADPH Oxidase zu interagieren induziert oxidativen Stress [124, 125]. Die zunehmende *LDL*-Oxidation konnte mit vermehrter Anwesenheit von Leukozyten, Makrophagen, T-Zellen, einem verstärkten EZM-Remodelling und erhöhten *TNF- $\alpha$* -Werten in Verbindung gebracht werden [122]. In Koronararterien zeigten *in vitro* Untersuchungen endothelialer Zellen, dass eine Überexpression von *TLR-2* und *TLR-4* die Induktion des *BMP-2* durch *oxLDL* erhöht [126]. *BMP-2* ist ein wichtiges Protein in der Chondrogenese. Es reguliert die Expression des *SRY-Box-Transcription Factor 9 (Sox9)*, der für die Knorpelbildung erforderlich ist [127]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Isoformen 1 und 2 der *Extracellular-signal Regulated Kinases (ERK)* und der Transkriptionsfaktor *nuclear*

*factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF-κB)* an der *BMP-2* Induktion durch *oxLDL* beteiligt sind [126]. In humanen *VICs* konnte *oxLDL* die Expression des *Pituitary-specific positive transcription factor 1 (TiP-1)* und des *BMP-2* erhöhen [128]. Es wird daher angenommen, dass *oxLDL* ein Induktor der osteochondrogenen Differenzierung ist [128]. Meng et al. untersuchten die Anwesenheit der *TLR-2* und *-4* in humanen Aortenklappen. Sie konnten eine Expressierung beider Rezeptoren in kultivierten *VICs* feststellen [129]. Ebenso wiesen sie die Aktivierung von *TLR-2* und *TLR-4* durch Peptidoglykan und LPS nach [129]. Resultierende Aktivierungen von *NF-κB* führten zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) [129]. Es zeigten sich Erhöhungen des *runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* und *BMP-2*. Beides sind relevante Proteine der Knochenbildung [130, 131], die in die Pathogenese der *DAVD* eingebunden sind [44, 132]. Ihre Aktivierung konnten in Folge der agonistischen Aktivierung von *TLR-2* und *TLR-4* festgestellt werden [129]. Die Arbeitsgruppe um Côté zeigte, dass vermehrtes *oxLDL* mit erhöhtem fibrokalzifizierenden Aortenklappen-Remodelling assoziiert ist [133]. *In vitro* Untersuchung zeigten ferner eine *oxLDL*-Beteiligung in der Modulation von *VICs* mit osteoblastischer Differenzierung [134, 135].

### 1.4.3 Remodelling der Extrazellulären Matrix

Physiologisch unterliegt die EZM ständigen, sich Gleichgewicht befindlichen, Auf- und Abbauprozessen, die für den Erhalt extrazellulärer Strukturen wichtig sind [43]. Pathologische Umbauprozesse, wie sie in der *DAVD* auftreten, sind die Folge eines veränderten Gleichgewichts [43]. Degenerative Veränderungen erhöhen den Kollagenanteil und die Dichte extrazellulärer Strukturen. Die aufgehobene valvuläre EZM-Organisation mindert die Beweglichkeit der Aortenklappe. An dem Remodelling ist maßgeblich die inflammationsbedingte *VIC*-Differenzierung der valvulären EZM beteiligt [28, 136, 137]. Als wichtigstes Abbauenzym der EZM nehmen die MMP's im Remodelling eine Schlüsselrolle ein. Ihre Sekretion erfolgt durch unterschiedliche Zellen, wie T-Zellen, Makrophagen, Myofibroblasten, Endothelzellen und *VICs* [138, 139]. Immunhistochemische Untersuchungen stenosierter Aortenklappen zeigten erhöhte Expressionen von MMP 1, MMP 2, MMP 3, MMP 9 und MMP 12 [138, 140-142].

Untersuchungen stenosierter Aortenklappen zeigten, verglichen mit Kontrollgruppen, eine Expression MMP 9-positiver Areale in erkrankten Klappen auf [140]. Polygenetische Untersuchungen von Aortenklappen bei Patienten mit und ohne Aortenklappenstenose zeigten eine hohe Beteiligung von MMP 12 [143]. Untersuchungen zur MMP 10-Expression in humanen Aortenklappen bei Patienten mit schwerer kalzifizierender Aortenklappenstenose geben Hinweise auf ihre Beteiligung in der Pathologie der Aortenklappenkalzifizierung und dem Voranschreiten einer Aortenklappenstenose [144]. Perrotta et al. untersuchten 19 pathologische Aortenklappen von Patienten, die als Folge ihrer kalzifizierenden Aortenstenose einen Klappenersatz erhielten [43]. Sie fanden eine quantitative Erhöhung der MMP 9 (92 kDa) im

Bereich der kalzifizierten Areale [43]. Satta et al. untersuchten die Expression verschiedener MMP's in kalzifizierten Aortenklappen. Die stärksten MMP 9-Signale zeigten sich um die kalzifizierten Areale [139]. Die höchste Aktivität von MMP 9 konnte in Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothelzellen und Osteozyten festgestellt werden [139]. Sie schlussfolgerten, dass diese Zellen für Remodelling-Prozesse und Degeneration der Aortenklappe verantwortlich sind [139].

## 1.4.4 Valvulärer Interstitialzellen

### 1.4.4.1 Funktion der valvulären Interstitialzellen

*VICs* bilden die am häufigsten vorkommende Zellart in Herzklappen [35, 145]. Sie liegen als Teil eines dreidimensionalen Komplexes innerhalb der EZM [36]. *VICs* verfügen über zahlreiche Aktinfilamente, lange zytoplasmatische Ausläufer, terminale Nervenendigungen und *gap junctions* [145]. Kontraktilität, Mechanotransduktion und Kommunikation sind wichtige Charakteristika, die den *VICs* Fähigkeiten der Anpassung, Erkennung von Gewebeveränderung und Kommunikation erlauben [36]. Sie sind in der Lage mechanische Änderungen ihres Gewebes, wie sie durch Öffnen und Schließen der Herzklappen entstehen, zu detektieren und darauf mit einer Formänderung (zelluläre Versteifung und Relaxierung) und Synthese von EZM-Komponenten zu reagieren [34, 36, 146]. *VICs* synthetisieren Kollagen, Elastin und Proteoglykane und sezernieren proteolytische Enzyme wie MMP's, die den Umbau der EZM forcieren [35, 37-40]. In nicht-pathologisch veränderten Herzklappen liegen die meisten *VICs* in einer nicht aktiven Form (Fibroblasten-ähnlicher Phänotyp) vor, deren Hauptaufgabe der strukturelle und funktionelle Erhalt der Herzklappe ist [36, 39, 41, 42]. In pathologisch veränderten Klappen werden *VICs* aktiviert und ändern ihren Phänotyp [35-37]. Die Aktivierung von *VICs* ist auch Teil normaler regenerativer Prozesse. Aktivierte *VICs* entsprechen phänotypisch Myofibroblasten. Sie können als Fibroblasten definiert werden, die teilweise Eigenschaften von Glattmuskelzellen besitzen und die Fähigkeit haben, die EZM zu kontrahieren [44].

### 1.4.4.2 Aktivierung der valvulären Interstitialzellen

Der Aktivierungsprozess von *VICs* wird durch *VECs*, Makrophagen, Chemokine und Wachstumsfaktoren wie *TGF- $\beta$*  stimuliert [36]. Erhöhter EZM-Umbau und steigende MMP- und *TIMP*-Sekretion sind Folgen dieser Aktivierung [36]. Nach vollendetem Remodelling werden die aktivierten *VICs* durch Apoptose eliminiert. Ein Ausbleiben der Eliminierung, verbunden mit einer zunehmenden EZM-Produktion, führt zu pathologischer Fibrose, Angiogenese, chronischer Inflammation und Kalzifizierung [36]. Ihre Akkumulation ist ein Charakteristikum des „*response-to-injury*“-Prozesses [35, 147]. Erkrankungen der Herzklappen können als Dysregulation der EZM-Organisation mit vermehrter *VIC*-Aktivierung verstanden werden [148].

Interaktionen von *VICs* und EZM finden über Rezeptoren aus der Integrin- und der Nicht-Integrin-Familie statt [149]. Die Aufrechterhaltung physiologischer Abläufe ist von der Zell-EZM-Kommunikation abhängig. Eine Unterbrechung der Rezeptoren-Bindung kann pathologische Kalzifizierungsprozesse verstärken [149]. Die Aktivierung von ruhenden *VICs* in einen Myofibroblasten-Phänotyp (aktivierte *VICs*) ist ein pathologischer Prozess der *DAVD*. Die Differenzierung in den aktivierten Zustand, erfolgt durch biomechanische Signale und wird nach derzeitigem Wissensstand überwiegend über *TGF-β1* ermöglicht [44, 150]. Die Bindung des Transkriptionsfaktors an korrespondierende *TGF*-Rezeptoren aktiviert intrazelluläre *SMAD*-Protein-Signalwege und führt zu Gentranskriptionen von Glattmuskel-Zellmarkern wie *alpha smooth muscle actin* (*α-SMA*) und *smooth muscle protein 22-alpha* (*SM22α*) [28, 151]. Neben dem *TGF-β*, scheint auch der *wingless-integrated relation site-* (*Wnt-*) Signalweg und das darin enthaltene  $\beta$ -Catenin eine Rolle im Prozess der *VIC*-Aktivierung zu spielen [151]. Ein wesentlicher Reiz für die Aktivierung von *VICs* ist der mechanische Stress. Versteifungen des Gewebes, wie sie im Rahmen der Wundheilung durch mechanischen Zug ausgeübt werden, sind relevant für die *VIC*-Aktivierung [151]. Untersuchungen porkiner *VICs* zeigten dehnungsabhängige Differenzierung mit vermehrter Kollagensekretion [77]. Besonders ausgeprägt war die Kollagen-III-Synthese [77]. Auch wirkt sich die Versteifung von Aortenklappen auf die Differenzierung von *VICs* in Myofibroblasten aus. Pho et al. wiesen eine, durch exogenen Dehnungsstress auslösbare, Anstieg von *α-SMA* nach [152]. Druck, als weitere Form mechanischer Reizung, kann sich ebenfalls auf pathologische Reaktionen der Aortenklappe auswirken. Warnock et al. untersuchten mechanosensitive Signalwege und druckabhängige *VIC*-Differenzierung [153]. Es zeigten sich erhöhte Zytokinexpressionen von IL-1, IL-6 und *TNF-α*. Auch EZM-Proteine wie MMP's konnten vermehrt detektiert werden [153].

#### 1.4.4.3 Relevanz des *α-smooth muscle actin*

Aktivierte *VICs* sind in der Lage, Muskel-spezifischer zytoskelettaler Proteine wie *α-SMA* zu exprimieren [154-156]. Die Expression von *α-SMA* mit kontraktile Eigenschaften, begünstigt ein Remodelling der Klappenmatrix [154, 157]. In der Entwicklung der drei muskulären Zellarten (Glattmuskelzellen, Muskelzellen und Herzmuskelzellen), ist *α-SMA* in jedem davon vorhanden. Postpartal ist es nur noch in Glattmuskelzellen zu finden [147]. Im Unterschied dazu, ist Vimentin, ein intermediäres Filament mesenchymaler Zellen, in fast allen *VICs* enthalten, nicht nur in den aktivierten [158, 159].

## 1.5 Die Bedeutung von *NT-proBNP* im degenerativen kardialen Prozess

Das *brain natriuretic peptide (BNP)* ist ein aus 32 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, das von den Kardiomyozyten sezerniert wird [160, 161]. Die Aktivierung von *BNP* erfolgt durch Abspaltung des N-terminalen Endes (*NT-proBNP*) des inaktiven Prohormons, *proBNP*. *BNP* wird durch vermehrten Dehnungsstress der ventrikulären Herzwand sezerniert und dient als diagnostischer Marker für Patienten mit Herzinsuffizienz [162]. Die Konzentrationen von *BNP* und *NT-proBNP* korrelieren mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz, wobei *NT-proBNP* eine höhere Halbwertszeit hat [161, 162]. Die linksventrikuläre Dysfunktion ist ein häufiger Grund für die chronische Herzinsuffizienz [163]. Diese kann unter anderem auf dem Boden einer Aortenklappenstenose entstehen, bei der es durch Einengungen der Ausflussbahn zu einem erhöhten Widerstand kommt [164, 165]. Gegenstand früherer und aktueller Forschung ist die Untersuchung von *BNP* und *NT-proBNP* als prognostischer Marker für Patienten mit ätiopathologischen Vorstufen der Herzinsuffizienz [163, 166-178]. Eine wichtige Ursache, die zu Herzinsuffizienz führen kann, ist die *DAVD*.

Studien, die eine Korrelation zwischen *NT-proBNP* und degenerativen Veränderungen der Aortenklappe untersuchten, konnten Veränderungen in der Dynamik des Peptidhormons nachweisen [167]. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte *BNP*-Werte mit der kardialen Pathologie einer Aortenstenose assoziiert sind [169]. Untersuchungen von 168 Patienten mit Aortenstenose oder aortaler Regurgitation zeigten erhöhte *NT-proBNP* Werte, die mit dem Schweregrad ihrer Erkrankung korrelierten [170]. Bergler-Klein et al. zeigten eine inverse Relation erhöhter *BNP*-Werte zu Messparametern linksventrikulärer Funktionen wie der Ejektionsfraktion und der Klappenfläche [171]. Ferner konnten sie einen Zusammenhang zwischen *BNP* und der Überlebensrate von Patienten mit Aortenstenose darlegen [171]. In der von Celval et al. untersuchten Kohorte mit 1.953 Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen *BNP* und der Überlebensrate bei moderater und schwerer Aortenstenose aufgezeigt werden [175]. Goodman et al. untersuchten 531 Patienten mit einer aortalen Klappenfläche  $\leq 1,3 \text{ cm}^2$  und einer linksventrikulären Ejektionsfraktion  $\geq 50 \%$ . In ihrer Studie waren steigende *BNP*-Werte ein Anzeichen für erhöhte Mortalität [176].

## 1.6 Ziele der Arbeit

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (*DAVD*) ist ein Symptomkomplex, der mit morphologischen und funktionellen Veränderungen der Aortenklappe einhergeht. Strukturelle Dysfunktionen und Inflammationsprozesse mit resultierender Verdickung, Versteifung und Kalzifizierung führen zu einer veränderten Struktur der Aortenklappe und können die Entstehung einer Aortenklappenstenose begünstigen. Degenerationen der Aortenklappe gehen mit zunehmender Klappendicke, Versteifung und Kalzifizierung einher.

Oxidativer Stress stellt das Resultat eines Ungleichgewichts freier Sauerstoffradikale und antioxidativer Enzymsysteme dar. Obwohl die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (*ROS*) im Prozess der *DAVD* identifiziert werden konnte, gibt es bisher keine ausreichenden Untersuchungen in ihrer genauen pathologischen Bedeutung. In unserem Kleintiermodell nutzten wir eine photodynamische Reaktion (PDR), um *ROS* gezielt über der Aortenklappe von Ratten zu induzieren. Die explantierten Aortenklappen der Tiere wurden in einem Zeitraum von bis zu 168 Tagen nach der PDR-vermittelten *ROS*-Generierung, auf morphologische und funktionelle Beeinträchtigungen untersucht. Dazu wurden die *ROS*-Einflüsse auf die Lipidinvasion mit begleitender Oxidation in den Aortenklappen untersucht. Mögliche Umbauprozesse der EZM wurden histologisch analysiert. Plasmauntersuchungen des herzspezifischen *NT-proBNP* dienen der Erfassung des Schweregrades der *ROS*-Induzierten *DAVD* und deren Auswirkung auf das kardiale System. Immunhistochemische Nachweise erhöhter MMP-Enzymaktivität wurden genutzt, um Rückschlüsse auf den Aktivitätsstatus des EZM-Remodellings ziehen zu können. Über immunhistologische Analysen quantifizierten wir die funktionelle Integrität von *VICs*, wesentlicher, am Umbauprozess der *DAVD* beteiligter Zellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Modell

In einem Kleintiermodell versuchten wir nachzuweisen, wie der Einfluss von *ROS* einzelne Aspekte der Pathogenese der *DAVD* unterstützt. Diese erreichten wir durch Kombination eines Rotlichtlasers mit einem PS (Temoporfin). Die Tiere erhielten eine intravenöse Applikation des Photosensibilisators und 24 Stunden später anschließend, operativ gestützt, die Bestrahlung durch den Laser. Nach Induktion der PDR wurden die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nach einer Beobachtungszeit von null, acht, 84 und 168 Tagen, euthanasiert und ihre Herzen explantiert. Anhand verschiedener histologischer Analysen wurden die Auswirkungen des oxidativen Stresses im Bereich der Aortenklappe detektiert und hinsichtlich der Explantationszeitpunkte miteinander verglichen. Die intravenöse Applikation des Photosensibilisators Temoporfin, die Bestrahlung der Ratten und die Explantation des erforderlichen Gewebes erfolgte durch die freundliche Unterstützung von Dr. med. Yukiharu Sugimura.

Um eine aussagekräftige Aussage über die Effekte von *ROS* treffen zu können, wurden die für den Versuch benötigten Tiere zu jedem Zeitpunkt jeweils in drei Gruppen ( $n = 7$ ) unterteilt: eine *ROS*-Gruppe und zwei Kontroll-Gruppen: eine Laser-Gruppe und eine Sham-Gruppe. Durch die Aufteilung in drei Kohorten sollen eventuelle Auswirkungen durch die Bestrahlung mit dem Laser oder den operativen Eingriff von den *ROS*-Auswirkungen abgegrenzt werden. Die Tiere der *ROS*-Gruppe erhielten die präoperative intravenöse Temoporfin-Injektion und die daran angrenzende 60-minütige Bestrahlung durch den Rotlicht-Laser. Die Tiere der Laser-Gruppe erhielten dagegen ausschließlich eine 60-minütige Bestrahlung durch den Laser. Dies diente der Detektion möglicher physikalischer Schäden, die durch den Laser selbst verursacht worden sein könnten. Die Tiere der Sham-Gruppe erhielten eine Operation, in der eine inaktivierte Laserfaser retrograd zur Aortenklappen-Ebene vorgeschoben wurde. Dadurch konnte untersucht werden, ob die Operation selbst Einfluss auf die funktionelle Integrität der Aortenklappe nimmt. Jede der drei Gruppen besteht aus sieben Tieren ( $n = 7$ ). Unter Berücksichtigung der vier verschiedenen Explantationszeitpunkte ergibt sich eine Gesamtzahl von 84 Tieren pro angewandter Untersuchungsmethode.

## 2.2 Ratten

Für das Modell wurden Ratten des Wistar-Stammes verwendet, die eigens für Tierversuche gezüchtet wurden. 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 376 männliche Ratten mit einem Gewicht von 250 g bis 300g.

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

## 2.3 Anwendung der Photodynamischen Reaktion

Das Temoporfin wurde den Tieren, nach inhalativer Isofluran-Narkotisierung (Einleitung: 2-3 Vol.%; Erhaltung 1-1,5 Vol.%), mit einer Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht, vor der Laserbestrahlung, über die Vena caudalis mediana appliziert. 24 Stunden nach Applikation des Photosensibilisators wurden die Ratten erneut operiert und mit einer Laserfaser, welche über die A. carotis eingeführt wurde, mit einer Wellenlänge von 652 nm über der Aortenklappe bestrahlt. Für den operativen Eingriff wurden inhalativ Isofluran als Narkotikum und 30 Minuten zuvor, subkutan appliziertes Buprenorphin als Analgetikum verwendet. Im Anschluss an die Prämedikation und die Kontrolle der Schutzreflexe, erfolgte die zervikale Inzision mit Darstellung der Vena jugularis interna und der Arteria carotis communis. Über das venöse Niederdrucksystem wurden 300 IE/kg Körpergewicht Heparin, über eine 14 G-Kanüle, appliziert. Es folgte die Vasotomie der rechten Arteria carotis communis mit retrograder Anlage eines hohlen Katheters (20 G-Kanüle). Über den Katheter wurde eine Laserfaser in die Tiere eingeführt und retrograd bis zur Aortenklappenebene vorgeschoben. Die anatomisch korrekte Positionierung der Laserfaser wurde echokardiographisch überprüft. Anschließend wurde der Laser an die Faser gekoppelt und eingeschaltet. Nach erfolgter Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 652 nm wurde die Faser entfernt und der operative Zugang verschlossen. Es erfolgte eine weitere analgetische Applikation von 0,05g mg/kg Körpergewicht Buprenorphin. Nach Ausschleichen

des inhalativen Narkotikums Isofluran wurden die Tiere extubiert und unter Wärmezufuhr mit Rotlicht und einer Wärmematte bis zum Wiedererwachen beobachtet. In den ersten beiden postoperativen Tagen, erhielten die Tiere alle zwölf Stunden eine subkutane Injektion von 0,05 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin. Im weiteren Verlauf blieben die Tiere für eine Dauer von bis zu 168 Tagen unter Beobachtung.

## 2.4 Explantation und Kryokonservierung

Für die Versuche wurden nach erfolgter Euthanasierung der Ratten Gewebeproben entnommen. Die Entnahme richtete sich nach den Zeitpunkten der planmäßigen Beobachtungszeiten: unmittelbar nach der Bestrahlung, sowie acht, 84 und 168 Tage danach. Bei jedem Tier wurde ein Stück das Conduit der Aortenklappe und Blutplasma entnommen. Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin in Vollnarkose versetzt. Es erfolgte eine subkutane Analgesie mit 0,05 mg/kg Körpergewicht mit Buprenorphin 30 Minuten vor der Operation. Eine effektive Antikoagulation erreichten wir durch eine Heparin-Applikation von 300 IE/kg (14 G-Kanüle) Körpergewicht in die Vena cava inferior. Die Euthanasierung der Tiere erfolgte durch Ausbluten der Tiere. Der operative Zugang zur Entfernung des Herzens erfolgte über eine mediane Sternotomie. Das Herz der Tiere wurde entfernt und die benötigten Gewebeproben präpariert. Nach Entgegennahme der Gewebeproben wurden diese in Einbettenschälchen (17x17x5 mm) mit Kryo-Compound eingebettet. Die Schälchen mit dem Gewebe wurden, in ein mit Isopentan (2-Methylbutan) gefülltes Behältnis gegeben und mit flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung des Gewebes erfolgte bei -80 °C. Die Gewebeproben wurden in Gefrierschnitttechnik in 5 µm dicken Schnitte aufgearbeitet (Kryostat, Leica, Wetzlar). Es wurde darauf geachtet, dass jeweils alle drei Taschen der Aortenklappe in einer Schnittebene liegen. Die Schnitte wurden auf Objektträger abgestreift und bei -20 °C und -80 °C gelagert.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Kat.Nr.</b>
KP-Kryo-Compound	Klinipath	1620-C
2-Methylbutan / Isopentan	Roth	3927,2
Heparin 25.000 IE/5 ml, 5 ml	Rotexmedica	PZN-3862340

## 2.5 Histologische Analysen

Um Aussagen über die Auswirkungen der *ROS*-induzierten Effekte treffen zu können, wurden die Gewebeproben der Aortenklappenebenen histologisch angefärbt und miteinander verglichen. Insgesamt wurden vier verschiedene Färbungen vorgenommen. Jede Färbung beleuchtete einen anderen Aspekt der *ROS*-induzierten Pathogenese. Es wurden zwei histologische Analysen (Movat Pentachrom, Oil Red O), eine Immunfluoreszenz-Färbung ( $\alpha$ -*SMA*/Vimentin) und eine immunhistochemische Färbung (MMP 9) durchgeführt. Die für die histologischen Analysen genutzten Schnitte, wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.5.1 Movat Pentachrom

Die Movat Pentachrom Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die zu Darstellung verschiedener Komponenten des Bindegewebes dient. Das Gewebe wird mit Alcianblau, Weigert's Hämatoxylin, Crocein-Säurefuchsin und alkoholischem Safran angefärbt. Somit können verschiedene Bindegewebsanteile in unterschiedlichen Farben dargestellt werden.

<b>Gewebe</b>	<b>Farbe</b>
Firbin und Fibrinoid	intensives rot
Glykosaminoglykane	grün
Kerne und elastische Fasern	schwarz
Kollagen und retikuläres Bindegewebe	gelb
Muskulatur	rot

Vor der Färbung wurden die dafür benötigten Lösungen selbstständig hergestellt. Diese sind, soweit nicht anders angegeben wiederverwendbar.

Alkalischer Alkohol (400 ml)	96 % Ethanol (360 ml) + 30 % Ammoniumhydroxid (40 ml)
2 % Alkoholisches Hämatoxylin (500 ml)	Hämatoxylin (10 g) + 96 % Ethanol (500 ml)
Alkoholischer Safran (200 ml)	Safran du Gatinais (12 g) + 100 % Ethanol (200 ml)
Bouin'sche Lösung (420 ml)	Pikrinsäure (300 ml) + 37 % Formaldehyd (100 ml) + 100 % Essigsäure (20 ml)
Brilliant Crocein R Stock (400 ml)	Brilliant Crocein R (4 g) + Aquadest (398 ml)

Crocein Säurefuchsin (100 ml) (einmalige Verwendung)	Brilliant Crocein R Stock (80 ml) + Säurefuchsin Stock (20 ml)
Eisenchlorid (500 ml)	Eisen-Chlorid Hexahydrat (12,4 g) + Aquadest (500 ml) + 32 % HCL (5 ml)
1 % Eisessig (500 ml) (einmalige Verwendung)	100 %ige Essigsäure (5 ml) + Aquadest (195 ml)
5 % Natriumthiosulfat (200 ml) (einmalige Verwendung)	Natriumthiosulfat (10 g) + Aquadest (200 ml)
Jodlösung (500 ml)	Jod (10 g) + Kaliumjodid (20 g) + Aquadest (500 ml)
5% Phosphowolframsäure (500 ml)	Phosphowolframsäure (25 g) + Aquadest (500 ml)
Säurefuchsin Stock (500 ml)	Säurefuchsin (0,5 g) + Aquadest (497,5 ml) + 100 % Essigsäure (2,5 ml)
Weigert´s Eisenhämatoxylin (120 ml) (einmalige Verwendung)	2 % Hämatoxylin (60 ml) + Eisenchlorid (40 ml) + Jodlösung (20 ml)

Die für die Färbung verwendeten Objektträger wurden bei – 20 °C gelagert. Zu Beginn der Färbung wurden die kryokonservierten Schnitte für fünf Minuten in Aquadest rehydriert, gefolgt von einer zehnminütigen Fixierung mit 4 %igem Formalin und einem weiteren fünfminütigen Waschschrift mit Aquadest. Anschließend wurden die Schnitte für zehn Minuten in eine auf 50 °C erwärmte Bouin´sche Lösung gestellt und danach für weitere zehn Minuten unter kaltem, fließendem Leitungswasser gespült. Es folgte eine erneute Fixierung für fünf Minuten, in 5 %igem Natriumthiosulfat. Danach wurden die Schnitte zwei Mal für jeweils zwei Minuten und ein Mal für eine Minute in Aquadest gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit 1 %igem Alcianblau gefärbt. Nach einem zweiten Waschschrift mit fließendem Leitungswasser –für dreieinhalb Minuten – wurden sie für zehn Minuten in, auf 60 °C erhitztem, alkalischem Alkohol stabilisiert. Nachträglich folgte eine Spülung der Schnitte für dreieinhalb Minuten unter fließendem Leitungswasser. Diesem schloss sich die Färbung mit der Weigert´s Working Solution für neun Minuten an. Die Schnitte wurden für eine Minute mit Leitungswasser und anschließend für zwei Mal zwei Minuten und ein Mal eine Minute mit Aquadest gespült. Danach wurden sie für eine Minute mit der Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Lösung angefärbt und zwei Mal zwei Minuten und ein Mal eine Minute mit Aquadest gewaschen. Im Anschluss wurde das Gewebe für fünf Minuten mit 5 %iger Phosphowolframsäure differenziert und daraufhin für weitere fünf

Minuten mit 1 %iger Essigsäure gespült. Es folgte ein Waschschrift mit Aquadest für zwei Minuten, zwei Minuten und eine Minute. Danach wurden die Schnitte dehydratisiert. Dazu wurden sie für eine Minute mit 96 %igen Ethanol und für zwei Mal eine Minute mit 100 %igen Ethanol behandelt. Der Dehydratisierung schloss sich eine Färbung für acht Minuten mit alkoholischem Safran an, gefolgt von einem erneuten Dehydratisierungs-Schritt mit zwei Mal einer Minute mit 100 %-igem Ethanol. Zuletzt wurden die Schnitte für drei Mal fünf Minuten mit Xylol eingefettet und kurz an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurden sie mit Roti-Histokitt eingedeckt.

Die Aufnahme der Schnitte erfolgte mit einem DM2000 Mikroskop, mit DFC425C Kamera und Leica Software (LAS Version 8.8) mit zehnfacher Vergrößerung. Die Helligkeit wurde mit einem Wert von acht eingestellt. Die Belichtungszeit lag bei 4,96 ms, der Gain bei 5,00. Sättigung und Gamma-Wert lagen bei 1,10 und 1,0. Die Einzelaufnahmen der Schnitte wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ zu einem Übersichtsbild fusioniert, welches dem ursprünglichen Präparat entspricht [179].

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Kat.Nr.</b>
Alcianblau	Sigma	A5268-25G
Ammoniumhydroxid	Roth	CP17.1
Brilliant-Crocein R	Waldeck	1B-109
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma	235489-100G
Essigsäure 100 %	Roth	6755.2
Formaldehydlösung 37 %	Roth	4979.1
Hämatoxylin	Sigma	H3136
HCL 32-37 %	Roth	2601.1
Jod	Roth	7935.1
Kaliumjodid	Roth	8491.1
Natriumthiosulfat	Sigma	72049-250G
Phosphowolframsäure	Sigma-Aldrich	P4006-250G
Pikrinsäure	VWR Chemicals	84512.260
Roti-Histokitt II	Roth	T160.1

Safran du Gatinais	Waldeck	5A-394
Säurefuchsin	Roth	T128.1
Xylol	VWR	28975.325

## 2.5.2 Oil Red O

Oil Red O ist ein fettlöslicher rot färbender Azofarbstoff, der sich vor allem zum Färben von Triglyzeriden in fixierten Zellen eignet. Die Triglyzeride werden rot angefärbt, die Kerne stellen sich blau dar. Mit dieser Färbung soll die Anwesenheit von Lipiden im Bereich der Aortenklappe nachgewiesen werden.

Die für die Färbung notwendige Oil Red O Stocklösung wurde im Voraus hergestellt. Dazu wurden 2,5 g Oil Red O zusammen mit 500 ml Isopropanol (Verhältnis 1: 200) bei 40 °C vermischt. Die Stocklösung wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert um eine ausreichende Lösung des Stoffes zu gewährleisten und gefiltert. Die Stocklösung dient als Vorratsmenge aus der unmittelbar vor jedem Färbedurchgang eine Arbeitslösung hergestellt wurde. Dazu wurden 60 ml Stocklösung und 40 ml Aquadest für etwa zehn Minuten auf 40 °C erhitzt und gefiltert. Das für die Gegenfärbung der Kerne benötigte Hämatoxylin wurde in ein Becherglas gefiltert.

Für die Färbung wurden die Objektträger über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Fixierung der Schnitte mit 4 %igem Formalin für zehn Minuten. Die Objektträger wurden anschließend zwei Minuten mit fließendem Leitungswasser und zwei Minuten mit Aquadest gespült bevor sie für zehn Minuten mit 60 %igem Isopropanol gewaschen wurden. Im Anschluss wurden sie für 15 Minuten mit der Oil Red O Arbeitslösung angefärbt. Es folgten Waschschritte von zehn Minuten mit 60 %igem Isopropanol und drei Mal einer Minute mit Aquadest. Für die Gegenfärbung der Kerne wurden die Objektträger fünf Mal in das gefilterte Hämatoxylin eingetaucht und anschließend drei Mal für eine Minute mit Aquadest gewaschen. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden diese mit Aquatex eingedeckt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Aufnahme der Schnitte erfolgte mit einem DM2000 Mikroskop, mit DFC425C Kamera und Leica Software (LAS Version 8.8) mit zehnfacher Vergrößerung. Die Helligkeit wurde mit einem Wert von acht eingestellt. Die Belichtungszeit lag bei 4,96 ms, der Gain bei 5,00. Sättigung und Gamma-Wert lagen bei 1,10 und 1,0. Die Einzelaufnahmen der Schnitte wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ zu einem Übersichtsbild fusioniert, welches dem ursprünglichen Präparat entspricht [179]. Die Auswertung der Bilder erfolgte semiquantitativ. Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism (Version 6.0) verwendet.

Material	Hersteller	Kat.Nr.
----------	------------	---------

Isopropanol	VWR Chemicals	20839.297
Mayer's Hämatoxylin	Merck	1.09249.1000
Oil Red O	Sigma	00625-100G

#### 2.5.4 $\alpha$ -SMA / Vimentin

Die  $\alpha$ -SMA/Vimentin-Färbung ist eine Immunfluoreszenz-Färbung. Ziel der Färbung ist die Detektion von *VICs* und Zellen mesenchymalen Ursprungs. Das *alpha smooth muscle actin* ist in aktivierten *VICs* zu finden, während Vimentin die Anwesenheit von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen und inaktiven *VICs* aufzeigt. Bei dieser Kombinationsfärbung sind die Antikörper so gewählt, dass sie die *VICs* rot und die mesenchymalen Zellen grün darstellen.

Vor jedem Färbedurchgang wurden die Lösungen 0,1 %iges Tween-20, 0,25 %iges Triton-X sowie eine 1 %ige und eine 5 %ige Lösung mit bovinem Serum-Albumin (*BSA*) neu angesetzt. Nach Vorbereiten der Lösungen wurden die, bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten, Präparate mit einem DAKO-Pen umrandet um einen Flüssigkeitsaustritt über die Grenzen des Gewebes zu vermeiden und für zehn Minuten in 4 %iger Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Objektträger für drei Mal eine Minute mit phosphatgepufferter Salzlösung (*PBS*) gewaschen. Die darauffolgende Behandlung mit 0,25 %iger Triton-X-Lösung für zehn Minuten führt zur Permeabilisierung der Membran. Dies dient dem Nachweis zytosolischer Proteine. Im Anschluss wurden die Schnitte drei Mal zehn Minuten in *PBS* gewaschen und für eine Stunde in der 5 %igen *BSA* Lösung stehen gelassen. Das *BSA* verhindert, im Sinne eines Proteinblocks, die unspezifische Bindung des Primär-Antikörpers. Dann wurden die Schnitte für drei Mal eine Minute mit 0,1 %iger Tween-20-Lösung behandelt und zwei Mal für eine Minute in *PBS* gewaschen. Die Objektträger wurden ausgeschlagen und mit dem primären Antikörper behandelt. Auf den ersten Schnitt eines Objektträgers wurden 50  $\mu\text{l}$  des Primär-Antikörpers pipettiert. Auf den zweiten 50  $\mu\text{l}$  der 1 %igen *BSA*-Lösung. Im Anschluss wurden die Objektträger in einer Feuchtkammer bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde inkubiert und danach für drei Mal fünf Minuten in die 0,1 %-ige Tween-20-Lösung gestellt. Es folgte ein erneutes Waschen der Schnitte für zwei Mal eine Minute mit *PBS*, bevor der sekundäre Antikörper hinzugegeben wurde. Jeweils 50  $\mu\text{l}$  wurden auf beide Schnitte jedes Objektträgers pipettiert und diese daraufhin in einer Feuchtkammer für 45 Minuten bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine DAPI-Gegenfärbung zur Kontrastierung der Zellkerne durch Anfärben der DNS. Hierfür wurde das DAPI 1: 1000 verdünnt und 50  $\mu\text{l}$  auf jeden Schnitt pipettiert. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur für weitere zehn Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Nach einer letzten Waschung für drei Mal fünf Minuten in *PBS* und einer Minute in Aquadest wurden die Objektträger für 30 Sekunden in 100 %igem Ethanol dehydriert und mit Leica-Eindeckmedium eingedeckt.

### Antikörper-Verdünnung

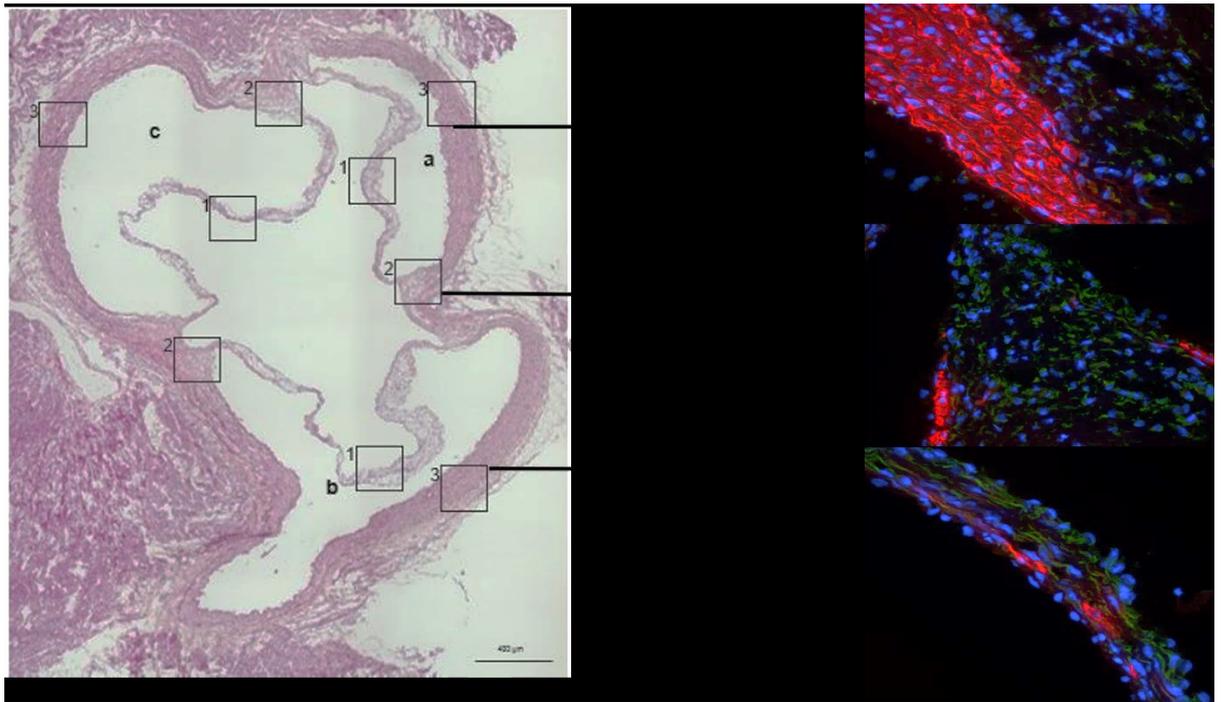
	Primärantikörper	Sekundärantikörper
$\alpha$ -smooth muscle actin	1: 100	1: 200
Vimentin	1: 200	1: 200

Die mikroskopischen Aufnahmen der Schnitte erfolgte in Einzelbildern und erfolgten mindestens einen und maximal drei Tage nach der Färbung.

Kanal	DAPI	Rot	Grün
Belichtungszeit	917 ms	1,6 s	1,7 s
Gain	1	1,4	1,5
Gamma	1	1	1

Die Aufnahme der Schnitte erfolgte mit einem DM2000 Mikroskop, mit DFC425C Kamera und Leica Software (LAS Version 8.8) mit 40-facher Vergrößerung. Die Auswertung der Bilder erfolgte quantitativ mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ [179]. Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism (Version 6.0) verwendet.

Um ein möglichst genaues und repräsentatives Bild der Aortenklappen zu erhalten, wurden die Präparate nach einem festen Schema aufgenommen. Die Klappe wurde in drei Bereiche aufgeteilt, die den jeweiligen Klappentaschen entsprechen. Aus jeder Zielregion wurden insgesamt drei Bilder erstellt. Ein Bild von der zentralen Aortenklappentasche, ein Bild von der ihr gegenüberliegenden Anulus-Region und ein Bild der (im Uhrzeigersinn) distalen Kommissur, dem Teil der Aortenklappe, indem die Tasche in den Anulus übergeht.



**Abb. 4 - Mikroskopische Zielaufnahmen der  $\alpha$ -SMA/Vimentin-Färbung**

Die Abbildung 4 zeigt die Regionen-spezifischen Zielaufnahmen jeder Aortenklappe, die mit  $\alpha$ -SMA/Vimentin gefärbt wurde. Es wurden insgesamt neun Einzelbilder pro Aortenklappe aufgenommen. Jeweils drei Bilder aus der Annulus-, der Kommissur- und der Taschen-Region. Dargestellt sind exemplarische Einzelaufnahmen aus jeder der drei Regionen und ein Übersichtsbild einer, mit HE-gefärbten, Aortenklappe.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Kat.Nr.</b>
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A9418-10G
Formalin 4 %	Roth	P087.3
Leica-Eindeckmedium	Leica	070937891
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T9284
Tween-20 Detergent	Calibochem	655205
<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Kat.Nr.</b>
Alexa 488 (anti-guinea pig)	Life-technologies	A11073
Alexa 546 (anti-mouse)	Life-technologies	A11003
Alpha smooth muscle actin (mouse)	Sigma	A5228
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Roth	6335.1

Vimentin (guinea pig)	Progen	Gp53
-----------------------	--------	------

## 2.5.5 Matrix Metalloprotease 9

Die MMP 9-Färbung ist eine immunhistochemische Färbung. Sie dient dem Nachweis der Matrix Metalloprotease 9. Ein positives Signal zeigt sich durch braun gefärbte Areale auf blau kontrastiertem Hintergrund.

Vor jedem Färbedurchgang wurden die Lösungen 0,25%iges Triton-X, eine 5%ige Lösung mit *BSA* und 0,1%igem Tween-20, 3%iges Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), 1%ige Salzsäure (HCL) und eine Diaminobenzidin-Lösung (DAB) neu angesetzt. Nach Vorbereiten der Lösungen wurden die, bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagerten, Präparate mit einem DAKO-Pen umrandet um einen Flüssigkeitsaustritt über die Grenzen des Gewebes zu vermeiden und für zehn Minuten in 4 %-iger Formalinlösung fixiert. Der TB-Puffer aus Trisaminomethan (60,57g) und Aquadest (1 L) wurde einmalig vorbereitet und für die Färbedurchgänge wiederverwendet. Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte für zehn Minuten in 4%igem Formalin fixiert und im Anschluss für drei Mal eine Minute in frischer *PBS*-Lösung gewaschen. Danach wurden die Schnitte für zehn Minuten in 0,25%iger Triton-X-Lösung und drei Mal für eine Minute mit *PBS*-Lösung gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die Schnitte für 60 Minuten in 5%-iger *BSA* + 0,1%iger Tween Lösung blockiert. Anschließend wurden die Schnitte für 60 Minuten mit dem, gegen MMP 9 gerichteten, Primärantikörper, bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer, inkubiert. Nach der vorgegebenen Zeit wurden die Objektträger ausgeschlagen und kurz in frischer *PBS*-Lösung abgestellt und anschließend für zehn Minuten mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) blockiert. Es folgte ein Waschschriff, für drei Mal fünf Minuten, in *PBS*-Lösung. Im Anschluss wurden die Schnitte für 45 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte für drei Mal fünf Minuten in *PBS*-Lösung gewaschen und danach für zehn Minuten in dem vorbereiteten TB-Puffer abgestellt. Anschließend wurden die Schnitte mit *DAB* für fünfeinhalb Minuten inkubiert und für weitere fünf Minuten in frischem TB-Puffer abgestellt. Danach wurden die Schnitte für eine Minute in Aquadest, eine Minute in Mayers Hämalaun-Lösung und kurz in Leitungswasser gewaschen, bevor die kurz in 1%ige HCL-Lösung eingetaucht und für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen wurden. Es folgte ein Waschschriff für eine Minute in Aquadest und ein Entwässern der Schnitte für eine weitere Minute in 99%igem Ethanol. Die Schnitte wurden mit Roti-Histokitt eingedeckt.

### Antikörper-Verdünnung

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
MMP 9	1: 200	1: 200

Die Aufnahme der Schnitte erfolgte mit einem DM2000 Mikroskop, mit DFC425C Kamera und Leica Software (LAS Version 8.8) mit zehnfacher Vergrößerung. Die Helligkeit wurde mit einem Wert von sieben eingestellt. Die Belichtungszeit lag bei 4,96 ms, der Gain bei 5,00. Sättigung und Gamma-Wert lagen bei 1,10 und 1,0. Die Einzelaufnahmen der Schnitte wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ zu einem Übersichtsbild fusioniert, welches dem ursprünglichen Präparat entspricht [179]. Die Auswertung der Bilder erfolgte semiquantitativ. Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism (Version 6.0) verwendet.

Material	Hersteller	Kat.Nr.
Albumin Fraction V	Roth	8076.3
DAB Substrate Kit	Zytomed	DAB530
Formaldehydlösung	Roth	P087.3
Mayers Mämalau-Lösung	Merck	1.09249.0500
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Dianova	111-035-003
Rabbit Anti-MMP9	Abcam	Ab38898
Roti-Histokitt II	Roth	T160.1
Salzsäure (HCl) rauchend	Roth	2601.1
Tris-hydromethylaminomethan	Merck	1.08382.2500
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T9284
Tween-20 Detergent	Calbochem	655205
30% Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth	9681.1

## 2.7 Sandwich *ELISA*

Bei einem Sandwich *ELISA* ist die Mikrotiterplatte mit einem spezifischen „Fang“-Antigen vorbeschichtet. Nach Hinzufügen der Proben bindet das gesuchte Zielantigen an das „Fang“-Antigen und wird blockiert. Nicht gebundene Antigene werden durch Waschschriffe entfernt. Es wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der an das Zielantigen bindet. Um das Ergebnis quantifizieren zu können, wird ein enzymatischer Sekundärantikörper hinzugefügt, der an den zweiten Primärantikörper bindet und eine Farbreaktion erzeugt. Durch Zugabe eines passenden chromogenen Substrates, kann nun die optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen und quantifiziert werden. Im Rahmen der Auswertung wird eine Standardkurve der optischen Dichte generiert. Diese setzt sich aus bekannten Antigenkonzentrationen zusammen und wird mit der optischen Dichte der untersuchten Probe verglichen, um die Antigenkonzentration zu bestimmen.

### 2.7.1 NT-proBNP *ELISA*

Zur Untersuchung des *NT-proBNP* wurde ein *Sandwich-ELISA* verwendet. Hierzu wurden die Plasma-Proben der Tiere untersucht. Um die Antigenkonzentration des *NT-proBNP* quantifizieren zu können wurde zunächst eine Standardreihe generiert, um die Konzentration des Zielantigens der Proben bestimmen zu können. Hierzu wurde eine Standardlösung aus lyophilisiertem Standard mit 1.0 ml Standard-Verdünnungsmittel hergestellt, und innerhalb der Standardreihe, nach Herstellerangaben, verdünnt. Zur Untersuchung der Proben wurden je 100 µl Plasma in jedes Well der Mikrotiterplatte gegeben und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit aspiriert, 100 µl eines Biotin-gekoppelten Primärantikörpers, in die Wells hinzugefügt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die Überstände des Primärantikörpers wurden aspiriert und die Mikrotiterplatte wurde drei Mal mit einer Pufferlösung gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl eines, mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase, HRP*) konjugierten, Sekundärantikörpers hinzugefügt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Überstände wurden aspiriert und die Mikrotiterplatte fünf Mal gewaschen. Im Anschluss wurden je 90 µl einer 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB-Substrat) hinzugegeben, welches für den *ELISA* als chromogenes Substrat dient und lichtgeschützt für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Wells mit weiteren 50 µl einer Stop-Lösung versetzt. Die Messung der Antigenkonzentration von *NT-proBNP* erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Kat.Nr.</b>
Rat NT-proBNP ELISA Kit	LifeSpan BioSciences	LS-F23593



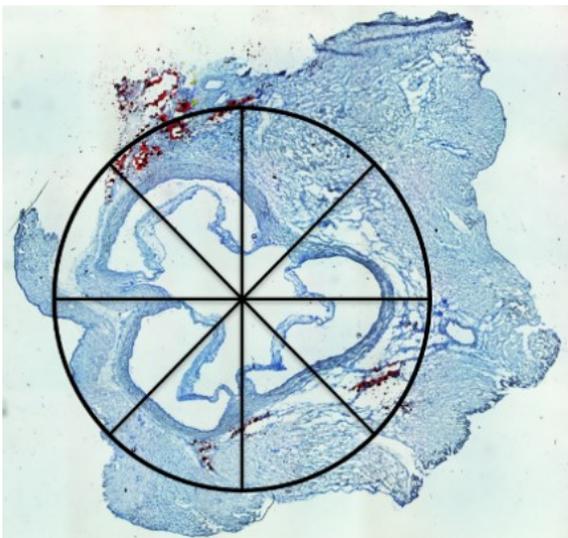
## 2.8 Evaluation und Statistik

### 2.8.1 Movat Pentachrom

Die Auswertung der Aortenklappentaschen erfolgte deskriptiv anhand der histologischen Bilder. Hierzu wurden die Bilder der verschiedenen Gruppen (Sham, Laser, ROS) anhand der Explantationszeitpunkte tabellarisch gegenübergestellt und miteinander verglichen. Untersucht wurden Verteilung, Ausprägung und Spektrum der einzelnen Farbanteile. Daraus ließen sich Schlussfolgerungen über die einzelnen EZM-Komponenten ziehen.

### 2.8.2 Oil Red O

Die Auswertung erfolgte semiquantitativ. Hierzu wurde die Aortenklappentasche mit ihrem umliegenden Gewebe als Zielgebiet definiert und in acht gleich große Areale unterteilt. Jedes dieser Areale wurde auf das Vorhandensein von gefärbten Zellen untersucht. Für jedes positive Areal wurde ein Punkt vergeben. Hierfür spielte es keine Rolle, wie viele positiv gefärbte Zellen in einem Gebiet detektiert werden konnten. Jedem Tier konnte damit ein Wert zwischen 0/8 und 8/8 zugeteilt werden. Die Tiere wurden mit dem entsprechenden Wert versehen und tabellarisch gelistet. Die Datensätze wurden mit GraphPad-Prism (Version 6.0) statistisch aufgearbeitet und mittels One Way ANOVA mit Dunn's multiple comparison test analysiert.



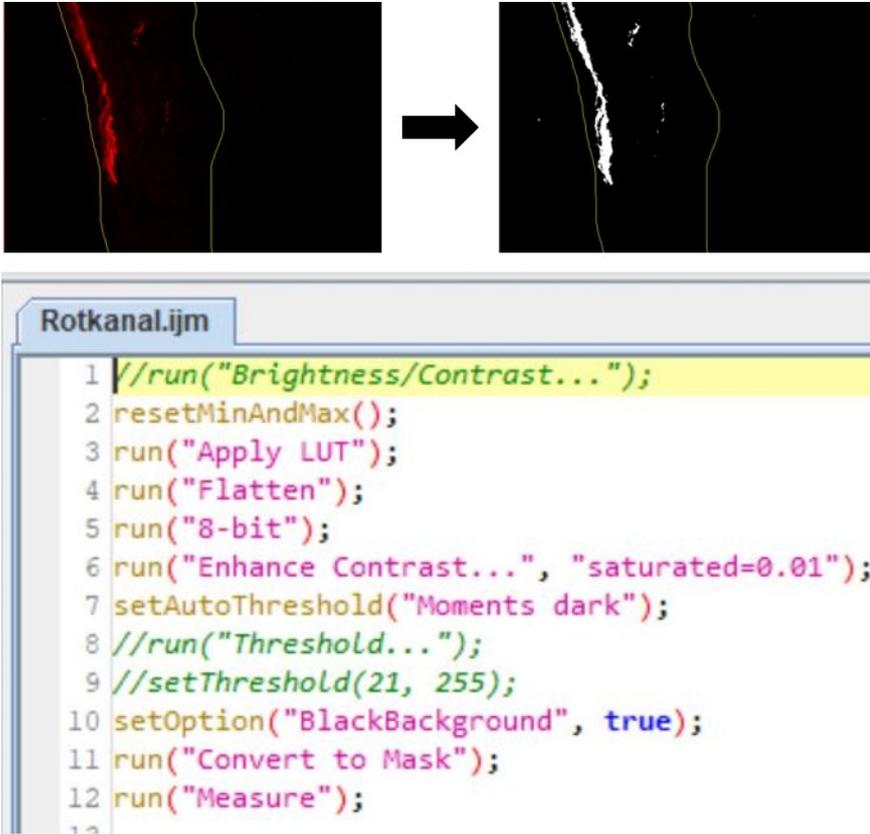
**Abb. 5: Auswertung der Oil Red O-Färbung**

Die Abbildung 5 zeigt die semiquantitative Auswertung der mit Oil Red O gefärbten Aortenklappen. Die Aortenklappe wurde zusammen mit dem paravalvuläre Areal als Zielgebiet definiert und in acht gleich große Gebiete unterteilt. Jedem Gebiet mit positivem Signal wurde ein Punkt vergeben.

### 2.8.3 $\alpha$ -SMA/Vimentin

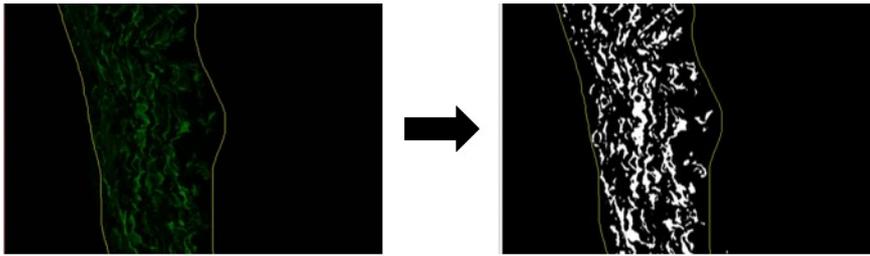
Die Färbung wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Rasband, National Institutes of Health) [179] quantitativ analysiert und statistisch mit GraphPad Prism 8 (GraphPad Software,

San Diego, California) ausgewertet. Dazu wurden die mikroskopischen Bilder mit erarbeiteten Makros (siehe Abb. 5-7) in Graustufen umgewandelt und binär dargestellt. Um eine möglichst detailgetreue Darstellung zu erhalten wurden die Makros für das  $\alpha$ -SMA- und das Vimentin-Signal separat programmiert.



**Abb. 6 - Quantifizierung von  $\alpha$ -SMA**

Die Abbildung zeigt die Auswertung des  $\alpha$ -SMA-Signals innerhalb der  $\alpha$ -SMA/Vimentin-Färbung. Die Quantifizierung der mit  $\alpha$ -SMA gefärbten Einzelbilder erfolgte über das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ. Das entsprechende Makro wurde selbst erstellt und zeigt die einzelnen Programmierungen zur binären Umwandlung und Quantifizierung signalreicher Zellen.



```

*Grünkanal.ijm
1 //run("Brightness/Contrast...");
2 resetMinAndMax();
3 run("Apply LUT");
4 run("Flatten");
5 run("8-bit");
6 run("Enhance Contrast...", "saturated=0.01");
7 run("Median...", "radius=6");
8 setAutoThreshold("Default dark");
9 //run("Threshold...");
10 setAutoThreshold("RenyiEntropy dark");
11 //setThreshold(17, 255);
12 setOption("BlackBackground", true);
13 run("Convert to Mask");
14 run("Set Measurements...",
15 "area mean standard modal min centroid center perimeter
16 bounding fit shape feret's integrated median skewness kurtosis
17 area_fraction stack limit display
18 invert scientific add nan redirect=None decimal=3");
19 run("Measure");

```

**Abb. 7 - Quantifizierung von Vimentin**

Die Abbildung zeigt die Auswertung des Vimentin-Signals innerhalb der  $\alpha$ -SMA/Vimentin-Färbung. Die Quantifizierung der mit Vimentin gefärbten Einzelbilder erfolgte über das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ. Das entsprechende Makro wurde selbst erstellt und zeigt die einzelnen Programmierungen zur binären Umwandlung und Quantifizierung signalreicher Zellen.

In einem weiteren Schritt wurden beide Bilder übereinander gelegt um Überschneidungsbereiche zwischen  $\alpha$ -SMA und Vimentin darzustellen. Ziel der Auswertung war es, die  *$\alpha$ -smooth muscle cells* darzustellen, die aus dem ruhenden in den aktivierten Zustand versetzt wurden.



**Abb. 8 – Quantifizierung von  $\alpha$ -SMA und Vimentin**

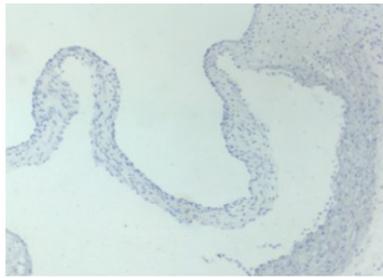
Die Abbildung zeigt die kombinierte Auswertung des  $\alpha$ -SMA- und des Vimentin-Signals innerhalb der  $\alpha$ -SMA/Vimentin-Färbung. Die Quantifizierung der beiden mit  $\alpha$ -SMA und Vimentin gefärbten Einzelbilder erfolgte über das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ. Das entsprechende Makro wurde selbst erstellt und zeigt die einzelnen Programmierungen zur Quantifizierung signalreicher Zellen.

Der Bereich um die Aortenklappe wurde manuell als festes Areal definiert; die sogenannte „*region of interest*“ (*ROI*). Die *ROI* wurde für jede Aortenklappe angefertigt und dient dem Zweck das prozentuale Ergebnis des Überschneidungsbereiches in Relation zum Gewebe der Aortenklappe zu setzen. Das prozentuale Ergebnis zeigt den Anteil von aktiviertem *a-SMA* am gesamten *a-SMA*.

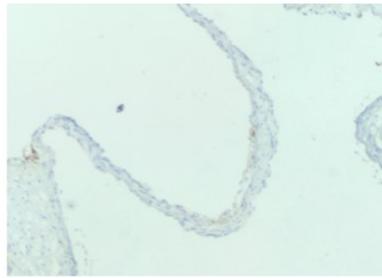
### 2.8.4 MMP 9

Die Färbung wurde semiquantitativ ausgewertet. Hierfür wurde der MMP 9-Score verwendet (siehe Tabelle). Die Ergebnisse wurden statistisch mit GraphPad-Prism (Version 6.0) ausgewertet und mittels One Way ANOVA mit Dunn’s und Friedman multiple comparison test analysiert.

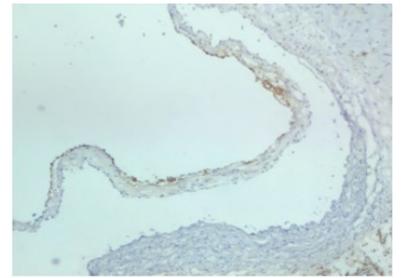
Score	Definition
0	Kein Signal
1	Positives Signal in einzelnen Arealen
2	Positives Signal in mehreren Arealen
3	Positives Signal in < 50% der Fläche
4	Positives Signal in > 50% der Fläche
5	Positives Signal der Gesamtfläche



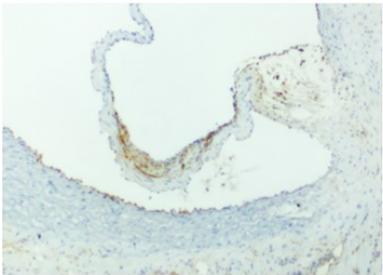
**0 Punkte**



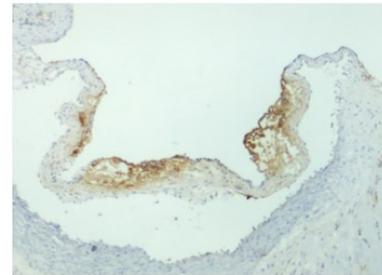
**1 Punkt**



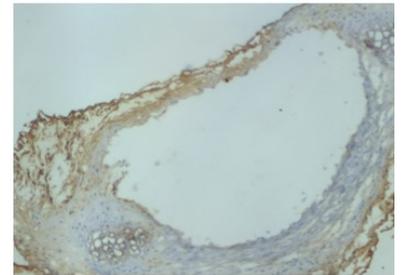
**2 Punkte**



**3 Punkte**



**4 Punkte**



**5 Punkte**

***Abb. 9 - MMP 9-Score***

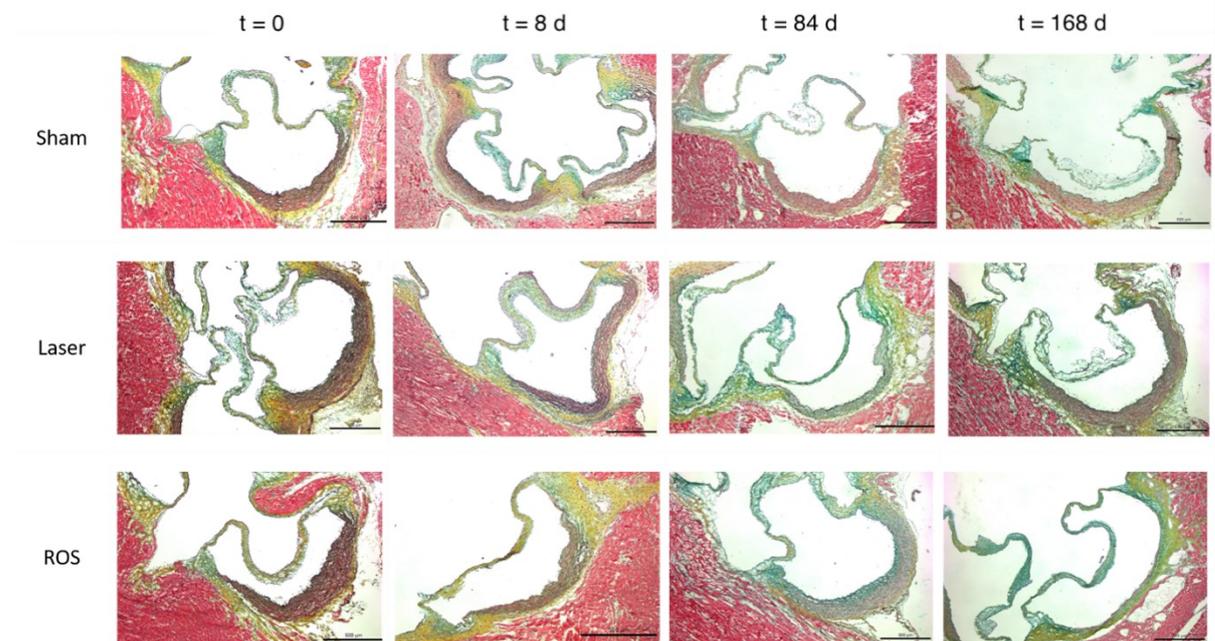
Die Abbildung zeigt die semiquantitative Auswertung der MMP 9-Färbung. Das MMP 9-Scoring System bewertet die einzelnen Regionen der Aortenklappen anhand des Ausprägungsgrades der MMP 9-Signale. Hierbei wurden Punkte zwischen null und fünf vergeben, die den jeweiligen Signalanreicherungen entsprechen.

### 3 Ergebnisse

Um herauszufinden, wie sich *ROS* auf die EZM und die Zelldifferenzierung bei *DAVD* auswirkt, wurden die oben genannten Methoden entsprechend analysiert und ausgewertet.

#### 3.1 Auswirkungen auf Bindegewebe

Die Movat Pentachrom Färbung diente uns, im Sinne einer Übersichtsfärbung, zur Erstreinschätzung der *ROS*-Auswirkungen auf Strukturen des Bindegewebes und der EZM. Ziel der Färbung war die Detektion erster struktureller Veränderungen im Gewebe.



**Abb. 10 - Movat Pentachrom – Darstellung der Aortenklappentaschen**

Die *ROS*-Gruppe ist den beiden Kontrollgruppen (Sham und Laser) in den Reihen gegenübergestellt. Verglichen werden die Kohorten anhand der vier Explantationszeitpunkte: t0, t8, t84, t168.

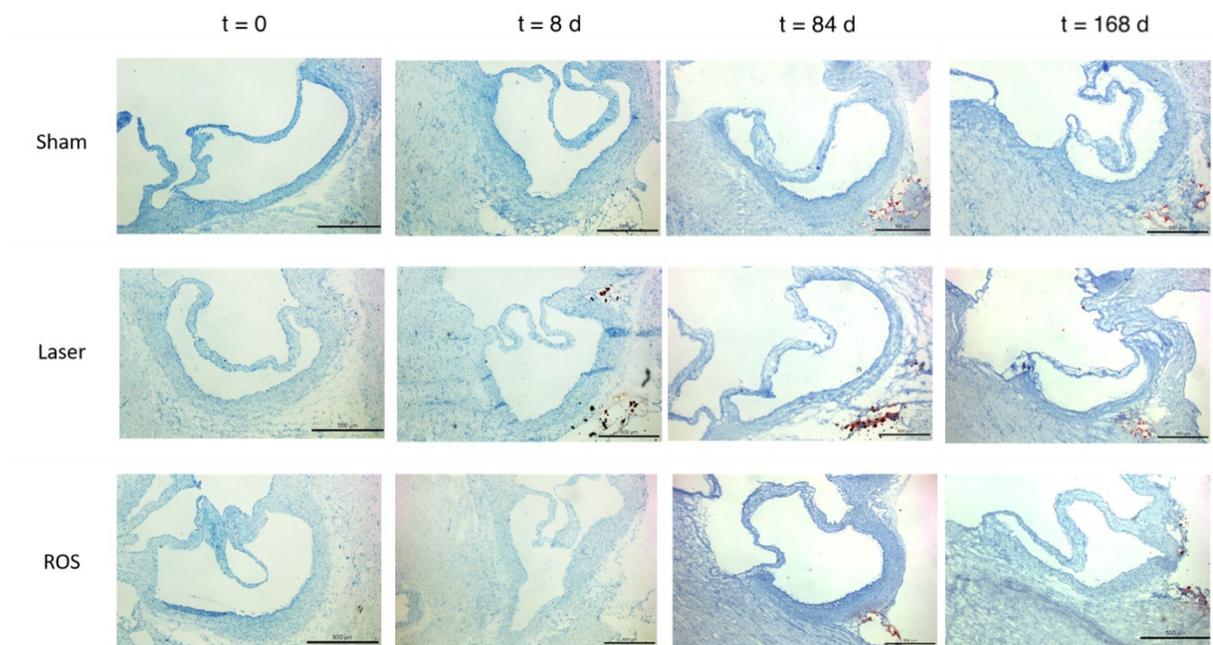
In der obenstehenden Abbildung sind die mit Movat Pentachrom gefärbten Aortenklappentaschen dargestellt. Die Kontrollgruppen (Sham, Laser) sind der *ROS*-Gruppe in den Reihen gegenübergestellt. Die untersuchten Explantationszeitpunkte sind in den Spalten dargestellt. Insgesamt wurden 84 Tiere explantiert und untersucht.

Die Gewebeproben der Tiere stellten sich in der Färbung weitestgehend homogen dar. Es ließen sich vereinzelt Unterschiede in der strukturellen Anordnung und der Morphologie der Aortenklappentaschen, entsprechend der gewebespezifischen Anreicherung, zwischen den Tieren feststellen. Diese Unterschiede zeigten sich aber in allen drei Gruppen und unabhängig vom gewählten Explantationszeitpunkt. Unterschiede wie Zunahme von Kollagen und retikulärem

Bindegewebe oder Schwankungen in der Darstellung von Glykosaminoglykanen konnten weder einer bestimmten Untersuchungsgruppe, noch einem bestimmten Explantationszeitpunkt zugeordnet werden.

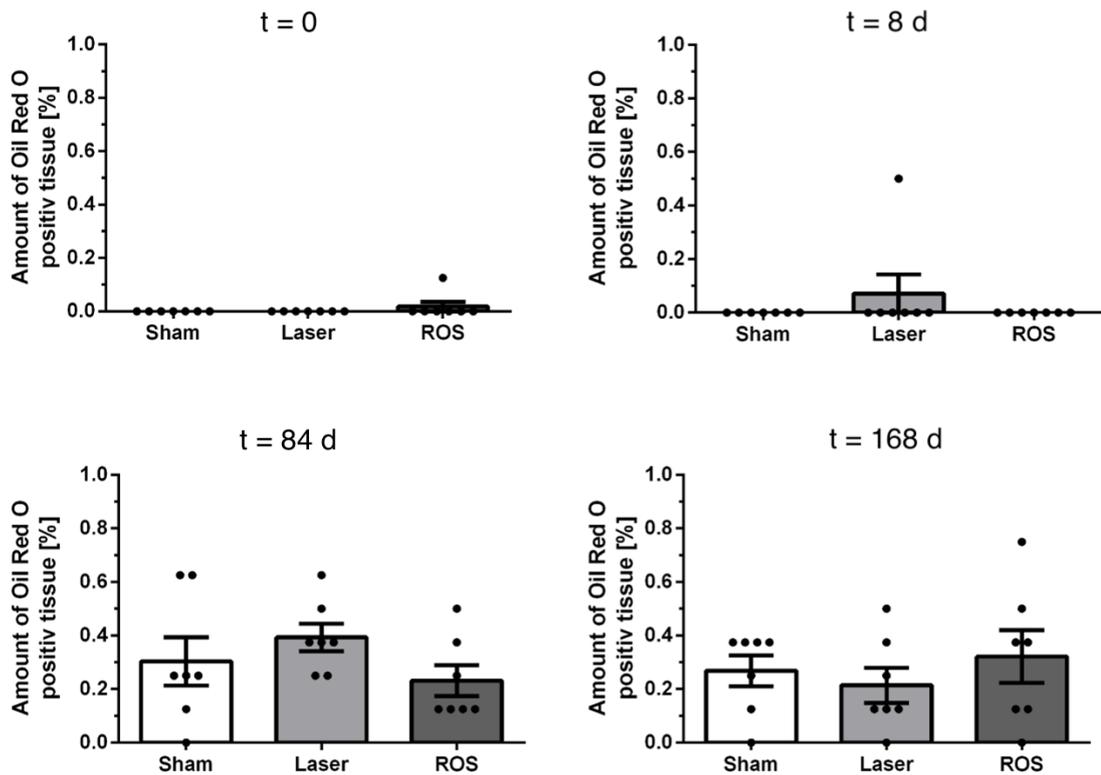
### 3.2 Nachweis von Lipidperoxidation

Mit der Oil Red O Färbung lassen sich Lipidperoxidationen nachweisen, die durch reaktive Sauerstoffspezies verursacht wurden. In der untenstehenden Abbildung sind die Sham-, Laser- und ROS-Gruppe in den Reihen zu den jeweiligen Explantationszeitpunkten einander gegenübergestellt.



**Abb. 11 - Oil Red O – Darstellung der Aortenklappentaschen**

Die ROS-Gruppe ist den beiden Kontrollgruppen (Sham und Laser) in den Reihen gegenübergestellt. Verglichen werden die Kohorten anhand der vier Explantationszeitpunkte: t = 0, t = 8 d, t = 84 d, t = 168d.



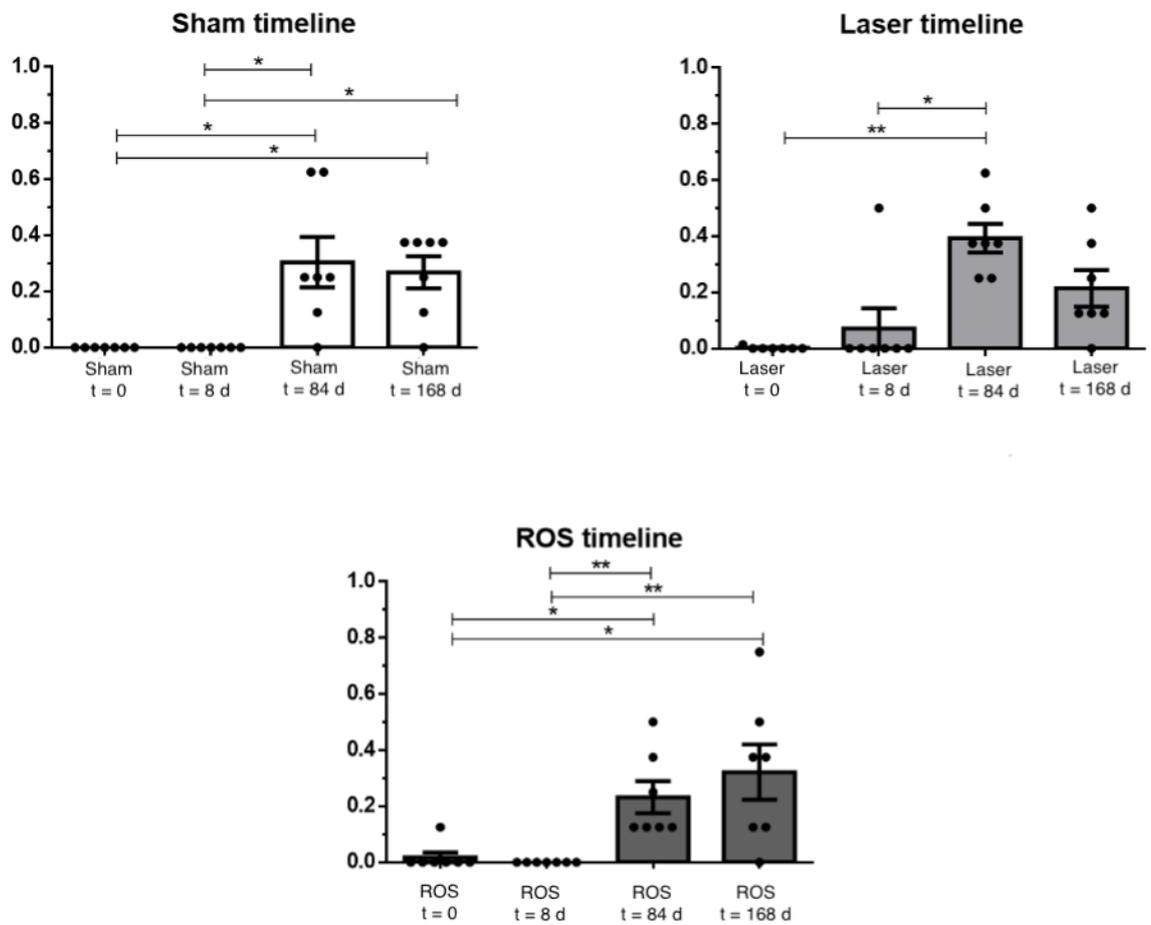
**Abb. 12 - Lipidperoxidation von Sham, Laser, ROS nach Explantationszeitpunkt**

Die Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgten mit dem *Kruskal-Wallis test*: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Abb. 11 vergleicht die drei Gruppen (Sham, Laser, ROS) zu den jeweiligen Explantationszeitpunkten miteinander. Zu keinem Zeitpunkt fanden sich signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen. Bis auf zwei Ausreißer ließen sich bei den Tieren keine Lipideinlagerungen um die Aortenklappentasche histologisch nachweisen. Die Tiere, die 84 und 168 Tage nach der Bestrahlung explantiert wurden zeigten in allen drei Gruppen vermehrte Lipideinlagerungen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Abb. 12 zeigt die vier Explantationszeitpunkte innerhalb einer Gruppe. Die Gruppen wurden einzeln untersucht und anhand der erfolgten Explantationen miteinander verglichen. In den Gruppen Sham und ROS zeigten sich signifikant vermehrte Lipidanreicherungen in den Tieren die 84 und 168 Tage nach Bestrahlung explantiert wurden, verglichen mit den Tieren, die sofort nach der Bestrahlung explantiert wurden ( $p \leq 0,05$ ). Auch zeigten sich Signifikanzen zwischen den acht Tage nach Bestrahlung explantierten Tieren und den nach 84 und 168 Tagen nach Bestrahlung explantierten Tieren. Diese Signifikanzen zeigten sich sowohl bei der Sham- ( $p \leq 0,05$ ), als auch bei der ROS-Gruppe ( $p \leq 0,01$ ). Bei den Tieren der Laser-Gruppe zeigten sich

Signifikanzen zwischen den früh explantierten Tieren (null und acht Tage) und den Tieren, die 84 Tage nach Bestrahlung explantiert wurden ( $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$ ).



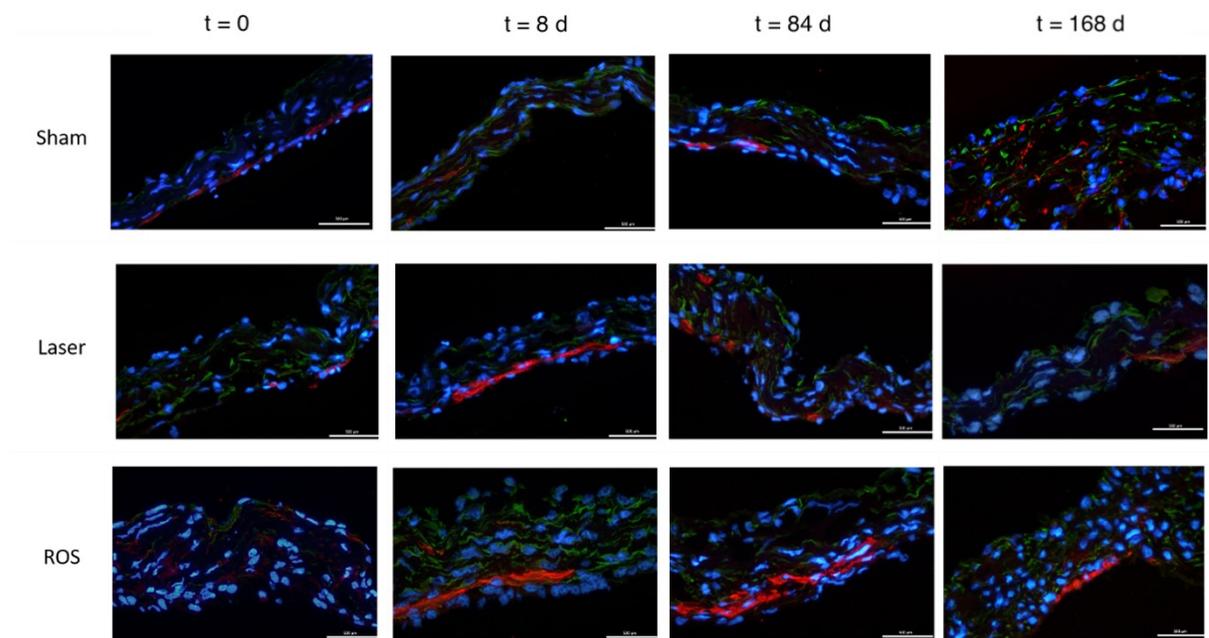
**Abb. 13 - Lipidperoxidation von Sham, Laser, ROS im zeitlichen Verlauf**

Die Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgten mit dem *Kruskal-Wallis test*: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

### 3.3 Auswirkungen auf VICs und mesenchymale Zellen

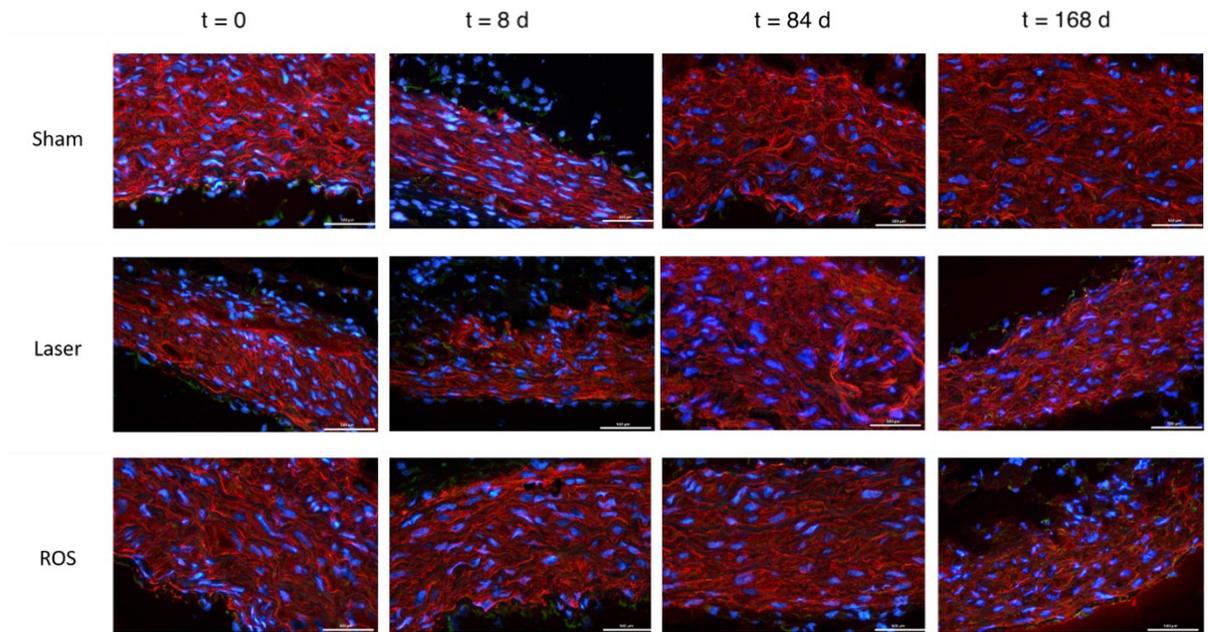
#### 3.3.1 Aktivierung von $\alpha$ -SMA

Die  $\alpha$ -SMA/Vimentin Färbung dient der Untersuchung von Glattmuskelzellen und Zellen mesenchymalen Ursprungs. Dargestellt sind repräsentative Zielregionen der Aortenklappen: Aortenklappentasche, Annulus-Region und Kommissur. Das  $\alpha$ -SMA/Vimentin-Signal war in den drei Regionen jeweils unterschiedlich stark vertreten. Die in 40-facher Vergrößerung aufgenommene Immunfluoreszenz zeigt das  $\alpha$ -SMA rot, das Vimentin als Marker für mesenchymale Zellen grün und die mit DAPI gegengefärbten Zellkerne blau.



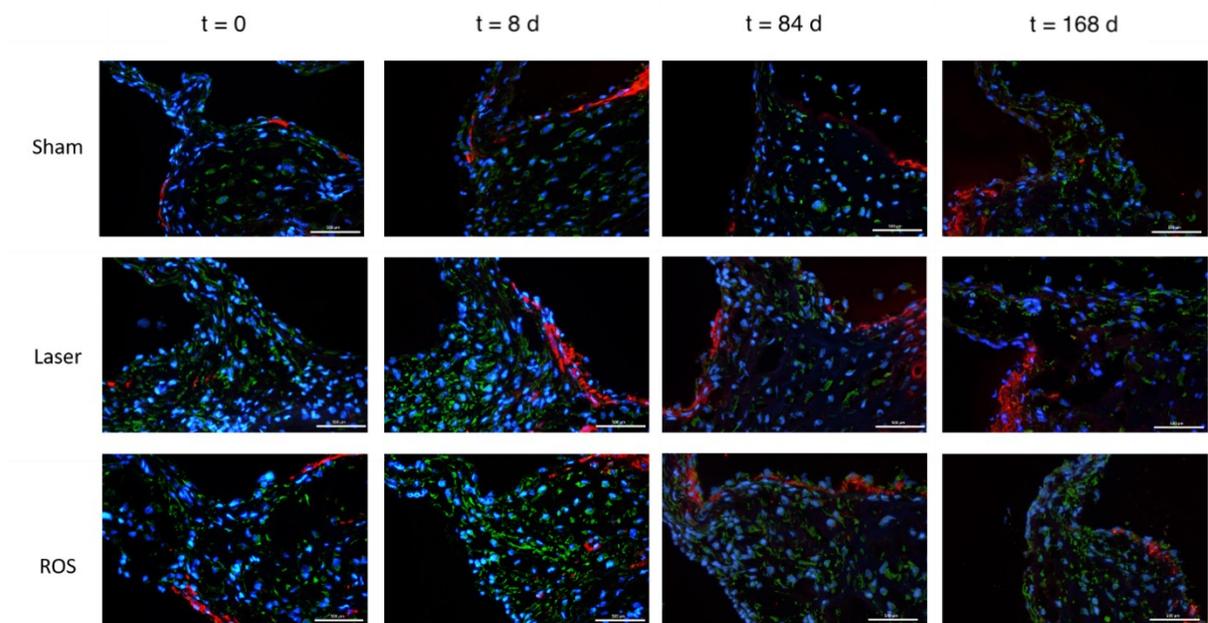
**Abb. 14 -  $\alpha$ -SMA/Vimentin-Färbung der Aortenklappentaschen**

Die ROS-Gruppe ist den beiden Kontrollgruppen (Sham und Laser) in den Reihen gegenübergestellt. Verglichen werden die Kohorten anhand der vier Explantationszeitpunkte:  $t_0$ ,  $t_8$ ,  $t_{84}$ ,  $t_{168}$ . Dargestellt sind jeweils die zentralen Regionen der Aortenklappentaschen der Gruppen Sham, Laser und ROS, die anhand der Explantationszeitpunkte einander gegenübergestellt wurden: rot =  $\alpha$ -SMA, grün = Vimentin, blau = Zellkerne.



**Abb. 15 - *a-SMA/Vimentin-Färbung der Annulus-Region***

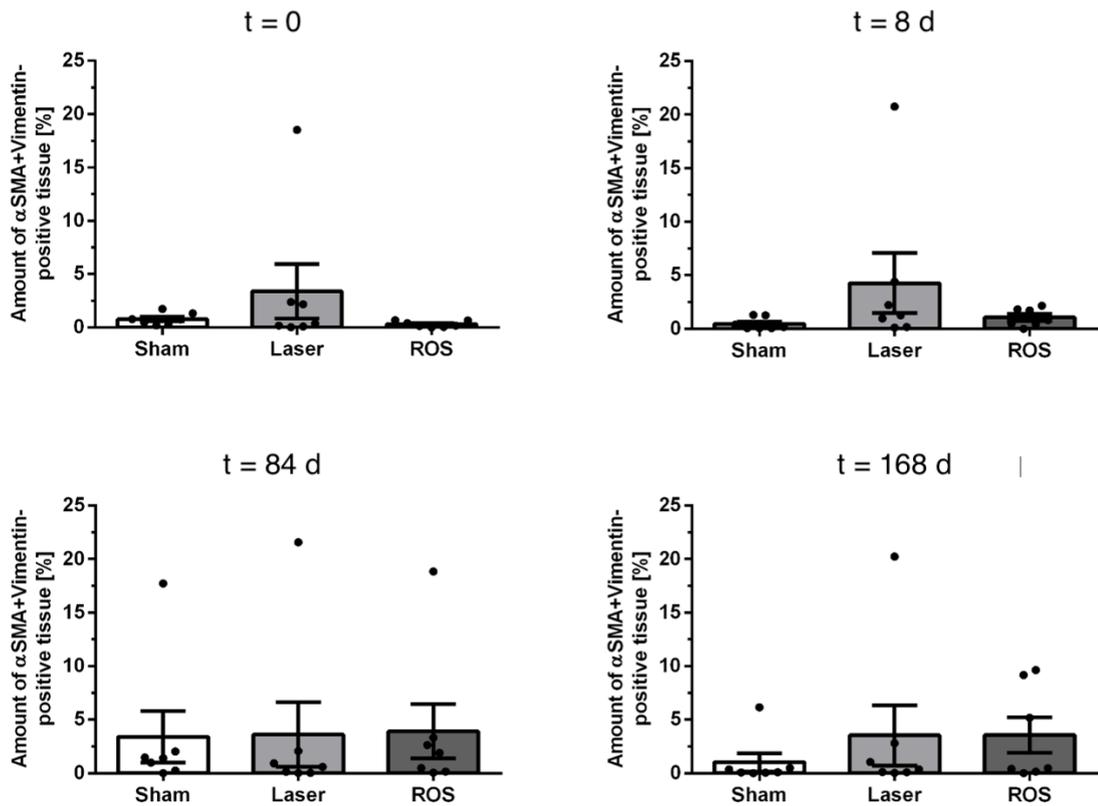
Die ROS-Gruppe ist den beiden Kontrollgruppen (Sham und Laser) in den Reihen gegenübergestellt. Verglichen werden die Kohorten anhand der vier Explantationszeitpunkte: t = 0, t = 8 d, t = 84 d, t = 168 d. Dargestellt sind jeweils die zentralen Regionen der Annulus-Region der Aortenklappe der Gruppen Sham, Laser und ROS, die anhand der Explantationszeitpunkte einander gegenübergestellt wurden: rot = a-SMA, grün = Vimentin, blau = Zellkerne.



### **Abbildung 16 - $\alpha$ -SMA/Vimentin-Färbung der Kommissuren**

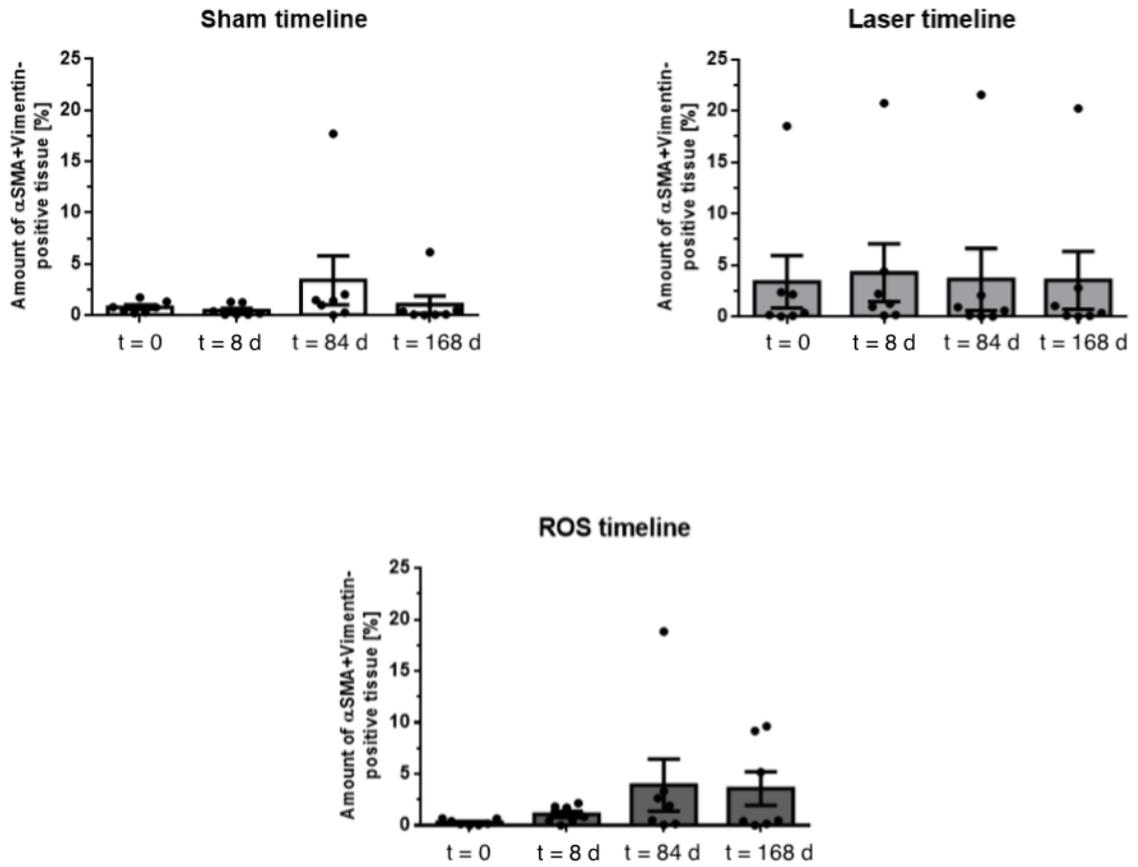
Die ROS-Gruppe ist den beiden Kontrollgruppen (Sham und Laser) in den Reihen gegenübergestellt. Verglichen werden die Kohorten anhand der vier Explantationszeitpunkte: t = 0, t = 8 d, t = 84 d, t = 168 d. Dargestellt sind jeweils die distalen Kommissuren der Aortenklappe der Gruppen Sham, Laser und ROS, die anhand der Explantationszeitpunkte einander gegenübergestellt wurden: rot =  $\alpha$ -SMA, grün = Vimentin, blau = Zellkerne.

Während die Annulus- und Kommissur-Regionen eine eher einheitliche Darstellung mit weitestgehend homogener Verteilung von  $\alpha$ -SMA und Vimentin zeigten, wurde hier auf eine weitere Analyse verzichtet. Die Bereiche der Aortenklappentaschen zeigten hingegen ein stets variables Bild der  $\alpha$ -SMA- und Vimentin-Anreicherung. Sowohl zwischen den Gruppen, als auch zwischen den Explantationszeitpunkten zeigten sich Unterschiede, weshalb die Aortenklappentaschen genauer analysiert und statistisch ausgewertet wurden. Abb. 16 zeigt die Gruppen Sham, Laser und ROS zu den unterschiedlichen Explantationszeitpunkten. Weder bei den früh explantierten (null und acht Tage nach Bestrahlung) noch bei den spät explantierten Tieren (84 und 168 Tage nach Bestrahlung) konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen und den Zeitpunkten nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil von aktivierten  $\alpha$ -SMA am gesamten  $\alpha$ -SMA zeigte keine signifikanten Differenzen. Auch innerhalb der einzelnen Gruppen konnte zwischen den Explantationszeitpunkten kein signifikanter Unterschied in der Aktivierung von  $\alpha$ -SMA festgestellt werden.



**Abb. 17 -  $\alpha$ -SMA/Vimentin – Anreicherung von Sham, Laser, ROS nach Explantationszeitpunkt**

Die Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgten mit dem *Kruskal-Wallis test*: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

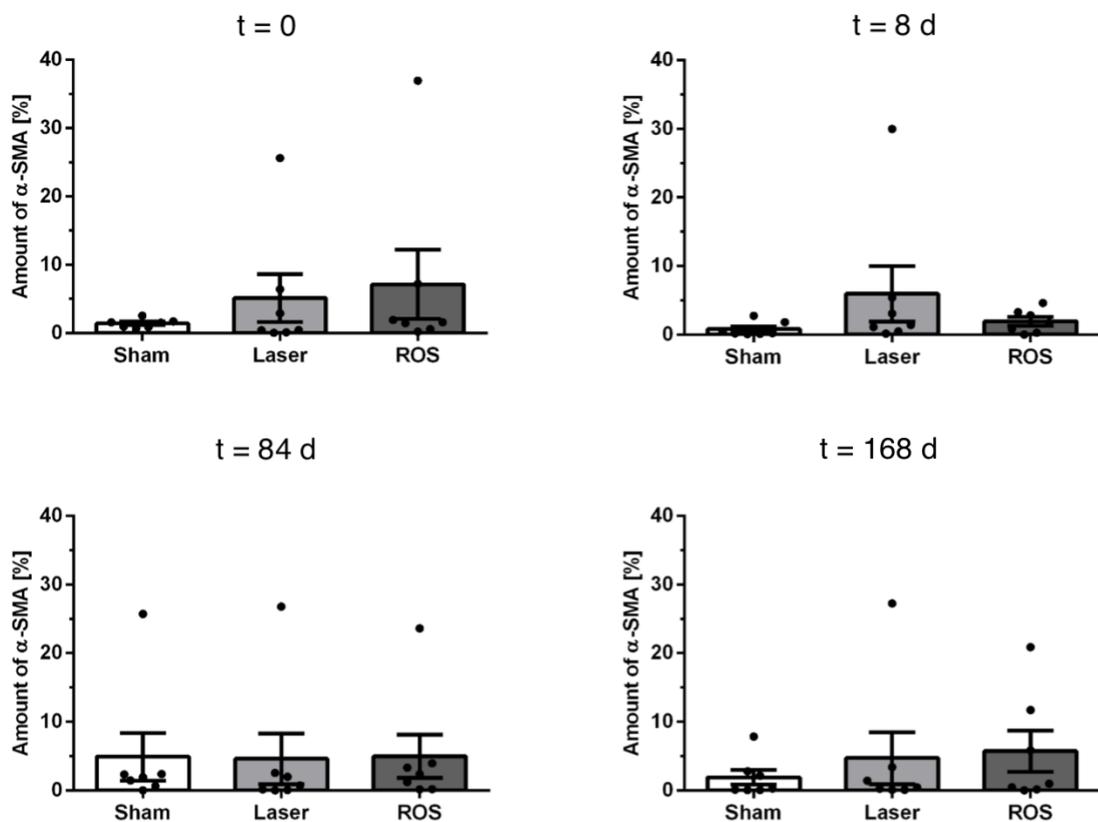


**Abb. 18 -  $\alpha$ -SMA/Vimentin – Anreicherung von Sham, Laser, ROS im zeitlichen Verlauf**

Die Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgten mit dem *Kruskal-Wallis test*: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

### 3.3.2 $\alpha$ -SMA

$\alpha$ -SMA ein fester Bestandteil des Zytoskeletts, der sich in aktivierten, nicht aber in ruhenden *VICs* findet. Diese Annahme folgend sollte ein erhöhter  $\alpha$ -SMA-Wert ebenfalls für eine erhöhte Aktivierung von  $\alpha$ -SMA sprechen. Da sich offensichtlich keine relevanten Differenzen ergaben, verzichteten wir auf eine genauere Analyse der Vimentin-Anreicherung zwischen den Tieren. Die Detektion  $\alpha$ -SMA in den unterschiedlichen Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den verschiedenen Explantationszeitpunkten (siehe Abb. 18). Auch zeigte sich in der Auswertung einer bestimmten Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Explantationszeitpunkten; hier verzichteten wir auf die Darstellung der Ergebnisse.

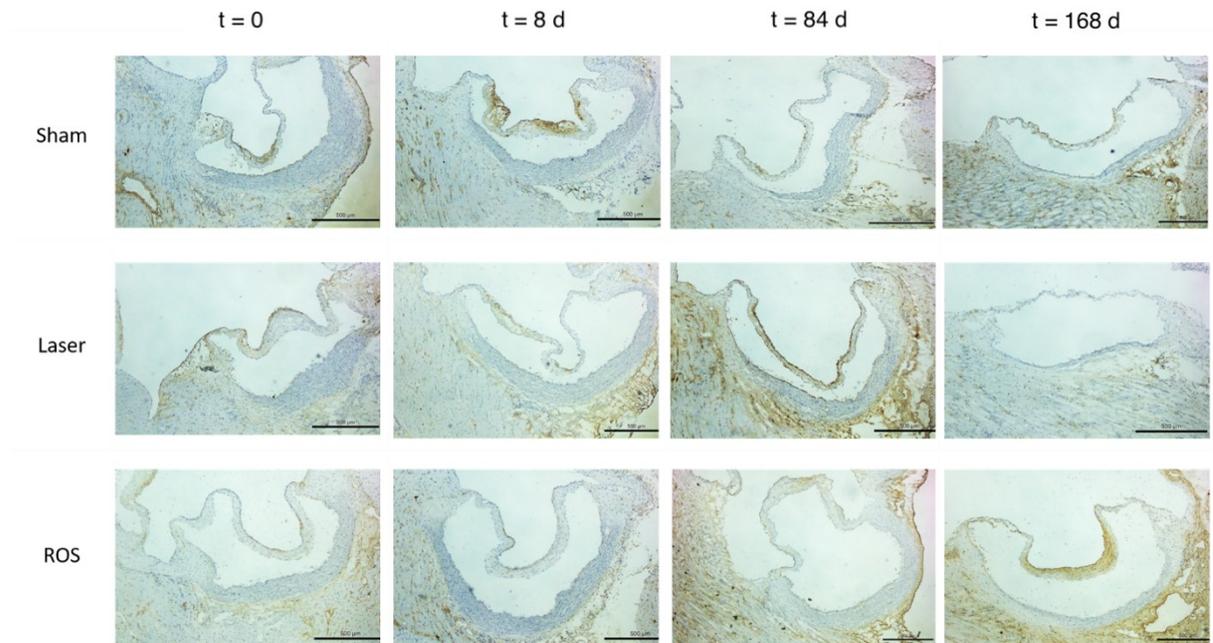


**Abb. 19 -  $\alpha$ -SMA – Anreicherung von Sham, Laser, ROS nach Explantationszeitpunkt**

Die Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgten mit dem *Kruskal-Wallis test*: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

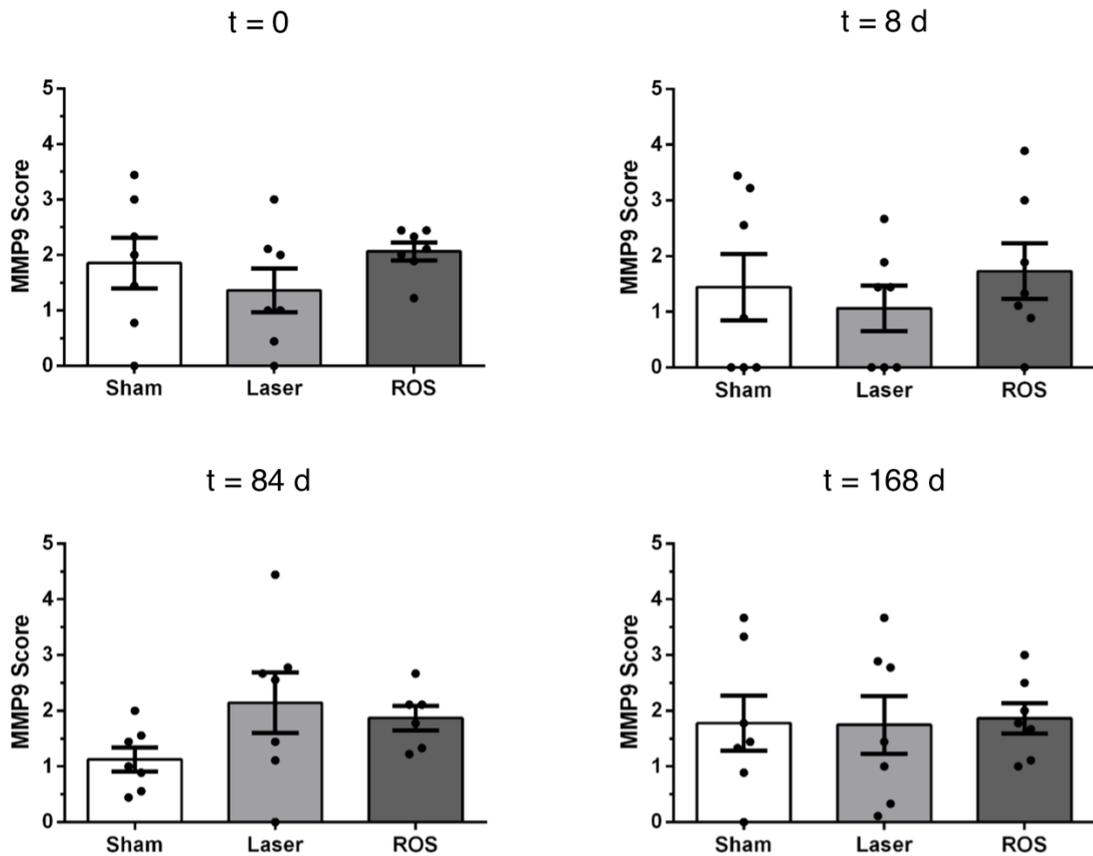
### 3.4 MMP 9

In der Annahme, dass ein erhöhter Nachweis der MMP 9 auf eine erfolgte Proliferation der EZM hinweist, untersuchten wir die Gruppen Sham, Laser und ROS zu den jeweiligen Explantationszeitpunkten. Das MMP 9-positive Signal wird in der histochemischen Übersicht (Abb. 19) braun dargestellt.



**Abb. 20 - MMP-9 – Darstellung der Aortenklappentaschen**

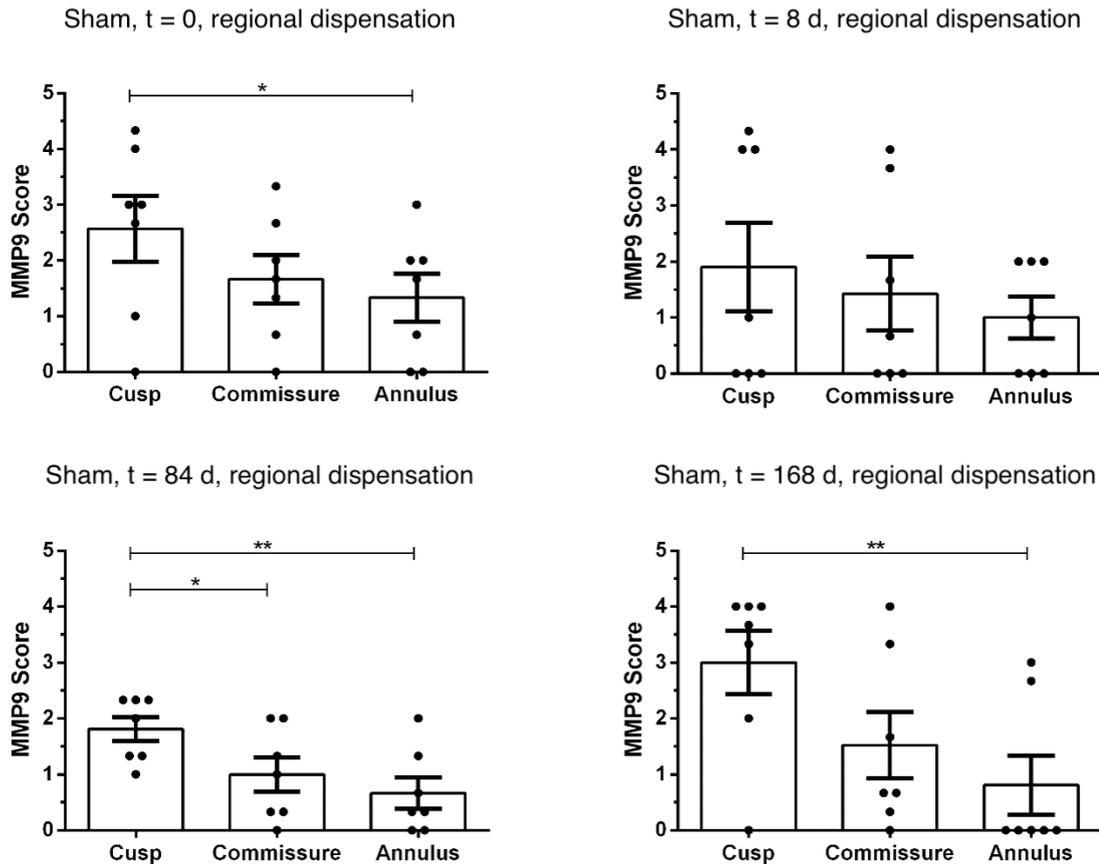
Die ROS-Gruppe ist den beiden Kontrollgruppen (Sham und Laser) in den Reihen gegenübergestellt. Verglichen werden die Kohorten anhand der vier Explantationszeitpunkte: t0, t8, t84, t168.



**Abb. 21 - MMP-9 – Anreicherung von Sham, Laser, ROS nach Explantationszeitpunkt**

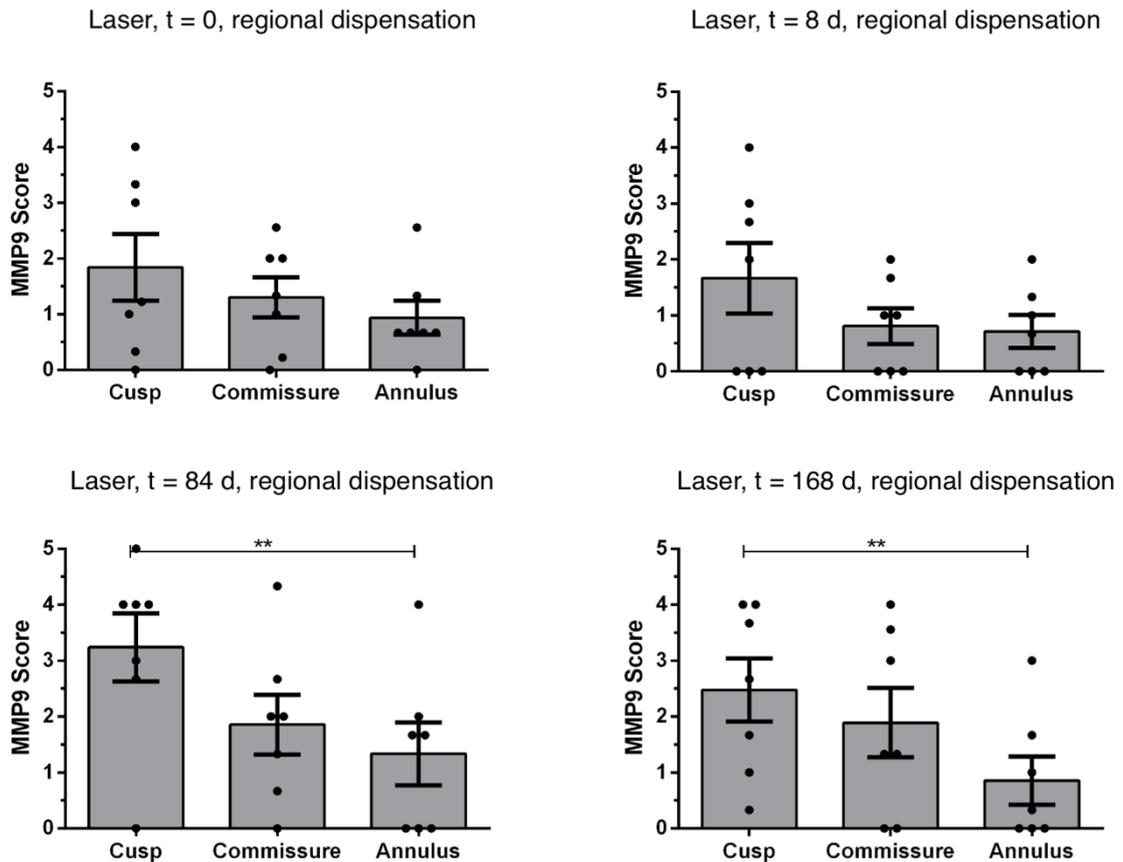
Untersucht wurden die explantierten Aortenklappen der Gruppen Sham, Laser und ROS. Unter Betrachtung des gesamten Klappengewebes wurden anhand des MMP 9-Scores Werte zwischen null und fünf vergeben. Die Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgten mit dem *Kruskal-Wallis test*: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Abb. 20 zeigt die statistische Auswertung des MMP 9-Scores der Gruppen Sham, Laser und ROS. Hier wurden das Vorhandensein und die Stärke des MMP 9-Signals in der gesamten Aortenklappe untersucht. Ein positives Signal konnte in allen drei Gruppen nachgewiesen werden. Signifikante Schwankungen in der Signalstärke zwischen der ROS- und den Kontrollgruppen konnten nicht nachgewiesen werden. Neben der Analyse der gesamten Klappenebene, wurden auch Regionen-spezifische Unterschiede in den Tieren untersucht (Abb. 21-23). Hierbei konzentrierten wir uns auf die Aortenklappentaschen, die Annulus-Region und die Kommissuren.



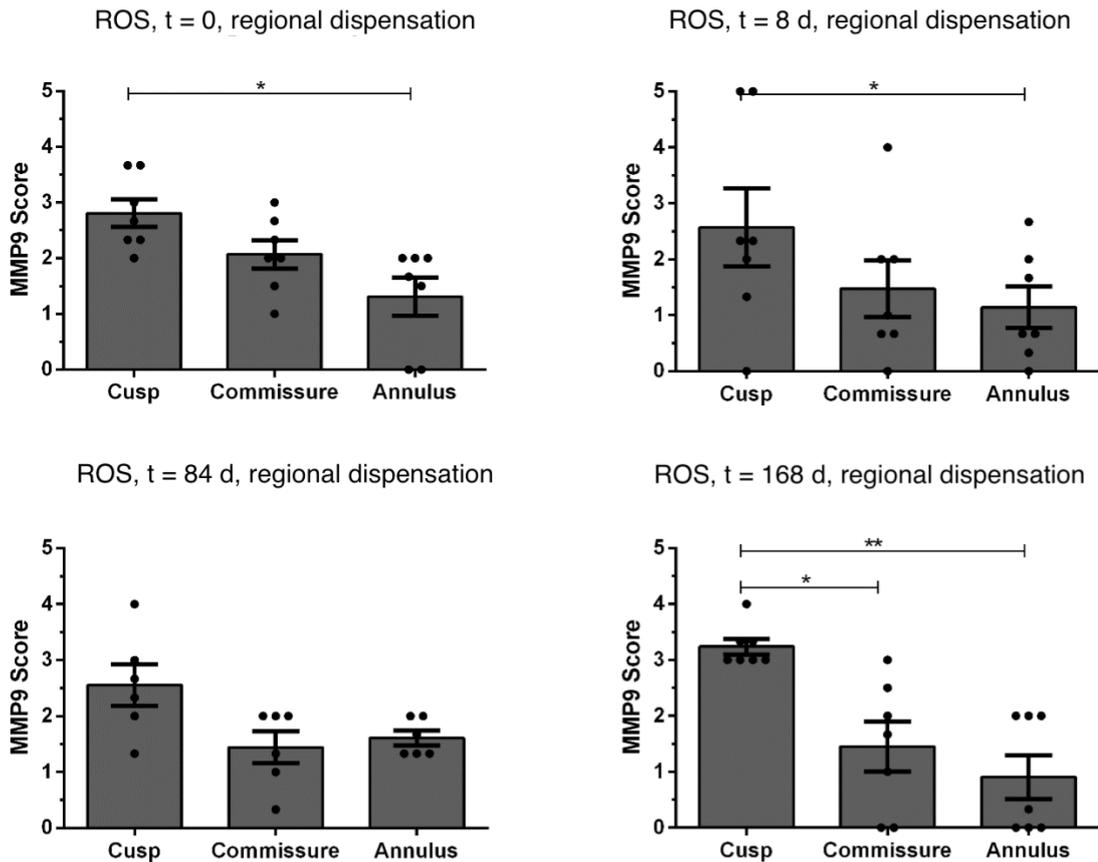
**Abb. 22 - MMP-9 – Regionen-spezifische Anreicherung innerhalb der Sham-Gruppe nach Explantationszeitpunkt**

Untersucht wurden die explantierten Aortenklappen der Sham-Gruppen. Betrachtet wurden die drei unterschiedlichen morphologischen Regionen von Aortenklappentasche, Anulus und Kommissur. Das detektierte MMP 9-Signal wurde anhand des MMP 9-Scores berechnet und mit Werten zwischen null und fünf versehen. Die Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgten mit dem *Friedman test*: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .



**Abb. 23 - MMP-9 – Regionen-spezifische Anreicherung innerhalb der Laser-Gruppe nach Explantationszeitpunkt**

Untersucht wurden die explantierten Aortenklappen der Laser-Gruppen. Betrachtet wurden die drei unterschiedlichen morphologischen Regionen von Aortenklappentasche, Anulus und Kommissur. Das detektierte MMP 9-Signal wurde anhand des MMP 9-Scores berechnet und mit Werten zwischen null und fünf versehen. Die Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgten mit dem *Friedman test*: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .



**Abb. 24 - MMP-9 – Regionen-spezifische Anreicherung innerhalb der ROS-Gruppe nach Explantationszeitpunkt**

Untersucht wurden die explantierten Aortenklappen der ROS-Gruppen. Betrachtet wurden die drei unterschiedlichen morphologischen Regionen von Aortenklappentasche, Anulus und Kommissur. Das detektierte MMP 9-Signal wurde anhand des MMP 9-Scores berechnet und mit Werten zwischen null und fünf versehen. Die Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgten mit dem *Friedman test*: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Die Auswertung der regionalen MMP 9-Verteilung innerhalb der Aortenklappe zeigte in der Sham-Gruppe (Abb. 21) eine gebietsweise unterschiedlich starke Anreicherung im Gewebe. Es zeigte sich eine vermehrte Anwesenheit von MMP 9 in den Aortenklappentaschen. Innerhalb der Sham-Gruppe konnte signifikant mehr MMP 9 in den Aortenklappentaschen, als in den Annulus-Regionen gezeigt werden. Diese Diskrepanz fand sich sowohl bei den Tieren, die sofort nach der Bestrahlung ( $t = 0$ ) explantiert wurden ( $p \leq 0,05$ ), als auch bei den Tieren, die nach 84 und nach 168 Tagen explantiert wurden ( $p \leq 0,01$ ). Ferner zeigte sich bei den 84 Tage nach Bestrahlung explantierten Tieren signifikant mehr MMP 9 in den Taschenregionen als in den Kommissuren ( $p \leq 0,05$ ).

In der Laser-Gruppe (Abb. 22) konnte ebenfalls eine regionale Verteilung des MMP 9-Signals festgestellt werden. So zeigte sich mehr MMP 9 in den Aortenklappentaschen, als in den Regionen des Anulus. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Regionen konnten bei den Tieren, die 84 Tage nach Bestrahlung explantiert wurden festgestellt werden ( $p \leq 0,01$ ), als auch bei den Tieren, die 168 Tage nach Bestrahlung explantiert wurden ( $p \leq 0,01$ ).

Analoge Verteilungsmuster von MMP 9 konnten auch innerhalb der ROS-Gruppe (Abb. 23) nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine signifikant stärkere Anreicherung von MMP 9 in den Aortenklappentaschen, als in den Anulus-Regionen der Tiere. Unterschiede konnten bei den Tieren festgestellt werden, die unmittelbar nach der Bestrahlung explantiert wurden ( $p \leq 0,05$ ) und bei den Tieren, die acht Tage ( $p \leq 0,05$ ). Und 168 Tage ( $p \leq 0,01$ ) nach der Bestrahlung explantiert wurden. Bei den nach 168 Tagen explantierten Tieren konnte überdies ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) zwischen den Taschen und den Kommissuren der Aortenklappe gezeigt werden.

#### 3.4.1 NT-proBNP-ELISA

Die Auswertung des *NT-proBNP-ELISA* erbrachte keine Anzeichen für eine verstärkte Sezernierung. Die detektierten Messwerte der einzelnen Plasmaproben lagen alle unterhalb des quantifizierbaren Bereiches. Weder im Vergleichen der einzelnen Gruppen, noch im Vergleich der einzelnen Tiere, konnten Schwankungen in der Dynamik des *NT-proBNP* beobachtet werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchung der *DAVD*

Die *DAVD* ist eine kardiovaskuläre Erkrankung, die mit morphologischen und funktionellen Veränderungen der Aortenklappe einhergeht [1]. Strukturelle Dysfunktionen und Inflammationsprozesse begünstigen das Auftreten valvulärer Verdickung, Versteifung und Kalzifizierung. Die veränderten Strukturen fördern die Entstehung der Aortenklappenstenose, die in diesem Kontext als klinische Manifestation der *DAVD* verstanden wird [1-4]. Unter den kardiovaskulären Erkrankungen nimmt die Aortenklappenstenose eine relevante pathoätiologische Rolle ein. Sie ist die häufigste valvuläre Pathologie, die ein therapeutisches Handeln notwendig macht [12-15]. Aufgrund der langen asymptomatischen Klinik, dem Stadium der Aortenklappensklerose, das durch unveränderten transvalvulären Gradienten gekennzeichnet ist, wird die manifeste, klinisch relevante Aortenklappenstenose häufig erst im therapiebedürftigen Stadium erkannt [48]. Therapeutische Optionen, wie die Ballon Valvuloplastie und der interventionelle oder chirurgische Klappenersatz mit mechanischem oder biologischem Material, sind die gängigen Verfahren, die ein Überleben der Patienten erzielen können [48]. Bisherige Untersuchungsformen des Schweregrades der Aortenklappenstenose beschränken sich überwiegend auf nicht-invasive echokardiographische Untersuchungen und kathetergestützte Verfahren [48].

Derzeitige Prognosen zur Aortenklappenstenose schätzen, dass die Anzahl der Krankheitsfälle in der westlichen Welt weiterhin zunimmt [12]. Das erforderliche Verständnis früher pathologischer Abläufe, wird besonders in Bezug auf die steigende Notwendigkeit von Früherkennung und Prävention, immer relevanter. Untersuchungen der Induktion und Progression *DAVD*-assoziierter Risikofaktoren, stellen einen Großteil derzeit ablaufender Forschungsprojekte dar. [180] In den vergangenen Jahren konnte der oxidative Stress als beteiligter Pathogenitätsfaktor im Krankheitsmodell der *DAVD* nachgewiesen werden [7, 8, 10, 123, 180]. Wie genau sich freie Sauerstoffradikale im Progress der *DAVD* in vivo verhalten und welchen Stellenwert sie diesem polypathologischen Krankheitskonzept einnehmen, ist noch nicht endgültig geklärt.

### 4.2 Etablierung eines Tiermodells – Induktion der *DAVD*

#### 4.2.1 Mensch und Ratte – Beschränkung der Anatomie

In unserer Arbeit verwendeten wir ein neuartiges Tiermodell zur Induktion von oxidativem Stress über der Aortenklappe, um so isolierte Effekte von ROS in vivo zu untersuchen. In männlichen Wistar Ratten generierten wir durch die Kombination des Photosensibilisators Temoporfin mit einem Rotlicht Laser, eine PDR. Die Nutzung einer, intraoperativ über der Aortenklappe eingebrachten, Laserfaser ermöglichte die lokale Freisetzung von molekular hochreaktivem

Singulett Sauerstoff im Zielgewebe. Diese lokale ROS-Induktion nutzten wir zur Detektion von EZM-Remodellingprozessen und intravalvulären Zellreaktionen der Aortenklappe. Unsere Untersuchungen dienen dem Ziel pathologische Mechanismen von oxidativem Stress im Erkrankungsbild der *DAVD* zu erfassen und dessen Rolle als Risikofaktor genauer zu betrachten.

Ein problematischer Aspekt bei der Etablierung eines geeigneten Tiermodells ist die Diversität der Organismen. Die kardiale Anatomie von Menschen lässt sich nicht exakt mit der Anatomie von Nagetieren gleichsetzen. Das Herzskelett, die stabilisierende bindegewebige Befestigung der einzelnen Herzklappen, ist im menschlichen Körper durchgängig angeordnet. Bei Nagetieren ist es dagegen inkonstant ausgeprägt und bildet, im Vergleich zum humanen Herzen, kein einheitliches Herzskelett mit fibrösem Bindegewebe [181]. Neben rein anatomischen Unterschieden, gibt es auch funktionelle Differenzen zu beachten. Untersuchungen an Mäusen implizieren, dass deren Aortenklappen keine altersbedingte Degeneration ausbilden [182]. Auch ein erhöhter Melanozytengehalt, wie er in Mäuseherzen zu finden ist, könnte histomorphologisch als Kalziumakkumulationen fehlgedeutet werden, und eine fortgeschrittene *DAVD* simulieren [182]. Anatomisch ist die Herzklappe von Mäusen weniger konstant dreischichtig aufgebaut als die menschliche und weist ferner ein längeres Wachstum auf [182]. Auch bei Ratten ist die Klappenstruktur im Vergleich zum Menschen weniger gut abgrenzbar [181]. Die eher konfluierende Anordnung der einzelnen Klappentaschen unterscheidet sich von der charakteristischen Dreiteilung der humanen Aortenklappe [181]. Die Herzklappenbasis von Ratten ist stärker mit Bindegewebe durchsetzt und nimmt mit zunehmendem Alter an Dicke zu [181]. Innerhalb des Bindegewebes lassen sich vereinzelt ossäre Strukturen (Knochen und Knorpel) und inflammatorische Zellen wie Leukozyten nachweisen [181]. Der histologische dreischichtige Zellaufbau menschlicher Herzklappen zeichnet sich durch die Anordnung aus Fibrosa, Spongiosa und Ventrikularis aus [17]. Dieser streng dreischichtige Aufbau ist in Nagetieren nicht zu beobachten. Es zeigen sich Areale aus dichtem fibrösem Bindegewebe, die der humanen Fibrosa entsprechen [181]. Locker angeordnete Kollagenfasern und proteoglykanhaltige EZM zeigen Parallelen zur menschlichen Spongiosa [181]. Die Lamina Ventrikularis lässt sich histomorphologisch allerdings nicht als eigenständige Schicht darstellen [181]. Diese anatomischen Besonderheiten erschweren die Kryoschnittführung [181]. Besonders die locker angelegte Spongiosa stellt eine exponierte Struktur dar [181]. Angeschnittene Bereiche können in ihrer Schnittdicke differieren und zu Abweichungen der eigentlichen Anatomie führen [181]. Verdickte oder verdünnte Bereiche der Aortenklappe, die das morphologische Korrelat einer Pathologie darstellen, können dadurch ungenau in der histologischen Abbildung dargestellt werden. In der von uns angewandten Gefrierschnitttechnik, wurden 5 µm dicke Schnitte der Aortenklappen angefertigt. Dies erlaubte uns adäquat geschichtete Abbildungen des Gewebes zu generieren, ohne durch zu dicke Darstellungen eine Zellüberlagerung hervorzurufen. Aufgrund

der kleinen und von humanem Gewebe abweichenden Anatomie, kann jedoch auch bei ordnungsgemäßer Handhabung ein unbeabsichtigtes Variieren der einzelnen Gefrierschnitte nicht ausgeschlossen werden.

## 4.2.2 Frühere Modelle

Die degenerative Aortenklappenstenose ist eine klinische Manifestation pathologischer Prozesse der Aortenklappe, wie sie im Rahmen der *DAVD* auftreten [2, 183]. Die Notwendigkeit von Tierversuchen wächst mit dem Verständnis um die entsprechende Pathologie. *In vivo* Versuche ermöglichen ein umfangreicheres Verständnis der Initiation und Progression von Krankheiten. Viele Tierversuche, die sich mit Aortenklappendegeneration auseinandergesetzt haben, nutzten genetische Untersuchungen, unterschiedliche Diät-Applikationen oder mechanische Verletzungen der valvulären Zellintegrität, um *DAVD*-assoziierte Risikofaktoren weiter zu erforschen [184, 185]. Diese sollen im Folgenden diskutiert werden.

### 4.2.2.1 Die lipidgestützte *DAVD*-Induktion – Diät und Knockout

In *LDL*-Rezeptor-Knockout-Mäusen mit erhaltenem Apolipoprotein B (*LDL* *-/-* ApoB 100/100) konnten Kalzifizierungen der Aortenklappe und erhöhter oxidativer Stress bei bestehender Aortenklappenstenose nachgewiesen werden [9]. Die Zufuhr fettreicher Nahrung bei *LDL*-defizienten Mäusen (*LDL* *-/-*) führt zu Hyperlipidämie mit Anstieg atherogener Lipoproteine [186]. In ihrem Modell konnten Towler et al. bei den Tieren Mineralisierungen der Aortenklappen und erhöhte Osteopontin-Werte als Folge der gesteigerten Fettzufuhr feststellen [186]. Der Knockout von Periostin, einem Protein der Kardiogenese, führt bei Mäusen zu bikuspid-ähnlichen Klappendeformitäten mit Kalziumablagerungen und aortaler Regurgitation [187]. In einem Kaninchenmodell konnten Marechaux et al. degenerative Veränderungen der Aortenklappe als Folge einer fettreichen Diät mit und ohne Vitamin D-Zusatz detektieren [188]. Die Tiere zeigten verdickte Aortenklappen, mit vermehrten Mineralisationsprozessen, Kalziumablagerungen, Lipidanreicherungen, Makrophageninfiltrationen und Myofibroblasten-Aktivierung [188]. *In vivo*-Untersuchungen mit genetischem Knockout erlauben Aussagen über Risikofaktoren von Erkrankungen zu treffen. Für die *DAVD* konnte besonders die Beteiligung von Lipoproteinen aufgezeigt werden [9, 186, 188]. Lipidinfiltation und -akkumulation, als wichtige Faktoren im degenerativen Prozess, konnten durch zielgerichtete genetische Ausschaltung, wie auch durch lipidhaltige Nahrungsmittel erkannt werden. Dadurch ließen sich Rückschlüsse auf risikoreiche Ernährungsgewohnheiten und genetische Veranlagung und familiäre Vorbelastungen im Zusammenspiel mit der *DAVD* ziehen [4].

In unserem Modell einer PDR-unterstützten *ROS*-Induktion, erhielten die Tiere Futter, in Form von Standard-Pellets, 2 % Cholesterin und 1,5 % Phosphat. Dadurch generierten wir einen zusätzlichen prodegenerativen Effekt auf die Aortenklappe. Assmann et al. untersuchten an

Ratten die prodegenerativen Einflüsse unterschiedlicher Diätapplikationen auf die Entstehung einer *DAVD* [189]. Sie zeigten, dass bereits Nahrungszuführen von 1 % Cholesterin und 0,75 % Phosphat (*low-dose*-Diät) einen prodegenerativen metabolischen Effekt auf die Tiere hatten [189]. Die von uns zugeführte *high-dose*-Diätapplikation diente der additiven Erzeugung einer Degeneration mit supportivem Effekt auf die Entstehung einer *DAVD*. Sowohl in der Movat Pentachrom-, als auch in der Oil Red O-Färbung konnte kein zusätzlicher Effekt durch die fettreiche Ernährung beobachtet werden. Ein Unterschied zu der Diätapplikation von Assmann und Kollegen besteht in der Zufuhr von Vitamin D [189]. Unsere Tiere erhielten kein zusätzliches Vitamin D über die Nahrung verabreicht.

#### 4.2.2.1.1 Die Rolle von Vitamin D in der fettreichen Ernährung

Die Bedeutung von Vitamin D in der Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten ist nicht abschließend geklärt. Im Folgenden sollen einige Studien zu prodegenerativen Effekten von Vitamin D, denen mit mutmaßlich kardioprotektiver Wirkung gegenübergestellt werden.

Mehrere Studien konnten eine Beteiligung von Vitamin D im Prozess degenerativer kardiovaskulärer Erkrankungen aufzeigen [188-191]. Studien von Drolet et al. befassten sich mit der Hyperlipidämie als gemeinsamen Risikofaktor für Atherosklerose und Aortenklappenstenose [190]. Die in ihren Experimenten verwendeten Kaninchen erhielten eine fettreiche Diät mit Vitamin D<sub>2</sub>-Zusatz [190]. Echokardiographisch konnten Verdickungen der Aortenklappen mit reduzierter systolischer Bewegung nachgewiesen werden [190]. Das Vitamin D wurde genutzt, um die Prozesse von Degeneration und Kalzifizierung, durch Integritätsstörungen der arteriellen Gefäßwände und Induktion von Glattmuskelzellnekrosen mit erhöhter Lipideinlagerung, zu beschleunigen [190, 192]. Untersuchungen von Ngo et al. zeigten an Kaninchen, eine Korrelation von Vitamin D und der Ausprägung einer Aortenklappenstenose [191]. Die Tiere erhielten für eine Dauer von acht Wochen eine zusatzfreie Nahrung, mit separater Vitamin D<sub>2</sub>-Substitution [191]. Die Tiere zeigten signifikante Zeichen einer Aortenklappenstenose [191]. Neben erhöhten transversalen Flussgeschwindigkeiten und Druckgradienten, konnten auch vermehrt oxidativer Stress und Beeinträchtigungen der *NO*-Freisetzung gezeigt werden [191]. Anhand der Studienergebnisse kann angenommen werden, dass additiv zugeführtes Vitamin D, bei schon applizierter fettreicher Nahrung die Entstehung einer *DAVD* weiter unterstützt.

Andererseits gibt es diverse Studien, die einen kardioprotektiven Effekt von Vitamin D aufzeigen [193-201]. *In vitro* Studien zeigten einen positiven Effekt von Vitamin D und dem Vitamin D Rezeptor (VDR) auf die Stickstoffmonoxid-Produktion endothelialer Zellen [202] und implizieren damit einen protektiven Effekt auf vaskulären, aber auch valvulären endothelialen Strukturerhalt. Mäuse, die vor stattgehabtem Myokardinfarkt, eine Vitamin D-Applikation erhielten, zeigten kleinere Infarzierungsareale und eine geringere Expressierung natriuretischer

Peptide der Herzwand [195]. Auch konnten postinfarktär, geringere Proteinwerte des VDR festgestellt werden [195]. In VDR-Knockout-Mäusen mit Myokardinfarkt, konnten im Vergleich zu Kontrollgruppen, vermehrt Apoptose, Fibrose, Inflammation und erhöhte Expression herzspezifischer Biomarker beobachtet werden [195]. Studien von Wang et al. zeigten positive Effekte von Vitamin D<sub>3</sub> auf die kardiale Hypertrophie, Fibrose und die Produktion von oxidativem Stress [198]. Eren et al. untersuchten 56 Patienten mit Herzerkrankungen, die durch valvuläre Regurgitation bedingt waren. Sie erforschten die Rolle von oxidativem Stress und Vitamin D in der Pathogenese degenerativer Herzklappenerkrankungen [199]. Die Patienten zeigten signifikant erhöhten oxidativen Stress und deutlich verminderte Vitamin D-Werte [199].

Die umstrittene Studienlage zum Einfluss von Vitamin D auf kardiale Strukturen wie die Aortenklappe, erlaubt keine eindeutige Schlussfolgerung zu den potentiell protektiven oder degenerativen Eigenschaften von Vitamin D. Es gilt allerdings zu beachten, dass viele Studien zu protektiven Vitamin D-Effekten, ihre Schlussfolgerungen auf der Basis bestehender Erkrankungen gezogen haben [195-198, 201]. Besonders Erkrankungen des Herzens, erhöhen die Wahrscheinlichkeit der physischen Aktivitätsreduktion, die mit verminderter Sonnenexposition und folglich mit geringerer Vitamin D-Synthese einhergehen können [196]. Auch zeigen kardiovaskulärer Risikofaktoren wie das hohe Lebensalter, das Übergewicht, der Nikotinabusus und Inaktivität, einen Einfluss auf verminderte Vitamin D-Werte [196, 203, 204], die somit im Rahmen bestehender Erkrankungen zwar erniedrigt sind, zu diesen aber keinen primär kausalen Zusammenhang aufweisen [196]. Beveridge et al. diskutierten ferner die Möglichkeit, dass aufgrund unbekannter oder unzureichend verstandener biologischer Prozesse, der Einfluss von Vitamin D auf kardiovaskuläre Pathologien, falsch interpretiert worden sein kann [196]. Untersuchungen von Reid et al. an knieoperierten Patienten, zeigten ebenfalls verminderte Vitamin D-Spiegel [205]. Die Autoren der Studie konkludierten, dass erniedrigte Vitamin D-Plasmakonzentrationen, ein Effekt unspezifischer inflammatorischer Prozesse zu sein scheinen, und daher keine verlässliche Messmethode darstellen [205].

Wir nutzten keinen Nachweis von Vitamin D in unserem ROS-Tiermodell. Aufgrund der aufgeführten Schlussfolgerungen, wäre eine solche Detektion vermutlich wenig aussagekräftig und hätte daher keine Konsequenz auf die Evaluation unserer Ergebnisse. Gleichzeitig betrachten wir, unter Einbeziehung und Einschätzung der aktuellen Studienlage, die möglichen kardioprotektiven Effekte von Vitamin D als unzureichend erforscht, um valide Aussagen darüber treffen zu können. Da wir uns in unseren Untersuchungen auf die ROS-induzierte *DAVD* fokussiert haben, hätte die zusätzliche Gabe von Vitamin D, vermutlich als *Confounder*, Einfluss auf unsere Ergebnisse genommen. Unter Annahme einer kardioprotektiven Wirkung, hätte Vitamin D die Effekte des oxidativen Stresses auf die Aortenklappe zu stark reduzieren können. Den diskutierten prodegenerativen Effekt von Vitamin D berücksichtigend, hätte zusätzlich zur

fettreichen Ernährung verabreichtes Vitamin D, eine Degeneration der Aortenklappe zu stark begünstigen und folglich die Untersuchung von oxidativen Stress als eigenen Risikofaktor beeinflussen können.

#### 4.2.2.2 Die mechanische *DAVD*-Induktion

Unsere Untersuchungen der *DAVD* fokussierten sich auf den oxidativen Stress als Risikofaktor. Hierbei explorierten wir unter anderem die *ROS*-assoziierte *VIC*-Aktivierung, Lipidperoxidation und MMP 9-Expression, als Zeichen von Umbau- und Proliferationsprozessen der EZM. Neben *ROS*, gibt es zahlreiche weitere Risikofaktoren. Die *DAVD* kann als Produkt aus Inflammation, Neovaskularisierung, Nekrose, EZM-Remodelling, Lipidinvasion und Kalzifizierung der Aortenklappe, verstanden werden [206]. Die dabei auftretende *VIC*-Aktivierung ist maßgeblich in den „*response to injury*“- Prozess involviert [35, 206], in dem die endotheliale Integrität der valvulären Zellschichten verloren geht.

Die Untersuchung valvulärer Heilungsprozesse nach mechanischer Schädigung ist ein häufig angewandtes Verfahren zur Untersuchung des zellulären Verhaltens auf endotheliale Schädigung [35, 185, 207]. Erste Untersuchungen der Reendothelialisierung explorierten das Zellverhalten, durch *in vitro* erzeugte mechanische Zellschädigungen [207]. Hierbei wurden Wundverschlüsse beobachtet, die durch konfluierende Zellmigrationen und -elongationen bewirkt wurden [35, 207]. Honda und seine Arbeitsgruppe überführten den Gedanken der mechanischen Schädigung in ein *in vivo* Modell [185]. In einem Kleintiermodell induzierten diese mit einem Federführungsdraht Schäden des valvulären Endothels [185]. Unter echokardiographischer Kontrolle führten sie den Draht über die Arteria carotis communis, in den linken Ventrikel männlicher Mäuse ein. Durch longitudinale Bewegungen des Drahtes in der Aortenklappe wurde eine mechanische Schädigung der valvulären Endothelschicht hervorgerufen [185]. Die mechanische Schädigung führte klinisch zu hämodynamischen Stenosen, mit histologisch sichtbaren Thrombosen, EZM-Destruktionen und osteochondrogenen Zelldifferenzierungen mit Kalziumablagerungen in den Aortenklappen [185]. Auch zeigten sich eine vermehrte Superoxid Produktion und erhöhte p-22phox Expressionen als Zeichen einer gesteigerten NADPH Oxidase-Aktivität [185]. Niepmann et al. verfeinerten die Methode der Draht-induzierten Aortenklappenstenose [208]. Sie beobachteten ebenfalls eine zunehmende aortale Klappendicke, mit Fibrosierung, Makrophageninfiltrationen und Kalziumablagerungen [208].

Die Modelle zeigen, dass die aktive Verletzung endothelialer Strukturen der Aortenklappe, eine signifikante Aortenklappenstenose induziert. Sie sind daher sehr sinnvoll, für das primäre pathogenetische Verständnis degenerativer Prozesse und zellulären Verhaltens. Ein Problem der Studien liegt jedoch in der unphysiologischen Erzeugung der valvulären Verletzungen. Mechanischer Stress, wie er als Risikofaktor der *DAVD* betrachtet wird, ist ein Resultat

hämodynamischer Scherkräfte und lange andauernder Mikroläsionen der Endothelschicht [11, 30]. Die einmalige intensive und massive Schädigung des valvulären Endothels, stellt die Maximalform einer Verletzung durch mechanisch einwirkende Kräfte dar, deren Erzeugung das Maß eines pathologisch-degenerativen Geschehen übersteigt. Die in unserem Modell erfolgte *ROS*-Induktion sollte daher einem eher kontrollierten Eingriff entsprechen. Um die Effekte lokaler *ROS*-Freisetzung in einem möglichst isoliert nachvollziehen zu können, nutzten wir eine kurze Bestrahlungsdauer zur Induktion der PDR. Die daraufhin freigesetzten Sauerstoffradikale, wurden auf ihren pathologischen Effekt im Langzeitgeschehen untersucht.

#### 4.2.2.3 Induktion von oxidativem Stress

Oxidativer Stress ist ein relevanter Risikofaktor der *DAVD* [6-10]. Das Ungleichgewicht zwischen *ROS* und Antioxidanzien, zugunsten der oxidativen Agenzien, führt zu Gewebsschädigungen im Körper [84]. *ROS* sind ubiquitär im Körper vorhanden und daher auch in die pathologischen Prozesse vieler Krankheiten integriert [209]. Wie genau sich *ROS* im pathogenetischen Zusammenspiel der *DAVD* verhalten und dadurch initiierte Prozesse die Degeneration von Aortenklappen vorantreiben, ist noch nicht abschließend geklärt [28]. Um die Rolle der *ROS* genau zu verstehen ist es nötig, ihre isolierte Beteiligung am Krankheitsprozess zu untersuchen. Dies erfordert ein Modell, in dem oxidativer Stress als alleiniger pathogener Faktor freigesetzt und unabhängig von anderen potentiellen Risikofaktoren beobachtet werden kann.

Frühere Studien untersuchten oxidativen Stress *in vitro* und *in vivo*. *In vitro* können oxidative Agenzien einem Gewebe zugefügt und die beobachteten Ergebnisse evaluiert werden. Shiva Shankar Reddy et al. untersuchten die *ROS*-induzierter oxidative Schädigung von Biomembranen [210]. In einem *in vitro* Modell führten sie oxidative Agenzien einer zentrifugierten Erythrozytensuspension zu [210]. Der induzierte oxidative Stress führte zu Hämolyse, Beeinträchtigung der Osmose, Lipidperoxidation und Proteinoxidation [210]. Die Arbeitsgruppe um Li oxidierte isoliertes humanes *LDL* mit Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) und inkubierte damit porkine aortale *VICs* [135]. Sie zeigten eine Beteiligung von *ROS* an der osteoblastischen *VIC*-Differenzierung [135]. Die *in vitro* Beurteilung von oxidativem Stress, kann dessen *ROS*-Einfluss auf bestimmte Strukturen zeigen. Wie sich *ROS* im mehrdimensionalen Konstrukt eines Organismus verhalten, lässt sich damit allerdings nicht beantworten. Die Einführung eines geeigneten *in vivo* Modells ist somit unerlässlich, wenn es darum geht, die Rolle von oxidativem Stress im multimodalen Setting zu verstehen. *In vivo* Studien an Ratten führten oxidativen Stress über intermittierende hypobare Hypoxie zu [211, 212]. Antioxidativer Systeme wie die SOD und die Katalase wurden vermehrt nachgewiesen, zeigten aber keinen relevanten Schutz gegen den induzierten oxidativen Stress [211]. Mit diesem Modell konnte oxidativer Stress nachhaltig produziert werden, eine lokalisierte Freisetzung gelang jedoch nicht. Lingabathula et al. untersuchten die Induktion von oxidativem Stress durch intratracheale Instillation von Silber-

Nanostäben [213]. Die Untersucher konnten keine generalisierte *ROS*-Erhöhung nachweisen [213]. Nachweisbar signifikante Abnahmen antioxidativer Enzymsysteme, wie die SOD oder die Katalase wurden indirekt, als Erhöhung von oxidativem Stress gedeutet [213]. Schnelle et al. untersuchten die Rolle von *ROS* im linksventrikulären Remodelling. Sie erzeugten eine Vorlasterhöhung im Herzen durch Anlage eines aorto-kavalen Shunts bei Mäusen mit genetischem Knockout der NADPH Oxidase 4 (*Nox4*). Sie fanden erhöhte kardiale Expression der *Nox4* [214]. Enzyme der NADPH Oxidase zeichnen sich primär durch *ROS*-Bildung aus, indem sie den Elektronentransfer von NADPH zu Sauerstoff katalysieren [214].

In allen aufgeführten Studien, konnte vermehrter oxidativer Stress nachgewiesen werden. Die mittels intermittierender hypobarer Hypoxie freigesetzten *ROS* fielen ubiquitär im Körper an. Antioxidative Enzymsysteme wurden über zentrifugierte Erythrozytensuspension nachgewiesen [211]. Sowohl die Zufuhr, wie auch der enzymatische Nachweis der *ROS*-Freisetzung bezogen sich auf den gesamten Organismus der Tiere und nicht auf ein spezifisches Gewebe. Auch bei der intratrachealen Instillation silberner Nanonägel war das primäre Ziel, die Bildung von oxidativem Stress. Der Nachweis antioxidativer Enzyme erfolgte aus dem retroorbitalen Venenplexus der Mäuse und spiegelt somit die antioxidative Aktivität der im gesamten Blut vorkommenden Enzyme wider [213].

Bisherige Modelle von oxidativem Stress zeichneten sich durch eher unspezifische und systemische *ROS*-Induktion aus. Besonders im Zusammenspiel mit der *DAVD* gibt es unseres Wissens keine adäquaten *in vivo* Modelle einer gerichteten Freisetzung von oxidativem Stress mit Analyse gewebespezifischer *ROS*-Auswirkungen. Eine gezielte Induktion von oxidativem Stress wird klinisch in der Tumortherapie angewandt. Ionisierende Strahlen bewirken Schädigungen in der DNS, durch direkte, genotoxische, und indirekte Wirkung, durch *ROS*-Stimulation [215]. Das dabei verwendete Prinzip der PDR wirkt durch Energieübertragung. Der PS überträgt Photonenenergie eines Lasers auf Sauerstoffmoleküle, die ihren Erregungszustand ändern. Singulett Sauerstoff reagiert sehr schnell mit umliegendem Gewebe und führt zur Bildung freier Radikale [100].

Wir nutzten das Prinzip der PDR für unser Modell um *ROS* lokalisiert über der Aortenklappe freizusetzen. Da keine weiteren Risikofaktoren und exogene Faktoren die gewebespezifische Integrität der Tiere beeinflussten, konnten wir die lokalen Effekte von oxidativem Stress auf die Aortenklappe nachweisen. Um sicherzugehen, dass die für das Modell genutzten apparativen Strukturen und operativen Eingriffe, keine Eigeneffekte auf das Zielgewebe der Aortenklappe vermitteln, verwendeten wir zwei Kontrollgruppen. Weder in der Laser- noch in der Sham-Gruppe konnten direkte Schädigungen durch die Bestrahlung oder die Operation beobachtet

werden. Die morphologischen Veränderungen, die wir in den Tieren nachweisen konnten sind somit als direkte oder indirekte Folge der *ROS*-Freisetzung durch die PDR zu werten.

### 4.3 Die Lipidinvasion

Die Lipidinvasion ist eine Folge der endothelialen Dysfunktion. Freie *ROS* oxidieren das vorhandene *LDL*, welches anschließend über den *scavenger*-Rezeptor von Makrophagen aufgenommen wird. Die unterschiedlichen Oxidationsstufen von *LDL* wirken zytotoxisch, proapoptotisch und können die zelluläre Proliferation unterstützen [32, 33, 117]. Das *oxLDL* scheint an der *VIC*-Modulation beteiligt zu sein, die zu einer osteoblastischen Differenzierung führt [134, 135]. In der *DAVD* führt *oxLDL* über *TLR-2* gesteuerte *NF-κB*-Aktivierung zu einer *BMP-2* Induktion mit osteochondrogener Differenzierung [126, 216]. Die Oil Red O-Färbung wurde zur Detektion erhöhter Lipidakkumulationen in der Aortenklappe verwendet. Es zeigten sich keine signifikant erhöhten intravalvulären Ansammlungen von Lipiden. Wir konnten jedoch eine signifikante Erhöhung in den Tieren feststellen, die 84 und 168 Tage nach der PDR-Induktion untersucht wurden. Diese Ergebnisse sind unabhängig von der Bestrahlung mit vorausgegangener PS-Applikation, und legen den Schluss nahe, dass die beobachteten Lipidakkumulationen nicht das Resultat erhöhter *ROS*-Freisetzung sind, sondern morphologische Korrelate eines höheren Lebensalters darstellen. Eine altersbedingte Zunahme intravalvulärer Lipidansammlungen wurde auch in früheren Studien beschrieben [11, 217, 218].

Kim et al. fanden in einer Untersuchung von 27 humanen Aortenklappen erhöhte Lipidakkumulationen im Bereich kalziumreicher Areale [218]. In den von Otto et al. untersuchten Aortenklappen konnten ausgedehnte Akkumulationen von Lipiden sowohl intra- als auch extrazellulär detektiert werden [11]. Die meisten davon fanden sich im Bereich degenerativer Läsionen und in der Fibrosa [11]. Olsson et al. untersuchten stenotische Aortenklappen von Patienten, die einen operativen Klappenersatz erhielten [123]. Erhöhte Lipidansammlungen konnten sowohl in den Kontrollgruppen, als Zeichen altersbedingter Degeneration, als auch in den stenotischen Klappen nachgewiesen werden [123]. Auch hier war die nachgewiesene Lipidansammlung der stenotischen Aortenklappen, hauptsächlich im Bereich der endothelialen Fibrosa ausgeprägt [123]. Zusätzlich fanden sich neben den Lipiden auch erhöhte Mengen von Apolipoprotein B (ApoB) und *oxLDL* im Bereich valvulärer Kalziumablagerungen [123]. Olsson et al. konkludierten, dass die erhöhten Lipidakkumulationen von *LDL*-Molekülen abgeleitet sind, zumal diese den Transport von ApoB übernehmen [123].

In unseren Untersuchungen beobachteten wir eine verstärkte Lipidakkumulation, vor allem im paravalvulären Gewebe. Die Aortenklappen selbst zeigten keine Invasionen lipidreicher Zellen. Diese Resultate unterstützen die Hypothese, dass die in unserem Modell detektierten Lipidansammlungen, morphologische Korrelate eines höheren Lebensalters darstellen und nicht

die Folge erhöhten oxidativen Stresses sind. Verstärkte Lipidinvasionen im Rahmen ROS-induzierter Aortenklappendegeneration wären wahrscheinlich überwiegend, zumindest aber teilweise in den Aortenklappen nachzuweisen. In den oben genannten Studien wurden die Lipidinvasionen intravalvulär beobachtet. Für die Gewebeproben wurde ebenfalls die histologische Oil Red O-Färbung verwendet.

#### 4.3.1 Histologie und Funktion – die Detektion des *oxLDL*

Neben der rein histomorphologisch bestätigten Anwesenheit von Lipiden, hätte auch ein funktioneller Nachweis des Oxidationsstatus ergänzt werden können. Zusätzliche immunhistochemische Analysen zur Detektion von ApoB und *oxLDL*, wie von Olsson et al. genutzt [123], hätten Aufschlüsse über potentielle Kollokalisierungen und den Oxidationsstatus der invadierten Lipide bieten können. Neben histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen, stellt auch die Messung zirkulierender *oxLDL*-Moleküle eine interessante Methode dar, um degenerative Aortenklappenschädigungen zu detektieren. Hulthe et al. untersuchten zirkulierende *oxLDL*-Werte bei 391 männlichen Patienten ohne kardiovaskuläre Vorerkrankungen [219]. Hierbei wurden, für das *oxLDL*, und die proinflammatorischen Zytokine, ELISA-Untersuchungen von Plasma- und Serumproben ausgeführt [219]. Die Autoren beobachteten Assoziationen von im Blut detektierten *oxLDL*-Werten, subklinischer Atherosklerose und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , und dem C-reaktiven Protein (CRP) [219]. Tsimikas et al. untersuchten anfallendes *oxLDL* und Lp(a) in 504 Patienten unmittelbar vor einer Koronarangiographie [220]. Sie zeigten eine Assoziation von zirkulierendem *oxLDL* mit angiographisch nachweisbarer Koronarer Herzkrankheit (KHK) [220]. Ferner konnte ein Zusammenhang zwischen zirkulierendem *oxLDL*, dem Transkriptionsfaktor *NF- $\kappa$ B* und der instabilen Angina pectoris aufgezeigt werden [221]. Die Autoren der Studie schlussfolgerten, dass die Monozytenaktivierung von *NF- $\kappa$ B*, im Rahmen der instabilen Angina pectoris, zumindest teilweise durch *oxLDL* induziert wird [221]. Die Arbeitsgruppe um Côté untersuchte zirkulierendes *oxLDL* bei 105 Patienten mit Aortenklappenstenose [133]. Es konnte gezeigt werden, dass *oxLDL* als unabhängiger Faktor mit dem Remodelling der Aortenklappe assoziiert ist [133]. Erhöhte *oxLDL*-Werte korrelierten mit verstärktem fibrokalzifizierendem valvulärem Remodelling [133].

Die Aussagekraft von *oxLDL* als unabhängigem Marker, sowohl für die KHK, als auch für andere Entitäten wie die *DAVD*, ist kontrovers zu betrachten [222]. Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung von *oxLDL* und den potentiellen Oxidationen weiterer Komponenten wie Phospholipiden, ApoB oder *LDL*-Cholesterol, ist die Untersuchung eines einzelnen Antikörpers nicht zwingend aussagekräftig [222]. Idealerweise würden mehrere Epitope von *LDL*, durch den Einsatz unterschiedlicher Antikörper untersucht werden, um eine detailliertere Aussage zu molekularen Assoziationen und Zusammenstellungen treffen zu können [222].

Eine Messung von zirkulierendem *oxLDL* in unserem Modell hätte zusätzlichen Aufschluss über die Oxidationsverhältnisse der Lipoproteine bieten können. In Verbindung mit den histologischen Oil Red O-Ergebnissen hätte wir möglicherweise eine forciertere Trennschärfe zwischen der *ROS*-Gruppe und den Kontrollgruppen Laser und Sham erhalten. So wäre eine Abgrenzung zur mutmaßlich altersbedingten Lipidakkumulation möglich gewesen. Erhöhte *oxLDL*-Werte hätten Aufschluss über die Oxidationsprozesse innerhalb der *ROS*-Gruppe und damit auch über die frühen Folgen von oxidativem Stress im Rahmen der *DAVD* geben können. Die Untersuchung des rein histomorphologischen Aspektes der *ROS*-Induktion ermöglicht Kausalzusammenhänge erst dann zu erkennen, wenn die Prozesse der *DAVD* schon weit genug fortgeschritten sind und mikroskopisch sichtbar werden. Ein detaillierterer *oxLDL*-Nachweis, über zusätzliche Antikörper und *ELISA*-Materialien war nicht möglich. Für zukünftige Untersuchungen könnten sie jedoch eine Bereicherung in der Analyse von *ROS*-induzierten Lipidperoxidationsprozessen darstellen.

#### 4.4 *NT-proBNP* – ein Biomarker der *DAVD*?

In unserer Arbeitsgruppe befassten wir uns ebenfalls mit der in-vivo Morphologie und Funktionalität der Aortenklappe. S. Bethke untersuchte hierzu echokardiographische Untersuchungen der Tiere vor der Euthanasierung durch. Sie konnte einen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren aufzeigen, die 168 Tage und 0 Tage nach Bestrahlung und PS-Applikation (*ROS*-Gruppe) euthanasiert wurden. So zeigten sich signifikant mehr Stenosen der Aortenklappe bei den 168-Tage-Tieren (bislang unveröffentlichte Daten). Unter dem Aspekt, dass die *ROS*-Induktion zu einer echokardiographisch messbaren Stenose der Aortenklappe führt, untersuchten wir weitere Aspekte der eingeschränkten aorto-valvulären Funktionalität. Hierzu verwendeten wir einen *NT-proBNP-ELISA*.

Das kardiale Remodelling ist eine relevante Folge der *DAVD* und erstreckt sich neben Verdickung, Versteifung und Kalzifizierung der Aortenklappe auch auf die zelluläre Architektur des Myokards. Veränderungen der Aortenklappe bedingen Störungen des ventrikulo-aortalen Blutflusses und damit erhöhten hämodynamischen Stress im Myokard, der mit Hypertrophie und Schädigung der Kardiomyozyten einhergehen kann. Der erhöhte kardiovaskuläre Stress könnte folglich durch kardiale Marker wie Troponin oder *NT-proBNP* erfasst werden [4]. *NT-proBNP* wird in der klinischen Beurteilung der Herzinsuffizienz als indikativer und prognostischer Parameter verwendet. Darüber hinaus ist es mit einem erhöhten Risiko für zerebrale Insulte, Herzrhythmusstörungen wie das Sick-Sinus-Syndrom und thromboembolische Ereignisse des venösen Systems assoziiert [12].

Die Beteiligung von *NT-proBNP* in der Erfassung und Prognose von Aortenklappenstenosen mit nachfolgender Herzinsuffizienz als klinische Manifestation der *DAVD*, konnte in mehreren Studien dargelegt werden [167, 170, 223-229]. Die Arbeitsgruppe um Antova untersuchte die

Möglichkeit. symptomatische und asymptomatische Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose klinisch zu differenzieren [226]. Symptomatische Patienten wiesen signifikant höhere Werte auf, sodass *NT-proBNP* als effiziente Möglichkeit bestätigt werden konnte, den Schweregrad einer Aortenstenose zu detektieren und prognostische Aussagekraft, hinsichtlich ereignisfreier Überlebensraten, zu treffen [226]. Eine Studie zu postoperativem Outcome nach Aortenklappenersatz untersuchte die Rolle von *NT-proBNP* als prognostischen Marker im klinischen Setting. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte *NT-proBNP*-Werte, die Patienten identifizierte, die ein erhöhtes Risiko für Langzeitkomplikationen nach erfolgreichem Aortenklappenersatz, aufwiesen [228]. Barbieri et al. untersuchten die Rolle des Herzenzyms Troponin T (TnT), kombiniert mit *NT-proBNP*, zur Risikostratifizierung eines operativen Aortenklappenersatzverfahrens [227]. Sie zeigten, dass die Kombination erhöhte Plasmawerte für TnT und *NT-proBNP* bei Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose, die einen Klappenersatz benötigten, signifikanten Einfluss auf die Prognose der postoperativen Mortalitätsrate haben [227].

Die Studienlage einbeziehend, versuchten wir die Rolle von *NT-proBNP* im Remodellingprozess *ROS*-induzierter *DAVD* nachzuweisen. Der verwendete *ELISA* erbrachte keine Ergebnisse, die eine Beteiligung von *NT-proBNP* vermuten lassen. Ein Grund hierfür könnte in der grundsätzlichen Pathophysiologie des Prohormons liegen. In den Kardiomyozyten lokalisiert, wird *NT-proBNP* durch Dehnung der Ventrikelwände sezerniert [160, 161]. Einengungen der aortalen Ausflussbahn, wie sie in der *DAVD* entstehen können, führen zu erhöhtem linksventrikulärem Volumen und können mit klinischen Zeichen der Herzinsuffizienz wie Hypertrophie und Dilatation der Ventrikelwände einhergehen [42, 164, 165]. Die oben genannten Studien untersuchten die Zusammenhänge von *NT-proBNP*, mit schweren und leichten Formen der Aortenklappenstenose [226-228]. In unserem Modell konnten keine histomorphologischen oder immunhistochemischen Hinweise für eine bestehende Aortenklappenstenose gezeigt werden. Eine klinisch und funktionell inapparente *DAVD* könnte sich, als Folge der *ROS*-Einwirkung gebildet haben. Neben den echokardiographischen Nachweisen einer Aortenklappenstenose fanden wir jedoch keine weiteren Anzeichen, für das Vorliegen einer hämodynamisch relevanten Herzinsuffizienz.

Unter diesem Aspekt ist das Ausbleiben eines Anstiegs von *NT-proBNP* nicht verwunderlich. In ihrer Untersuchung der praktikablen Anwendbarkeit von *NT-proBNP* in Klappenerkrankungen, schlussfolgerten Petracca et al., dass die Messung von *NT-proBNP* bei Aortenklappenerkrankungen mit Regurgitation sinnvoll ist, vor allem aber in Zusammenspiel mit der linksventrikulären Dysfunktion [229]. Auch die Ergebnisse von Sainger et al. unterstreichen diese Hypothese [230]. Sie untersuchten 330 Patienten mit unterschiedlichen Ausprägungen einer *DAVD* auf die Biomarker Osteopontin (OPN), *bone natriuretic peptide* (BNP),

Parathyroidhormon (PTH), Fetuin-A, Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), Homozytstein und *NT-proBNP* [230]. Es konnte gezeigt werden, dass die frühen Stadien der *DAVD* mit erniedrigtem Fetuin-A und erhöhten OPN- und PTH-Werten einhergehen [230]. Die hochgradigen Stadien der *DAVD* dagegen waren mit erhöhten Werten von ADMA und *NT-proBNP* assoziiert [230]. Folglich kann gesagt werden, dass *NT-proBNP* als Marker einer *DAVD*, wie auch als Marker einer Aortenklappenstenose nützlich und sinnvoll sein kann, in frühen Stadien der Degeneration jedoch wenig aussagekräftig ist [230-232].

## 4.5 Quantifizierung aktivierter *VICs*

Immunhistologisch kann der Aktivierungsprozess von *VICs* durch Proteine wie  $\alpha$ -*SMA* und Desmin nachvollzogen werden [154-156]. In unserem Modell untersuchten wir die *ROS*-induzierte *VIC*-Aktivierung mittels immunhistologischer  $\alpha$ -*SMA*/Vimentin-Doppelfärbung. Im Unterschied zu  $\alpha$ -*SMA*, einem Marker für aktivierte *VICs*, ist Vimentin, als intermediäres Filament mesenchymaler Zellen, in fast allen *VICs* enthalten und als Marker für ruhende *VICs* zu betrachten [35, 36, 39, 158, 159]. Diese unterschiedlichen prozentualen Verteilungswerte der beiden Marker nutzten wir für die Analyse der *VIC*-Aktivierung. Der Annahme folgend, Vimentin weise alle, und  $\alpha$ -*SMA* nur die aktivierten *VICs* nach, zielten wir in unserer Auswertung darauf ab, die prozentuale Verteilung der aktivierten *VICs* an den ruhenden *VICs* wiederzugeben.

Zur quantitativen Auswertung nutzten wir das Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ*. Die Messung der prozentualen Verteilung  $\alpha$ -*SMA*-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl wird häufig genutzt um ein reliables Abbild der Verteilungsraten von aktivierten und ruhenden *VICs* zu erhalten. Bei *in vitro* Versuchen bietet sich eine manuelle Zählung unter Einbeziehung mehrerer mikroskopischer Gesichtsfelder an [233]. Die zufällige Verteilung der Gesichtsfelder kann die Verteilung der *VIC*-Aktivierung relativ objektiv wiedergeben. Jedoch bleibt zu berücksichtigen, dass die tatsächliche Verteilung nur angedeutet und nicht exakt wiedergegeben wird, da die mikroskopische Einstellung der einzelnen Gesichtsfelder, wie auch die Sorgfalt und Genauigkeit der Zählung subjektiv und damit stark Untersucherabhängig sind. Die Zählung über Bildbearbeitungsprogramme wie *ImageJ*, ist eine angewandte Methode der Quantifizierung von Zellen. Häufig werden hierbei unter Miteinbeziehung aller Zellen, die prozentualen Werte der positiv markierten Zellen angegeben [234, 235]. Zu beachten ist, dass immunhistochemische Analysen *in vitro* generierter Zellen unproblematischer auszuwerten sind, als Zellen innerhalb eines kryogefertigten Gewebeschnittes. Die spezifischen Zellverteilung, innerhalb eines Gewebeschnittes, ist in ihrer histologischen Organisation komplexer, als die einer Zellkultur. In unserem Versuch machte die Nutzung einer 40-fachen Vergrößerung gepaart mit den ausgedehnten Gewebeschnitten der Aortenklappen, dem komplex kontrastierten Bild einer Immunfluoreszenz und den zellfreien Inhalten des Lumens, die Abbildung der gesamten Klappe

unmöglich. Wir versuchten die neun verwendeten repräsentativen Bildausschnitte jeder Klappe möglichst objektiv für den Nachweis aktivierter *VICs* auszuwerten. Die erstellten Makros setzen die prozentuale Verteilung von  $\alpha$ -*SMA* ins Verhältnis zu der von Vimentin. Eine *Region of Interest (ROI)* wurde erstellt, um das zellfreie Lumen vom Gewebe der Klappe abzugrenzen und auszuschneiden. Die anschließend erfolgten Messungen der binären Darstellung wurden getrennt für  $\alpha$ -*SMA* und Vimentin programmiert, um die homogene Vermengung beider Marker zu vermeiden. Über ein gesondert programmiertes Makro, wurden die getrennten Bilder in einem letzten Schritt übereinandergelegt, um die einzelnen Werte miteinander verrechnen. Da für alle Einzelbilder die gleichen Programmierungsmuster genutzt wurden, konnten subjektive Fehlerquellen in der Auswertung weitestgehend vermieden werden.

## 4.6 *VICs* und *ROS* – Das Remodelling der EZM

*VICs* synthetisieren Bestandteile der EZM und sezernieren Enzyme, die das Remodelling der Aortenklappe antreibt und die Integrität und Funktionalität, extrazellulärer Strukturen erhalten und anpassen [35, 37-40]. In der Regel liegen *VICs* in einer nicht aktiven Form vor. Die Aktivierung erfolgt im Rahmen regenerativer aber auch pathologischer Prozesse [36, 39, 41, 42]. Folge eines erhöhten Remodellings ist unter anderem die zunehmende Versteifung vorhandener EZM-Strukturen durch vermehrte Kollagensynthese, die mit Verdickung und Versteifung der Aortenklappe einhergeht [3, 67, 137].

### 4.6.1 Die elastische Integrität der Aortenklappe

Die Verringerung der elastischen Integrität und damit auch der Beweglichkeit der Aortenklappe stellt einen zentralen pathophysiologischen Aspekt der *DAVD* dar [3, 137]. Die zunehmende Versteifung der Klappe ist jedoch nicht nur Folge eines vermehrten Remodelling, sondern auch ein initiiender Faktor für erhöhte *VIC*-Aktivierung. *In vitro* Studien zur *VIC*-Phänotypisierung konnten zeigen, dass die gemessene Aktivität von  $\alpha$ -*SMA* in *VICs*, von der Morphologie der *VICs* und dem Grad der Substratversteifung abhängt [233, 235-239]. Die Morphologie einzelner *VICs* entspricht dabei den unterschiedlichen Aktivierungsstadien der Zellen [240].

Kloxin et al. untersuchten die elastizitätsabhängige Aktivierung von *VICs* mittels Zellkulturen, unter Verwendung lichtabbaubarer Hydrogele [235]. Durch photochemische Modulationen konnte der Elastizitätsgrad der Hydrogele reguliert und unterschiedliche Versteifungsgrade simuliert werden [235]. Die Elastizität von humanem Gewebe variiert in etwa einem Bereich von 0,1 kPa bis 20 GPa [239]. Die Elastizitätspanne der Fibrosa, der kräftigste Schicht innerhalb der Aortenklappe mit der höchsten Zugfestigkeit [18], und häufigster Ort für primäre Symptommanifestation bei *DAVD* [233], wird mit einem Bereich von 0,8 bis 8 kPa angegeben [239]. Die in den Versuchen von Kloxin et al. verwendeten Variationen der Elastizität lagen in einem Bereich von 7 bis 32 kPa [235]. Die Studie zeigt, dass die Zunahme der Elastizität (und

damit die Abnahme der Versteifung) eine Inaktivierung der *VICs* bewirkt [235]. Der Umkehrschluss lässt vermuten, dass die Zunahme der Versteifung die Aktivierung von *VICs* forciert. Der Gedanke impliziert, dass die Aktivierung von *VICs*, ein erhöhtes EZM-Remodelling begünstigt, welches seinerseits wiederum die *VIC*-Aktivierung induziert. Wang et al. fanden heraus, dass die Abnahme einer Versteifung, der *in vitro* verwendeten Grundsubstanz, keinen Einfluss auf den programmierten Zelltod von *VICs* zu haben scheint [239]. Daraus schlussfolgerten sie, dass die Deaktivierung von *VICs* mit verminderter  $\alpha$ -*SMA*-Expression die aktivierten *VICs* wieder in ihre ruhende Form überführt [239]. Dieser Prozess kann zum einen durch Änderung der Mechanotransduktion der EZM auf *VICs* [241], zum anderen auch durch Zell-Zell-Kommunikationen erklärt werden [237]. Unsere Untersuchungen des valvulären Remodellings durch  $\alpha$ -*SMA*- und MMP-9-Detektionen, erbrachten keine Hinweise auf veränderte EZM-Strukturen. Den oben genannten Gedankengang weiter ausführend, könnte dies durch eine Deaktivierung der aktivierten *VICs* zu erklären sein. Der oxidative Stress könnte die *VICs* kurzzeitig in ihre aktive Form überführt haben. Dies hätte temporäre Elastizitätsunterschiede hervorrufen können. Die einmalige Exposition der PDR könnte nicht erheblich genug gewesen sein, um eine langfristige morphologische und funktionelle Veränderung der Aortenklappe zu bedingen. Die sich daran anschließende Wiedererlangung der elastischen Integrität könnte für die Deaktivierung der aktiven *VICs* verantwortlich sein.

#### 4.6.2 Der Einfluss des Endothels auf die *VIC*-Aktivierung

Untersuchungen von Gould et al. implizieren, dass *VECs*, die durch Versteifung bedingte *VIC*-Aktivierung, hemmen können [237]. *VECs* sind in der Lage durch parakrine Sezernierung von Stickstoffmonoxid (*NO*), cGMP-gekoppelt, aktivierte *VICs* zu hemmen und wieder in ihre ruhende Form zu überführen [237]. Die endotheliale Dysfunktion, die charakteristischerweise mit einer verringerten Verfügbarkeit von *NO* einhergeht, ist eine primäre Ursache der *DAVD* [31]. Für eine suffiziente *VIC*-Deaktivierung wird folglich ein intaktes Endothel benötigt. Verletztes Endothel, wie es zum Beispiel durch erhöhten Scherstress auftritt [11], sollte dementsprechend nicht mehr in der Lage sein, die *VIC*-Aktivität zu regulieren. In unseren Untersuchungen *ROS*-induzierter EZM-Remodellingprozesse der Aortenklappe, fanden wir keine Hinweise auf ein dauerhaft geschädigtes Endothel. Die Movat-Pentachrom-Färbung, eine histologische Übersichtsfärbung, genutzt um morphologisch suspektere Areale innerhalb des Gewebes der Aortenklappe zu detektieren, erbrachte keine Hinweise auf Kontinuitätsunterbrechungen. Anders als in den Versuchen der Arbeitsgruppe um Honda, die durch Einführen eines Drahtes, die Aortenklappe und das dortige Endothel nachträglich mechanisch schädigen konnten [185], hat der von uns induzierte oxidative Stress keinen permanenten Endothelschaden herbeiführen können. Daraus schlussfolgern wir, dass durch die mutmaßlich erhaltene endotheliale Integrität, eine Störung der *NO*-Sezernierung unwahrscheinlich scheint. Den kausalen Zusammenhängen

parakriner Einflussnahme auf die *VIC*-Aktivität folgend, halten wir eine *NO*-gestützte Deaktivierung potentiell aktivierter *VICs* für möglich. Die somit nicht vermehrt darstellbare  *$\alpha$ -SMA*-Exprimierung unserer ROS-Gruppe, bekräftigt unsere Hypothese.

### 4.6.3 Die enzymatische Aktivität von oxidativem Stress

Die endotheliale Dysfunktion von Aortenklappen durch oxidativen Stress, ist bedingt durch die ROS-induzierte Entkopplung der Stickstoffmonoxid-Synthase (*nitric oxide synthase, NOS*) [47, 242]. Bei *DAVD*, mit vorhandener Kalzifizierung und Stenosierung, findet zusätzlich eine Erhöhung des oxidativen Stresses, durch verminderte antioxidative Enzymaktivität statt [8]. Verringerungen der SOD und der Katalase konnten in kalzifizierten Arealen, nicht aber in normalem Klappengewebe nachgewiesen werden [8]. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Glutathion-Peroxidase in fortgeschrittener *DAVD* nachgewiesen werden [243]. Dieser Anstieg korrelierte nicht mit den Enzymen SOD und Katalase, deren Werte, denen einer nicht degenerativ veränderten Aortenklappe entsprachen [243]. Die anfängliche ROS-bedingte endotheliale Funktionseinschränkung induziert degenerative Prozesse der Aortenklappe. Mit zunehmender Degeneration sinkt die antioxidative Barriere. Sauerstoffradikale steigen über das physiologische Ausmaß hinaus an und begünstigen die Bildung von oxidativem Stress.

In unserem Tiermodell induzierten wir ROS durch eine PDR intravenös appliziertes Temoporfin und eine, 24 Stunden später durchgeführte, kontrollierte und lokale Laserbestrahlung der Aortenklappe. Der oxidativ zugeführte Stress beschränkte sich damit auf einen einzelnen Zeitpunkt. Unveröffentlichte Daten von L. Jacobi belegen die Anwesenheit von, *in vivo* generiertem oxidativem Stress, in den ersten acht Tagen nach erfolgter PDR. Bei den frühen Zeitpunkten der PDR-vermittelten ROS-Freisetzung, konnte keine ausreichend fortgeschrittene *DAVD* detektiert werden. Ein plausibler Erklärungsansatz für deren Ausbleiben könnte sein, dass antioxidative Enzyme, wie die SOD, die Katalase und die Glutathion Peroxidase, in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt waren. Ihre antioxidative Wirkung könnte die freigesetzten Sauerstoffradikale, wenn auch nicht ganz, zumindest aber teilweise antagonisiert, und somit die Höhe des oxidativen Stresses reduziert haben.

Untersuchungen von Menet et al. zeigen eine erhöhte Aktivität der Glutathion-Peroxidase bei gleichzeitig unveränderter SOD- und Katalase-Aktivität bei *DAVD* [243]. Die Resultate implizieren, dass das antioxidative Enzymsystem der Aortenklappe im Rahmen der Degeneration auch ansteigen kann. Daraus schlussfolgernd könnten initiale ROS-induzierte, degenerative Prozesse nicht fortgeschritten genug, um morphologische Schäden zu bedingen, zu Aktivitätssteigerungen der Glutathion-Peroxidase führen. In Zusammenspiel mit gleichbleibender enzymatischer Aktivität der SOD und der Katalase, könnten die oxidativen ROS-

Effekte weniger stark ansteigen, oder sogar ausgeglichen werden. Ein niedrigeres Level an oxidativem Stress hat folglich eine geringere Potenz, die Aortenklappe oxidativ zu schädigen.

Die in unseren Versuchen einmalig erfolgte *ROS*-Induktion war hoch genug, um in der zellulären Kern-DNS nachgewiesen zu werden (L. Jacobi, unveröffentlichte Daten). Sie könnte jedoch zu niedrig gewesen sein, um relevante Schäden zu verursachen. Die *ROS*-induzierte *NOS*-Entkopplung könnte eine *VIC*-Aktivierung teilweise induziert haben. Unsere Ergebnisse eines nicht-signifikanten Anstiegs von  $\alpha$ -*SMA* innerhalb der *ROS*-Gruppe lassen eine unzureichende *VIC*-Aktivierung vermuten. Diese ist möglicherweise durch eine unzureichend suffiziente *ROS*-Induktion zu erklären. Eine höhere Freisetzung oxidativer Radikale, hätte eventuell einen dauerhafteren Anstieg von oxidativem Stress, mit morphologisch nachweisbarem Remodelling, bewirken können.

Diese höhere Freisetzung hätte durch längere Bestrahlungsdauer, höhere PS-Zufuhr oder frequenter angewandte Bestrahlungsintervalle herbeigeführt werden können. Verlängerungen der Bestrahlungsdauer oder Erhöhungen der PS-Applikationen würden das Auftreten thermischer Schädigungen, phototoxischer Reaktionen, Kapillarlecksyndrome mit Ödembildungen, Nekroseausprägungen und eine höhere Sterberate wahrscheinlicher machen [100, 106, 244]. Detektionen der endogenen *NO*-Produktion wären eine Möglichkeit gewesen, die Einflussnahme induzierter *ROS* quantitativ wiederzugeben. Plasmaanalysen von Nitrit und Nitrat, beides Produkte des *NO*-Metabolismus, können durch kapilläre Elektrophorese untersucht werden [245, 246]. Aufgrund der mit 10-30 Sekunden angegebenen, sehr kurzen Halbwertszeit der Substrate [245, 246], sind die Bedingungen eines erfolgreichen Nachweises, besonders im PDR-gestützten Tiermodell erschwert. Daher verzichteten wir auf eine *NO*-Quantifizierung.

## 4.7 Die lokale Distribution der MMP's in der Aortenklappe

In gesunden Aortenklappen unterliegt die EZM geordneten Umbauprozessen, die sich im Gleichgewicht befinden [43]. Die *DAVD* induziert durch erhöhte pathologische Inflammation und Zellproliferation ein forciertes EZM-Remodelling [43]. Hieran beteiligt sind vor allem die MMP's, die als maßgebliche Abbauenzyme der EZM, sowohl im pathologischen Ablauf, als auch im immunhistochemischen Nachweis, eine tragende Rolle einnehmen. Ihre Sekretion erfolgt unter anderem durch T-Zellen, Makrophagen, Myofibroblasten, Endothelzellen und *VICs* [138, 139]. Immunhistochemische Untersuchungen stenosierter Aortenklappen zeigten erhöhte Expressionen verschiedener MMP's [138, 140-142]. Die MMP 9 wurde als wichtiges Enzym im EZM-Remodelling der Aortenklappe sowohl in stenosierten Klappen [140], als auch in pathologisch kalzifizierten Arealen nachgewiesen werden [43]. Die höchste Aktivität von MMP-9 konnte in Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothelzellen und Osteozyten festgestellt werden [139]. Aufgrund der dargestellten Relevanz im Prozess der *DAVD* nutzten wir eine

immunhistochemische Färbung zum Nachweis der MMP 9 im *ROS*-induzierten EZM-Remodelling. Wir konnten durch eine semiquantitative Analyse ein Ordnungsschema der MMP 9-Verteilung im valvulären Gewebe beobachten. In unseren Präparaten stellten wir die drei grundlegenden morphologischen Regionen der Aortenklappe einander gegenüber: Annulus, Kommissur und Aortenklappentasche. Die Beurteilung der einzelnen Regionen erfolgte anhand der MMP 9-exprimierenden Fläche. Wir konnten signifikante Unterschiede in der Regionenspezifischen Expressierung von MMP 9 feststellen. Ein vermehrtes MMP 9-Signal zeigte sich hauptsächlich im Bereich der Aortenklappentaschen. Die Annulus- und Kommissur-Regionen zeigten ebenfalls MMP 9-positive Zellen. Verglichen mit den Taschen-Regionen fielen ihre, auf die Fläche bezogene Expressierungen der MMP 9 jedoch deutlich geringer aus. Dieses regionenspezifische Verteilungsmuster der MMP 9 beobachteten wir in den *ROS*, den Laser- und den Sham-Gruppen. Es ist daher davon auszugehen, dass die *ROS*-Einwirkung, auf das Gewebe der Aortenklappe, keinen Einfluss auf die Expressierung von MMP 9 hatte. Die regional differierende enzymatische Expressierung legt allerdings den Schluss nahe, dass die Remodellingprozesse der EZM der Aortenklappe einer örtlichen Distribution unterliegen.

Hingegen fanden Untersuchungen von Krishnamurthy et al. an Elastin-defizienten Mäusen (*Eln+/-*), eine vermehrte Anreicherung der MMP 2 und MMP 9 in den Annulus-Regionen der Aortenklappe [247]. Sie schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass die Annulus-Region den zentralen Ort in der Genese degenerativer Aortenklappenerkrankungen darstellt [247]. Die in der Studie detektierte *VIC*-Aktivierung konnte durch positive Marker wie *SMemb* und *SM22* beobachtet werden [247]. Der Differenzierungsprozess zeigte jedoch keine Dynamik in der  $\alpha$ -*SMA*-Expression [247]. Es wurde angenommen, dass die Expression unterschiedlicher Marker zum Aktivitätsnachweis durch verschiedene funktionelle Untergruppen der *VICs* und morphologisch differente Formen der Aortenklappenerkrankung zu erklären sind [247]. Den Gedanken weiterführend kann gesagt werden, dass der pathologische Ablauf einer Aortenklappendegeneration im Versuchsmodell von den Methoden abhängt, die zur Induktion eben dieser genutzt werden. Folglich ist anzunehmen, dass Faktoren wie die regional-abhängigen Remodelling-Prozesse einer heterogenen Dynamik unterliegen. So findet sich auch eine Differenz in der regionalen Verteilung von Kalziumablagerungen in degenerierten Klappen [248]. Andererseits scheint es anatomisch bedingt eine größere Anfälligkeit der nicht-koronaren Aortenklappentasche für frühe Läsionen im Krankheitsbild der *DAVD* zu geben [19]. Masjedi et al. konnten zeigen, dass Remodellingprozesse der EZM und osteogene Differenzierung, verstärkt in der nicht-koronaren Aortenklappentasche auftreten [249]. Wir halten die Hypothese, eines regional determinierten Initiationsgeschehens in der Entstehung der *DAVD* für äußerst relevant, besonders mit Blick auf spätere Studien, die sich mit der Prävention und der Therapie der *DAVD* befassen könnten. Genaue Kenntnisse einer regionenspezifischen pathogenetischen Initiation

degenerativer Prozesse, könnten Ziele in der präventiven Risikoanalyse und der interventionellen Therapie werden. Menschen mit *DAVD* im beginnenden Stadium könnten früher erkannt und dadurch möglicherweise gezielter und besser therapiert werden. Die frühzeitige Erkennung ist, unserer Meinung nach, der wichtigste diagnostische Parameter, um die Überlebenschancen von Patienten mit *DAVD* zu erhöhen. Die derzeitige Studienlage ist noch nicht ausreichend dargelegt, um konkrete Aussagen über die lokale Distribution *DAVD*-assoziierter EZM-Remodellingprozesse innerhalb der Aortenklappe, treffen zu können. Unsere Hypothese eines Regionen-spezifischen Verteilungsmusters der MMP 9 erfordert weitere Untersuchungen. Wir konnten eine lokale Distribution des EZM-Remodellings beobachten, dieses allerdings nicht in Zusammenhang mit einer *ROS*-induzierten *DAVD* nachweisen. In weiteren Untersuchungen könnte das EZM-Remodelling in den Aortenklappen-Regionen von Tasche, Annulus und Kommissur, bei vorhandenem pathologischem Ereignis untersucht werden.

## 5 Schlussfolgerungen

Unsere Untersuchungen zum EZM-Remodelling der Aortenklappe durch PDR-gestützte *ROS*-Induktion konnten folgende Punkte darstellen.

Es konnte gezeigt werden, dass die PDR durch Kombination eines Rotlicht-Lasers mit Temoporfin keinen signifikanten detektierbaren Einfluss auf das EZM-Remodelling nimmt. Das Ausbleiben histomorphologischer Korrelate einer *DAVD*, in den Übersichtsdarstellungen der Movat Pentachrom-Färbung, lässt eine grobe pathologische Beeinträchtigung nicht vermuten. Die Quantifizierungen von *NT-proBNP* zeigen keine relevanten Schwankungen oder Sezernierungen, die für eine funktionelle kardiale Schädigung, wie sie durch die *DAVD* entstehen kann, sprechen. Detektionen der  $\alpha$ -*SMA*-Expression, als Zeichen vermehrter *VIC*-Aktivierung, zeigten keine relevante Dynamik im pathologischen Differenzierungsverhalten der Zellen. Wir konnten jedoch eine erweiterte Form der Quantifizierung von  $\alpha$ -*SMA*-positiven Zellen etablieren. Die programmgesteuerte Analyse binärer Signaldarstellung verringert potentiell fehlerhafte Messungen durch individuelle, untersucherabhängige Auswertung. Die Objektivierung der Analyse gestattet eine genauere Darstellung des tatsächlich nachgewiesenen Zellverhaltens. Die Untersuchung der Lipidinvasion mit begleitender oxidativer Modifikation erbrachten keine Hinweise für ein vermehrte *ROS*-bedingte Inflammation. Es konnten jedoch vermehrt Lipidzellen im paravalvulären Gewebe der Aortenklappen den Tieren beobachtet werden, die nach 168 Tagen explantiert wurden. Signifikante Schwankungen in der Expressionsdynamik von *LDL* konnten daher zeigen, dass die Lipidinvasion ein Zeichen des Alterungsprozesses ist. Die Detektion der MMP 9 als tragendem Enzym valvulären EZM-Remodellings zeigte keine deutlich vermehrte Expressierung, die als Zeichen eine *ROS*-induzierten extrazellulären Umbauprozesses zu werten wäre. Die Analyse der regionenspezifischen Verteilung von MMP 9 zeigte signifikante Unterschiede in ihrer lokalen Expressierung innerhalb der Aortenklappe. Es konnten deutlich vermehrte Expressierungen der MMP 9 im Bereich der Aortenklappentaschen gefunden werden. Verglichen damit, zeigten die Annulus- und die Kommissur-Regionen, eine markant geringere MMP 9-Expressierung. Dieses regionale Verteilungsmuster lässt eine loko-regionalen Ursprung in der Pathogenese der *ROS*-induzierten *DAVD* vermuten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Sanchez, P.L. and A. Mazzone, *C-reactive protein in degenerative aortic valve stenosis*. *Cardiovasc Ultrasound*, 2006. **4**: p. 24.
2. Olson, L.J., W.D. Edwards, and A.J. Tajik, *Aortic valve stenosis: etiology, pathophysiology, evaluation, and management*. *Curr Probl Cardiol*, 1987. **12**(8): p. 455-508.
3. 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.
4. Small, A., et al., *Biomarkers of Calcific Aortic Valve Disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(4): p. 623-632.
5. Mohler, E.R., et al., *Development and progression of aortic valve stenosis: atherosclerosis risk factors--a causal relationship? A clinical morphologic study*. *Clin Cardiol*, 1991. **14**(12): p. 995-9.
6. Mody, N., et al., *Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells*. *Free Radic Biol Med*, 2001. **31**(4): p. 509-19.
7. 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.
8. 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.
9. Weiss, R.M., et al., *Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice*. *Circulation*, 2006. **114**(19): p. 2065-9.
10. 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.
11. 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.
12. Virani, S.S., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation*, 2020. **141**(9): p. e139-e596.
13. Natarajan, D. and B. Prendergast, *Aortic stenosis - pathogenesis, prediction of progression, and percutaneous intervention*. *J R Coll Physicians Edinb*, 2017. **47**(2): p. 172-175.
14. Nkomo, V.T., et al., *Burden of valvular heart diseases: a population-based study*. *Lancet*, 2006. **368**(9540): p. 1005-11.
15. Baumgartner, H., et al., *2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease*. *Eur Heart J*, 2017. **38**(36): p. 2739-2791.
16. Gross, L. and M.A. Kugel, *Topographic Anatomy and Histology of the Valves in the Human Heart*. *Am J Pathol*, 1931. **7**(5): p. 445-474.
17. Tseng, H. and K.J. Grande-Allen, *Elastic fibers in the aortic valve spongiosa: a fresh perspective on its structure and role in overall tissue function*. *Acta Biomater*, 2011. **7**(5): p. 2101-8.
18. Mulholland, M.D.L. and A.I. Gotlieb Md Cm Frcp, *Cardiac valve interstitial cells: regulator of valve structure and function*. *Cardiovasc Pathol*, 1997. **6**(3): p. 167-74.
19. 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.
20. Mulholland, D.L. and A.I. Gotlieb, *Cell biology of valvular interstitial cells*. *Can J Cardiol*, 1996. **12**(3): p. 231-6.

21. Schoen, F.J., *Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering*. *Circulation*, 2008. **118**(18): p. 1864-80.
22. Butcher, J.T., et al., *Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1429-34.
23. Bairati, A. and S. DeBiasi, *Presence of a smooth muscle system in aortic valve leaflets*. *Anat Embryol (Berl)*, 1981. **161**(3): p. 329-40.
24. Cimini, M., K.A. Rogers, and D.R. Boughner, *Smoothelin-positive cells in human and porcine semilunar valves*. *Histochem Cell Biol*, 2003. **120**(4): p. 307-17.
25. Yoshioka, M., et al., *Chondromodulin-1 maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis*. *Nat Med*, 2006. **12**(10): p. 1151-9.
26. Marron, K., et al., *Innervation of human atrioventricular and arterial valves*. *Circulation*, 1996. **94**(3): p. 368-75.
27. Chester, A.H., M. Misfeld, and M.H. Yacoub, *Receptor-mediated contraction of aortic valve leaflets*. *J Heart Valve Dis*, 2000. **9**(2): p. 250-4; discussion 254-5.
28. Kostyunin, A.E., et al., *Development of calcific aortic valve disease: Do we know enough for new clinical trials?* *J Mol Cell Cardiol*, 2019. **132**: p. 189-209.
29. Hughes, B.R., G. Chahoud, and J.L. Mehta, *Aortic stenosis: is it simply a degenerative process or an active atherosclerotic process?* *Clin Cardiol*, 2005. **28**(3): p. 111-4.
30. Thubrikar, M.J., J. Aouad, and S.P. Nolan, *Patterns of calcific deposits in operatively excised stenotic or purely regurgitant aortic valves and their relation to mechanical stress*. *Am J Cardiol*, 1986. **58**(3): p. 304-8.
31. Mohler, E.R., 3rd, *Mechanisms of aortic valve calcification*. *Am J Cardiol*, 2004. **94**(11): p. 1396-402, a6.
32. Mathieu, P. and M.C. Boulanger, *Basic mechanisms of calcific aortic valve disease*. *Can J Cardiol*, 2014. **30**(9): p. 982-93.
33. O'Brien, K.D., et al., *Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(4): p. 523-32.
34. Taylor, P.M., et al., *The cardiac valve interstitial cell*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(2): p. 113-8.
35. Durbin, A.D. and A.I. Gotlieb, *Advances towards understanding heart valve response to injury*. *Cardiovasc Pathol*, 2002. **11**(2): p. 69-77.
36. Liu, A.C., V.R. Joag, and A.I. Gotlieb, *The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology*. *The American journal of pathology*, 2007. **171**(5): p. 1407-1418.
37. Taylor, P.M., S.P. Allen, and M.H. Yacoub, *Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin*. *J Heart Valve Dis*, 2000. **9**(1): p. 150-8.
38. Rabkin, E., et al., *Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves*. *Circulation*, 2001. **104**(21): p. 2525-32.
39. 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.
40. Fayet, C., M.P. Bendeck, and A.I. Gotlieb, *Cardiac valve interstitial cells secrete fibronectin and form fibrillar adhesions in response to injury*. *Cardiovasc Pathol*, 2007. **16**(4): p. 203-11.
41. Ali, M.S., X. Wang, and C.M. Lacerda, *A survey of membrane receptor regulation in valvular interstitial cells cultured under mechanical stresses*. *Exp Cell Res*, 2017. **351**(2): p. 150-156.

42. Schoen, F.J., *Cardiac valves and valvular pathology: update on function, disease, repair, and replacement*. Cardiovasc Pathol, 2005. **14**(4): p. 189-94.
43. Perrotta, I., et al., *Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Calcified Human Aortic Valves: A Histopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2016. **24**(2): p. 128-37.
44. Rutkovskiy, A., et al., *Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification*. J Am Heart Assoc, 2017. **6**(9).
45. Liu, X. and Z. Xu, *Osteogenesis in calcified aortic valve disease: From histopathological observation towards molecular understanding*. Prog Biophys Mol Biol, 2016. **122**(2): p. 156-161.
46. 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.
47. Heistad, D.D., et al., *Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases*. Circ J, 2009. **73**(2): p. 201-7.
48. Joseph, J., et al., *Aortic Stenosis: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy*. Am J Med, 2017. **130**(3): p. 253-263.
49. Adams, H.S.L., et al., *Contemporary review of severe aortic stenosis*. Intern Med J, 2019. **49**(3): p. 297-305.
50. Head, S.J., M. Çelik, and A.P. Kappetein, *Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement*. Eur Heart J, 2017. **38**(28): p. 2183-2191.
51. Mazine, A., et al., *Ross Procedure in Adults for Cardiologists and Cardiac Surgeons: JACC State-of-the-Art Review*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(22): p. 2761-2777.
52. Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 24): p. 4195-200.
53. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: p. 4-27.
54. Theocharis, A.D., D. Manou, and N.K. Karamanos, *The extracellular matrix as a multitasking player in disease*. Febs j, 2019. **286**(15): p. 2830-2869.
55. Novoseletskaya, E.S., et al., *Extracellular Matrix in the Regulation of Stem Cell Differentiation*. Biochemistry (Mosc), 2019. **84**(3): p. 232-240.
56. Clause, K.C. and T.H. Barker, *Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair*. Curr Opin Biotechnol, 2013. **24**(5): p. 830-3.
57. Boudreau, N. and M.J. Bissell, *Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(5): p. 640-6.
58. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
59. Bonnans, C., J. Chou, and Z. Werb, *Remodelling the extracellular matrix in development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(12): p. 786-801.
60. Aumailley, M. and B. Gayraud, *Structure and biological activity of the extracellular matrix*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(3-4): p. 253-65.
61. Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries, *Integrin ligands at a glance*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 19): p. 3901-3.
62. Deutzmann, R. and P. Bruckner, *Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion*, in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2014. p. 931-951.
63. Ruoslahti, E., *Fibronectin and its integrin receptors in cancer*. Adv Cancer Res, 1999. **76**: p. 1-20.
64. Bökel, C. and N.H. Brown, *Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix*. Dev Cell, 2002. **3**(3): p. 311-21.
65. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
66. Lu, P., et al., *Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(12).

67. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. Acta Biomater, 2009. **5**(1): p. 1-13.
68. Afratis, N., et al., *Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment*. Febs j, 2012. **279**(7): p. 1177-97.
69. Durbeej, M., *Laminins*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 259-68.
70. Singh, P., C. Carraher, and J.E. Schwarzbauer, *Assembly of fibronectin extracellular matrix*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2010. **26**: p. 397-419.
71. Lenselink, E.A., *Role of fibronectin in normal wound healing*. Int Wound J, 2015. **12**(3): p. 313-6.
72. Theocharis, A.D., et al., *Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting*. Febs j, 2010. **277**(19): p. 3904-23.
73. Ricard-Blum, S., *The collagen family*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(1): p. a004978.
74. Kadler, K.E., et al., *Collagens at a glance*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 12): p. 1955-8.
75. Brodsky, B. and A.V. Persikov, *Molecular structure of the collagen triple helix*. Adv Protein Chem, 2005. **70**: p. 301-39.
76. Everts, V., et al., *Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling*. Histochem J, 1996. **28**(4): p. 229-45.
77. Ku, C.H., et al., *Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(3): p. 548-56.
78. Mithieux, S.M. and A.S. Weiss, *Elastin*. Adv Protein Chem, 2005. **70**: p. 437-61.
79. Sherratt, M.J., et al., *Fibrillin-rich microfibrils of the extracellular matrix: ultrastructure and assembly*. Micron, 2001. **32**(2): p. 185-200.
80. Sakai, L.Y., D.R. Keene, and E. Engvall, *Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils*. J Cell Biol, 1986. **103**(6 Pt 1): p. 2499-509.
81. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
82. Romanic, A.M., et al., *Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9*. Cardiovasc Res, 2002. **54**(3): p. 549-58.
83. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
84. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
85. Storz, G. and J.A. Imlay, *Oxidative stress*. Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(2): p. 188-94.
86. Brandt, U., *Oxidoreduktasen und oxidativer Stress*, in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2014. p. 252-256.
87. Bayir, H., *Reactive oxygen species*. Crit Care Med, 2005. **33**(12 Suppl): p. S498-501.
88. Halliwell, B., *Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis*. Br J Exp Pathol, 1989. **70**(6): p. 737-57.
89. Bannister, J.V., et al., *The generation of hydroxyl radicals following superoxide production by neutrophil NADPH oxidase*. FEBS Lett, 1982. **150**(2): p. 300-2.
90. Motohashi, N. and I. Mori, *Superoxide-dependent formation of hydroxyl radical catalyzed by transferrin*. FEBS Lett, 1983. **157**(1): p. 197-9.
91. Gutteridge, J.M., *Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides*. FEBS Lett, 1986. **201**(2): p. 291-5.
92. Kell, D.B., *Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases*. BMC Med Genomics, 2009. **2**: p. 2.

93. Svineng, G., et al., *The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function*. *Connect Tissue Res*, 2008. **49**(3): p. 197-202.
94. Vignais, P.V., *The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism*. *Cell Mol Life Sci*, 2002. **59**(9): p. 1428-59.
95. Ushio-Fukai, M., et al., *p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(38): p. 23317-21.
96. Meier, B., et al., *The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct*. *Biochem J*, 1993. **289 ( Pt 2)**(Pt 2): p. 481-6.
97. Dröge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
98. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **279**(6): p. L1005-28.
99. Sena, L.A. and N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. *Mol Cell*, 2012. **48**(2): p. 158-67.
100. Manyak, M.J., et al., *Photodynamic therapy*. *J Clin Oncol*, 1988. **6**(2): p. 380-91.
101. Kochevar, I.E. and R.W. Redmond, *Photosensitized production of singlet oxygen*. *Methods Enzymol*, 2000. **319**: p. 20-8.
102. Politzer, I.R., G.W. Griffin, and J.L. Laseter, *Singlet oxygen and biological systems*. *Chem Biol Interact*, 1971. **3**(2): p. 73-93.
103. Zou, Z., et al., *Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy*. *Apoptosis*, 2017. **22**(11): p. 1321-1335.
104. 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.
105. Nauta, J.M., et al., *Photodynamic therapy of oral cancer. A review of basic mechanisms and clinical applications*. *Eur J Oral Sci*, 1996. **104**(2 ( Pt 1)): p. 69-81.
106. Senge, M.O. and J.C. Brandt, *Temoporfin (Foscan®; 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)--a second-generation photosensitizer*. *Photochem Photobiol*, 2011. **87**(6): p. 1240-96.
107. Ma, L.W., E. Bjørklund, and J. Moan, *Photochemotherapy of tumours with mesotetrahydroxyphenyl chlorin is pH dependent*. *Cancer Lett*, 1999. **138**(1-2): p. 197-201.
108. Zimmermann, A., M. Ritsch-Marte, and H. Kostron, *In vitro investigation on the pH dependence of the absorption and fluorescence properties of the photosensitizer mTHPC*. *Photochem Photobiol*, 2002. **75**(4): p. 335-8.
109. Cramers, P., et al., *Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(2): p. 283-90.
110. Whelpton, R., et al., *Distribution and excretion of radiolabeled temoporfin in a murine tumor model*. *Photochem Photobiol*, 1996. **63**(6): p. 885-91.
111. An, W., et al., *Spectroscopic and molecular modeling of the binding of meso-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin to human serum albumin*. *Dyes and Pigments*, 2009. **81**(1): p. 1-9.
112. Michael-Titus, A.T., R. Whelpton, and Z. Yaqub, *Binding of temoporfin to the lipoprotein fractions of human serum*. *Br J Clin Pharmacol*, 1995. **40**(6): p. 594-7.
113. Triesscheijn, M., et al., *The pharmacokinetic behavior of the photosensitizer meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin in mice and men*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007. **60**(1): p. 113-22.
114. Shao, J.S., et al., *Vascular Bmp Msx2 Wnt signaling and oxidative stress in arterial calcification*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1117**: p. 40-50.

115. Malekmohammad, K., R.D.E. Sewell, and M. Rafieian-Kopaei, *Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects*. Biomolecules, 2019. **9**(8).
116. Kattoor, A.J., et al., *Oxidative Stress in Atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2017. **19**(11): p. 42.
117. Yoshida, H. and R. Kisugi, *Mechanisms of LDL oxidation*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(23-24): p. 1875-82.
118. Beaudoux, J.L., et al., *Resistance of lipoprotein(a) to lipid peroxidation induced by oxygenated free radicals produced by gamma radiolysis: a comparison with low-density lipoprotein*. Biochem J, 1996. **314** ( Pt 1)(Pt 1): p. 277-84.
119. Kovanen, P.T. and M.O. Pentikäinen, *Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: a novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque*. Trends Cardiovasc Med, 1999. **9**(3-4): p. 86-91.
120. Camejo, G., et al., *Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis*. Atherosclerosis, 1998. **139**(2): p. 205-22.
121. Neufeld, E.B., et al., *Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix*. Atherosclerosis, 2014. **233**(1): p. 113-21.
122. Mohty, D., et al., *Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(1): p. 187-93.
123. 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.
124. Miller, Y.I., *Toll-like receptors and atherosclerosis: oxidized LDL as an endogenous Toll-like receptor ligand*. Future Cardiol, 2005. **1**(6): p. 785-92.
125. Park, H.S., et al., *Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3589-93.
126. Boström, K., et al., *Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1800-9.
127. Lincoln, J., A.W. Lange, and K.E. Yutzey, *Hearts and bones: shared regulatory mechanisms in heart valve, cartilage, tendon, and bone development*. Dev Biol, 2006. **294**(2): p. 292-302.
128. Nadlonek, N.A., et al., *ox-LDL induces PiT-1 expression in human aortic valve interstitial cells*. J Surg Res, 2013. **184**(1): p. 6-9.
129. Meng, X., et al., *Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(1): p. C29-35.
130. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 233-41.
131. Jensen, E.D., A.K. Nair, and J.J. Westendorf, *Histone deacetylase co-repressor complex control of Runx2 and bone formation*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2007. **17**(3): p. 187-96.
132. Shao, J.S., J. Cai, and D.A. Towler, *Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(7): p. 1423-30.
133. Côté, C., et al., *Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis*. Heart, 2008. **94**(9): p. 1175-80.
134. Mahmut, A., et al., *Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(5): p. 460-9.
135. Li, F., et al., *Oxidized low-density lipoprotein promotes osteoblastic differentiation of valvular interstitial cells through RAGE/MAPK*. Cardiology, 2015. **130**(1): p. 55-61.

136. Frangogiannis, N.G., *Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities*. Mol Aspects Med, 2019. **65**: p. 70-99.
137. Hinton, R.B., Jr., et al., *Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves*. Circ Res, 2006. **98**(11): p. 1431-8.
138. Kaden, J.J., et al., *Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis*. Cardiovasc Pathol, 2005. **14**(2): p. 80-7.
139. Satta, J., et al., *Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis*. Ann Thorac Surg, 2003. **76**(3): p. 681-8; discussion 688.
140. Edep, M.E., et al., *Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis*. Cardiovasc Pathol, 2000. **9**(5): p. 281-6.
141. Fondard, O., et al., *Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors*. Eur Heart J, 2005. **26**(13): p. 1333-41.
142. Perrotta, I., et al., *New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review*. Histopathology, 2011. **59**(3): p. 504-13.
143. Bossé, Y., et al., *Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves*. Circ Cardiovasc Genet, 2009. **2**(5): p. 489-98.
144. Matilla, L., et al., *A Role for MMP-10 (Matrix Metalloproteinase-10) in Calcific Aortic Valve Stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. **40**(5): p. 1370-1382.
145. Filip, D.A., A. Radu, and M. Simionescu, *Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells*. Circ Res, 1986. **59**(3): p. 310-20.
146. Merryman, W.D., et al., *Correlation between heart valve interstitial cell stiffness and transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H224-31.
147. Walker, G.A., I.A. Guerrero, and L.A. Leinwand, *Myofibroblasts: molecular crossdressers*. Curr Top Dev Biol, 2001. **51**: p. 91-107.
148. Hinton, R.B. and K.E. Yutzey, *Heart valve structure and function in development and disease*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 29-46.
149. Gu, X. and K.S. Masters, *Regulation of valvular interstitial cell calcification by adhesive peptide sequences*. J Biomed Mater Res A, 2010. **93**(4): p. 1620-30.
150. Xu, S., A.C. Liu, and A.I. Gotlieb, *Common pathogenic features of atherosclerosis and calcific aortic stenosis: role of transforming growth factor-beta*. Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(4): p. 236-47.
151. Chen, J.H., et al.,  *$\beta$ -catenin mediates mechanically regulated, transforming growth factor- $\beta$ 1-induced myofibroblast differentiation of aortic valve interstitial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 590-7.
152. Pho, M., et al., *Cofilin is a marker of myofibroblast differentiation in cells from porcine aortic cardiac valves*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(4): p. H1767-78.
153. Warnock, J.N., et al., *Gene Profiling of Aortic Valve Interstitial Cells under Elevated Pressure Conditions: Modulation of Inflammatory Gene Networks*. Int J Inflamm, 2011. **2011**: p. 176412.
154. Walker, G.A., et al., *Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease*. Circ Res, 2004. **95**(3): p. 253-60.
155. Cushing, M.C., J.T. Liao, and K.S. Anseth, *Activation of valvular interstitial cells is mediated by transforming growth factor-beta1 interactions with matrix molecules*. Matrix Biol, 2005. **24**(6): p. 428-37.
156. Aikawa, E., et al., *Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves*. Vol. 13. 2004. 841-7.

157. Liu, A.C. and A.I. Gotlieb, *Transforming growth factor-beta regulates in vitro heart valve repair by activated valve interstitial cells*. The American journal of pathology, 2008. **173**(5): p. 1275-1285.
158. Schenke-Layland, K., et al., *Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves*. Matrix Biol, 2004. **23**(2): p. 113-25.
159. Schürch, W., et al., *The intermediate filament cytoskeleton of myofibroblasts: an immunofluorescence and ultrastructural study*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1984. **403**(4): p. 323-36.
160. Sudoh, T., et al., *Brain natriuretic peptide-32: N-terminal six amino acid extended form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **155**(2): p. 726-32.
161. Hall, C., *Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP*. Eur J Heart Fail, 2004. **6**(3): p. 257-60.
162. Maalouf, R. and S. Bailey, *A review on B-type natriuretic peptide monitoring: assays and biosensors*. Heart Fail Rev, 2016. **21**(5): p. 567-78.
163. McDonagh, T.A., et al., *Left ventricular dysfunction, natriuretic peptides, and mortality in an urban population*. Heart, 2001. **86**(1): p. 21-6.
164. Horstkotte, D. and F. Loogen, *The natural history of aortic valve stenosis*. Eur Heart J, 1988. **9 Suppl E**: p. 57-64.
165. Schlant, R.C. and D.O. Nutter, *Heart failure in valvular heart disease*. Medicine (Baltimore), 1971. **50**(5): p. 421-51.
166. Richards, A.M., et al., *Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction*. Circulation, 1998. **97**(19): p. 1921-9.
167. Bergler-Klein, J., et al., *Natriuretic peptides predict symptom-free survival and postoperative outcome in severe aortic stenosis*. Circulation, 2004. **109**(19): p. 2302-8.
168. Rodeheffer, R.J., *Measuring plasma B-type natriuretic peptide in heart failure: good to go in 2004?* J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(4): p. 740-9.
169. Nessmith, M.G., et al., *Usefulness of an elevated B-type natriuretic peptide in predicting survival in patients with aortic stenosis treated without surgery*. Am J Cardiol, 2005. **96**(10): p. 1445-8.
170. Weber, M., et al., *Relation of N-terminal pro B-type natriuretic peptide to progression of aortic valve disease*. Eur Heart J, 2005. **26**(10): p. 1023-30.
171. Bergler-Klein, J., et al., *B-type natriuretic peptide in low-flow, low-gradient aortic stenosis: relationship to hemodynamics and clinical outcome: results from the Multicenter Truly or Pseudo-Severe Aortic Stenosis (TOPAS) study*. Circulation, 2007. **115**(22): p. 2848-55.
172. Metra, M., et al., *The role of plasma biomarkers in acute heart failure. Serial changes and independent prognostic value of NT-proBNP and cardiac troponin-T*. Eur J Heart Fail, 2007. **9**(8): p. 776-86.
173. Pedrazzini, G.B., et al., *Comparison of brain natriuretic peptide plasma levels versus logistic EuroSCORE in predicting in-hospital and late postoperative mortality in patients undergoing aortic valve replacement for symptomatic aortic stenosis*. Am J Cardiol, 2008. **102**(6): p. 749-54.
174. Lancellotti, P., et al., *Prognostic effect of long-axis left ventricular dysfunction and B-type natriuretic peptide levels in asymptomatic aortic stenosis*. Am J Cardiol, 2010. **105**(3): p. 383-8.
175. Clavel, M.A., et al., *B-type natriuretic peptide clinical activation in aortic stenosis: impact on long-term survival*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(19): p. 2016-25.
176. Goodman, A., et al., *Synergistic Utility of Brain Natriuretic Peptide and Left Ventricular Strain in Patients With Significant Aortic Stenosis*. J Am Heart Assoc, 2016. **5**(1).

177. Cao, Z., Y. Jia, and B. Zhu, *BNP and NT-proBNP as Diagnostic Biomarkers for Cardiac Dysfunction in Both Clinical and Forensic Medicine*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(8).
178. Nakatsuma, K., et al., *B-type natriuretic peptide in patients with asymptomatic severe aortic stenosis*. *Heart*, 2019. **105**(5): p. 384-390.
179. Collins, T.J., *ImageJ for microscopy*. *Biotechniques*, 2007. **43**(1 Suppl): p. 25-30.
180. Shen, M., et al., *Blood, tissue and imaging biomarkers in calcific aortic valve stenosis: past, present and future*. *Curr Opin Cardiol*, 2018. **33**(2): p. 125-133.
181. Buetow, B.S. and M.A. Laflamme, *Cardiovascular*, in *Comparative Anatomy and Histology*. 2018. p. 163-189.
182. Hinton, R.B., Jr., et al., *Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(6): p. H2480-8.
183. Boon, A., et al., *Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve*. *Heart*, 1997. **78**(5): p. 472-4.
184. Sider, K.L., M.C. Blaser, and C.A. Simmons, *Animal models of calcific aortic valve disease*. *Int J Inflam*, 2011. **2011**: p. 364310.
185. 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.
186. Towler, D.A., et al., *Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(46): p. 30427-34.
187. Tkatchenko, T.V., et al., *Lack of periostin leads to suppression of Notch1 signaling and calcific aortic valve disease*. *Physiol Genomics*, 2009. **39**(3): p. 160-8.
188. Marechaux, S., et al., *Identification of tissue factor in experimental aortic valve sclerosis*. *Cardiovasc Pathol*, 2009. **18**(2): p. 67-76.
189. Assmann, A., et al., *The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model*. *Biomaterials*, 2014. **35**(26): p. 7416-28.
190. Drolet, M.C., M. Arsenault, and J. Couet, *Experimental aortic valve stenosis in rabbits*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **41**(7): p. 1211-7.
191. Ngo, D.T., et al., *Vitamin D(2) supplementation induces the development of aortic stenosis in rabbits: interactions with endothelial function and thioredoxin-interacting protein*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **590**(1-3): p. 290-6.
192. Toda, T., D.E. Leszczynski, and F.A. Kummerow, *The role of 25-hydroxy-vitamin D3 in the induction of atherosclerosis in swine and rabbit by hypervitaminosis D*. *Acta Pathol Jpn*, 1983. **33**(1): p. 37-44.
193. Welsh, P., et al., *Circulating 25OHD, dietary vitamin D, PTH, and calcium associations with incident cardiovascular disease and mortality: the MIDSPAN Family Study*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(12): p. 4578-87.
194. Yang, L., et al., *Protective role of the vitamin D receptor*. *Cell Immunol*, 2012. **279**(2): p. 160-6.
195. Bae, S., et al., *Vitamin D signaling pathway plays an important role in the development of heart failure after myocardial infarction*. *J Appl Physiol* (1985), 2013. **114**(8): p. 979-87.
196. Beveridge, L.A. and M.D. Witham, *Vitamin D and the cardiovascular system*. *Osteoporos Int*, 2013. **24**(8): p. 2167-80.
197. van Ballegooijen, A.J., et al., *Serum vitamin D and parathyroid hormone in relation to cardiac structure and function: the ICELAND-MI substudy of AGES-Reykjavik*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(6): p. 2544-52.
198. Wang, X., et al., *Cardioprotective effect of calcitriol on myocardial injury induced by isoproterenol in rats*. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2013. **18**(4): p. 386-91.

199. Eren, E., et al., *Heart valve disease: the role of calcidiol deficiency, elevated parathyroid hormone levels and oxidative stress in mitral and aortic valve insufficiency*. Redox Rep, 2014. **19**(1): p. 34-9.
200. Wang, H., et al., *Vitamin D receptor activation may play a protective role in myocardial ischemic/reperfusion injury*. Int J Cardiol, 2016. **203**: p. 267-8.
201. Manucha, W. and L.I. Juncos, *The protective role of vitamin D on the heart and the kidney*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2017. **11**(1): p. 12-9.
202. Molinari, C., et al., *1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells*. Cell Physiol Biochem, 2011. **27**(6): p. 661-8.
203. Martins, D., et al., *Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Arch Intern Med, 2007. **167**(11): p. 1159-65.
204. Isaia, G., et al., *Prevalence of hypovitaminosis D in elderly women in Italy: clinical consequences and risk factors*. Osteoporos Int, 2003. **14**(7): p. 577-82.
205. Reid, D., et al., *The relation between acute changes in the systemic inflammatory response and plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations after elective knee arthroplasty*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(5): p. 1006-11.
206. Li, C., S. Xu, and A.I. Gotlieb, *The response to valve injury. A paradigm to understand the pathogenesis of heart valve disease*. Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(3): p. 183-90.
207. Ettenson, D.S. and A.I. Gotlieb, *Centrosomes, microtubules, and microfilaments in the reendothelialization and remodeling of double-sided in vitro wounds*. Lab Invest, 1992. **66**(6): p. 722-33.
208. Niepmann, S.T., et al., *Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype*. Clin Res Cardiol, 2019. **108**(8): p. 847-856.
209. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13659.
210. Shiva Shankar Reddy, C.S., et al., *In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**(8): p. 1355-64.
211. Devi, S.A., et al., *Intermittent hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat erythrocytes: protective effects of vitamin E, vitamin C, and carnitine*. Cell Biochem Funct, 2007. **25**(2): p. 221-31.
212. Asha Devi, S., et al., *Adaptations of the antioxidant system in erythrocytes of trained adult rats: impact of intermittent hypobaric-hypoxia at two altitudes*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2005. **140**(1): p. 59-67.
213. Lingabathula, H. and N. Yellu, *Evaluation of oxidative stress induction in rats following exposure to silver nanorods*. Toxicol Mech Methods, 2017. **27**(4): p. 272-278.
214. Schnelle, M., et al., *NADPH oxidase-4 promotes eccentric cardiac hypertrophy in response to volume overload*. Cardiovasc Res, 2019.
215. Lee, S.Y., et al., *Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 10.
216. Song, R., et al., *Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(11): p. 2711-20.
217. Pomerance, A., *Ageing changes in human heart valves*. Br Heart J, 1967. **29**(2): p. 222-31.
218. Kim, K.M., et al., *Aging changes in the human aortic valve in relation to dystrophic calcification*. Hum Pathol, 1976. **7**(1): p. 47-60.
219. Hulthe, J. and B. Fagerberg, *Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(7): p. 1162-7.

220. Tsimikas, S., et al., *Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **353**(1): p. 46-57.
221. Cominacini, L., et al., *Enhanced plasma levels of oxidized low-density lipoprotein increase circulating nuclear factor-kappa B activation in patients with unstable angina*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(5): p. 799-806.
222. Wu, T., et al., *Is plasma oxidized low-density lipoprotein, measured with the widely used antibody 4E6, an independent predictor of coronary heart disease among U.S. men and women?* J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(5): p. 973-9.
223. Farré, N., et al., *Prognostic value of NT-proBNP and an adapted monin score in patients with asymptomatic aortic stenosis*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2014. **67**(1): p. 52-7.
224. Banovic, M., et al., *Diagnostic value of NT-proBNP in identifying impaired coronary flow reserve in asymptomatic moderate or severe aortic stenosis*. Biomark Med, 2013. **7**(2): p. 221-7.
225. Nishimura, R.A., et al., *2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. Circulation, 2017. **135**(25): p. e1159-e1195.
226. Antova, E., et al., *Nt-ProBNP Discriminatory Role Between Symptomatic and Asymptomatic Patients with Severe Valvular Aortic Stenosis*. Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki), 2018. **39**(1): p. 15-28.
227. Barbieri, F., et al., *Long-Term Prognostic Value of High-Sensitivity Troponin T Added to N-Terminal Pro Brain Natriuretic Peptide Plasma Levels Before Valve Replacement for Severe Aortic Stenosis*. Am J Cardiol, 2019. **124**(12): p. 1932-1939.
228. Jiang, H., et al., *NT-proBNP and postoperative heart failure in surgery for aortic stenosis*. Open Heart, 2019. **6**(1): p. e001063.
229. Petracca, F., et al., *Usefulness of NT-proBNP in the assessment of patients with aortic or mitral regurgitation*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2009. **10**(12): p. 928-32.
230. Sainger, R., et al., *Comparison of transesophageal echocardiographic analysis and circulating biomarker expression profile in calcific aortic valve disease*. J Heart Valve Dis, 2013. **22**(2): p. 156-65.
231. Orłowska-Baranowska, E., et al., *Brain natriuretic peptide as a marker of left ventricular hypertrophy in patients with aortic stenosis*. J Heart Valve Dis, 2008. **17**(6): p. 598-605.
232. Ferrari, G., et al., *Validation of plasma biomarkers in degenerative calcific aortic stenosis*. J Surg Res, 2010. **163**(1): p. 12-7.
233. Kirschner, C.M., et al., *Clickable, photodegradable hydrogels to dynamically modulate valvular interstitial cell phenotype*. Adv Healthc Mater, 2014. **3**(5): p. 649-57.
234. Porras, A.M., et al., *Robust Generation of Quiescent Porcine Valvular Interstitial Cell Cultures*. J Am Heart Assoc, 2017. **6**(3).
235. Kloxin, A.M., J.A. Benton, and K.S. Anseth, *In situ elasticity modulation with dynamic substrates to direct cell phenotype*. Biomaterials, 2010. **31**(1): p. 1-8.
236. Ali, M.S., et al., *Correlation between valvular interstitial cell morphology and phenotypes: A novel way to detect activation*. Tissue Cell, 2018. **54**: p. 38-46.
237. Gould, S.T., et al., *The role of valvular endothelial cell paracrine signaling and matrix elasticity on valvular interstitial cell activation*. Biomaterials, 2014. **35**(11): p. 3596-606.
238. Wang, H., et al., *Hydrogels preserve native phenotypes of valvular fibroblasts through an elasticity-regulated PI3K/AKT pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(48): p. 19336-41.
239. Wang, H., et al., *Redirecting valvular myofibroblasts into dormant fibroblasts through light-mediated reduction in substrate modulus*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e39969.
240. Carbone, T., et al., *A step towards standardization: A method for end-point titer determination by fluorescence index of an automated microscope. End-point titer determination by fluorescence index*. J Immunol Methods, 2018. **456**: p. 67-71.

241. Hinz, B., *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 526-37.
242. Arimura, K., et al., *Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(1): p. H68-75.
243. Memet, C., et al., *Evaluation of the Role of Oxidative Stress in Degenerative Aortic Stenosis*. J Heart Valve Dis, 2015. **24**(4): p. 445-50.
244. Davila, M.L., *Photodynamic therapy*. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2011. **21**(1): p. 67-79.
245. Scolletta, S., et al., *NT-proBNP changes, oxidative stress, and energy status of hypertrophic myocardium following ischemia/reperfusion injury*. Biomed Pharmacother, 2007. **61**(2-3): p. 160-6.
246. Carlucci, F., et al., *Cardiac surgery: myocardial energy balance, antioxidant status and endothelial function after ischemia-reperfusion*. Biomed Pharmacother, 2002. **56**(10): p. 483-91.
247. Krishnamurthy, V.K., et al., *Maladaptive matrix remodeling and regional biomechanical dysfunction in a mouse model of aortic valve disease*. Matrix Biol, 2012. **31**(3): p. 197-205.
248. Hagar, A., et al., *Incidence, Predictors, and Outcome of Paravalvular Leak after Transcatheter Aortic Valve Implantation*. J Interv Cardiol, 2020. **2020**: p. 8249497.
249. Masjedi, S., et al., *Comparison of calcification potential of valvular interstitial cells isolated from individual aortic valve cusps*. Cardiovasc Pathol, 2016. **25**(3): p. 185-194.