Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Charakterisierung der myokardialen Adaptation und valvulären Umbauprozesse in einem murinen Modell der Aortenklappenstenose

Dissertation

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

vorgelegt von
Fabian Keyser
2023

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Tobias Zeus

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Alexander Albert

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Quast, C., F. Kober, K. Becker, E. Zweck, J. Hoffe, C. Jacoby, V. Flocke, I. Gyamfi-Poku, F. Keyser, K. Piayda, R. Erkens, S. Niepmann, M. Adam, S. Baldus, S. Zimmer, G. Nickenig, M. Grandoch, F. Bönner, M. Kelm, and U. Flögel. 2022. 'Multiparametric MRI identifies subtle adaptations for demarcation of disease transition in murine aortic valve stenosis', *Basic Res Cardiol*, 117: 29.

Quast C, Bönner F, Polzin A, Veulemans V, Gyamfi Poku I, Chennupati R, Nankinova M, Staub N, Jokiel J, Keyser F, Hoffe J, Becker K, Leuders Pia, Zako S, Erkens R, Jung C, Flögel U, Neidlin M, Steinseifer U, Niepmann ST, Zimmer S, Feelisch M, Zeus T, Kelm M. Aortic valve stenosis induced occult hemoglobin release promotes endothelial dysfunction. medRxiv 2022.12.01.22282891; doi: https://doi.org/10.1101/2022.12.01.22282891

Zusammenfassung

Als häufigste Herzklappenerkrankung der westlichen Welt führt die degenerative Aortenklappenstenose – vor allem bei älteren Patienten – häufig zu plötzlich eintretenden kardialen Symptomen. Die zumeist lange asymptomatisch verlaufende Aortenklappensklerose und die bei Auftreten von Symptomen bereits oft weit fortgeschrittene Erkrankung mit wenigen Therapieoptionen, bis auf den interventionellen und chirurgischen Klappenersatz, stellen eine besondere Schwierigkeit dar. Bisherige Tiermodelle der Aortenklappenstenose konnten die Erkrankung im Menschen nur mäßig abbilden. 2014 wurde ein neues murines Modell der Aortenklappenstenose entwickelt, in dem per direkter mechanischer Verletzung der Aortenklappen eine Stenose schnell und reproduzierbar induziert werden konnte. Das Ziel dieser Arbeit war daher, dieses neue Modell der murinen Aortenklappenstenose weiter zu charakterisieren. Methodisch wurden hierzu funktionelle Messungen der linksventrikulären myokardialen Parameter sowie des Koronarflusses an murinen Herzen mit mechanisch induzierter Aortenklappenstenose sowie altersgematchten unoperierten Versuchstieren in der Langendorff-Perfusion ex vivo durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine histologische Aufarbeitung der veränderten Aortenklappen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten erhöhte linksventrikuläre Druckparameter sowie basal erhöhte koronararterielle Flüsse in Versuchstieren mit induzierter Aortenklappenstenose. Niedrigere prozentuale Anstiege dieser Parameter in pharmakologischen sowie ischämischen „Stresssituationen“ bei den Stenosetieren, zeigten jedoch eine Einschränkung der kontraktilen sowie koronaren Reserve in diesen Tieren. Damit weisen die in dieser Arbeit erhobenen Daten auf eine myokardiale Hypertrophie sowie eine Einschränkung der koronaren Flussreserve als zentrale Mechanismen myokardialer und koronarer Adaptationsprozesse der Aortenklappenstenose hin. Auch Messungen der ATP-Konzentrationen nach induzierter Globalischämie zeigen hier eine Einschränkung der koronarvaskulären Autoregulation. Diese Ergebnisse unterstützen dabei die aktuell bestehende klinische Forschung, die eine myokardiale Hypertrophie sowie verminderten Koronarfluss auch im Menschen gehäuft in Zusammenhang mit einer Aortenklappenstenose zeigen konnte. In dieser Arbeit ist es nun gelungen, diese Phänomene im murinen Modell zu charakterisieren. Valvuläre Umbauprozesse der murinen Aortenklappen nach operativer Stenoseinduktion zeigen histologisch eine progrediente Auftreibung der Klappentaschen vergleichbar mit der humanen Situation.

Zusammenfassend zeigt das neue murine Modell der Aortenklappenstenose zu der humanen Erkrankung vergleichbare Pathomechanismen. Im Verlauf sind hier weiterführende Studien notwendig, um das Modell weiter zu charakterisieren.

Abstract

As the most common valvular heart disease in the Western world, degenerative aortic valve stenosis often leads to sudden onset of cardiac symptoms - especially in elderly patients. The progredient aortic sclerosis oftentimes stays asymptomatic for a long time resulting in a usually already far advanced degree of aortic valve stenosis when symptoms appear, with few therapeutic options except for interventional and surgical valve replacement, which poses a particular difficulty in clinical management of the disease. In 2014, a new murine model of aortic valve stenosis was developed in which stenosis could be induced rapidly and reproducibly via direct mechanical injury to the aortic valves. Since previous models of aortic valve stenosis in animal models only moderately represent the disease in humans, the aim of this work was therefore to further characterize this new model of murine aortic valve stenosis.

Methodologically, functional measurements of left ventricular myocardial parameters and coronary flow were performed in murine hearts with mechanically induced aortic valve stenosis and age-matched unoperated experimental animals in Langendorff perfusion ex vivo. In addition, histological examinations of the altered aortic valves were performed.

The results of this doctoral thesis showed increased left ventricular pressure parameters as well as basally increased coronary arterial flows in experimental animals with induced aortic valve stenosis. However, lower percentage increases of these parameters in pharmacological as well as ischemic "stress" situations in experimental animals with aortic stenosis, showed a limitation of contractile as well as coronary reserve in these animals. Thus, the data collected in this dissertation point to myocardial hypertrophy as well as limitation of coronary flow reserve as central mechanisms in the pathogenesis of aortic valve stenosis. Measurements of ATP concentrations after induced global ischemia also show a limitation of coronary vascular autoregulation in this case. These results also support the currently existing clinical research, which also show myocardial hypertrophy as well as reduced coronary flow clustered in humans with aortic valve stenosis. Valvular remodeling processes of injured aortic valves in mice show progressive distension and thickening of the valve leaflets mimicking human disease.

In conclusion, the new murine model of aortic valve stenosis shows pathomechanisms comparable to the human disease. Additional studies are needed here to further characterize the model.

Abkürzungsverzeichnis

Δ	*Delta/Differenz*
µm	*Mikrometer*
µmol	*Mikromol*
ACE	*angiotensin-converting-enzyme*
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	*American Heart Association*
aHTN	*arterielle Hypertonie*
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
AÖF	*Aortenklappenöffnungsfläche*
ApoE	Apolipoprotein E
AS	*Aortenklappenstenose*
ATP	*Adenosintriphosphat*
AV	*Atrioventrikulär*
AVA	aortic valve area
C57BL/6J	*verwendeter Labormaus-Stamm*
CAVD	*chronic aortic valve disease*
CD	cluster of differentiation
COPD	*chronic obstructive pulmonary disease*
CT	*Computertomographie*
DP	*developed pressure*
dPmax/dt	*Differenz des maximalen Druckaufbaus*
dPmin/dt	Differenz des maximalen Druckabbaus
EKG	*Elektrokardiogramm*
eNOS	*endotheliale NO-Synthase*
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
g	*Gramm*
IGF-1	*Insulin-like-Growth-Factor-1*
IL	*Interleukin*
KHK	*Koronare Herzkrankheit*
KO	*knock-out*
KÖF	*(Aorten-)Klappenöffnungsfläche*
l	*Liter*
LANUV	*Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW*
LDL	low density lipoprotein
LP(a)	*Lipoprotein a*
LV	*Linker Ventrikel*
LVEF	*Linksventrikuläre Ejektionsfraktion*
mm	*Millimeter*
mm²	*Quadratmillimeter*
mmHg	*Millimeter Quecksilbersäule*
MMP	*Matrix-Metalloproteasen*
n	*Anzahl*
NO	*Stickstoffmonooxid*
NSTEMI	*non-ST-elevatory myocardal infarction*
NT-pro-BNP	N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid
OD	*Optische Dichte*
p	Signifikanzwert
pAVK	*periphere arterielle Verschlusskrankheit*

PBS	*Phosphate buffered saline*
PED	*enddiastolic pressure*
PES	*endsystolic pressure*
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	*Proteinkinase A*
PLC	*Phospholipase C*
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB-Ligand
RIVA	*Ramus interventricularis anterior*
s	*Sekunde*
SAVR	Surgical aortic valve replacement
SD	*Standardabweichung ("standard deviation")*
STEMI	*ST-elevatory myocardial infarction*
TAC	*Transversal Aortic Constriction*
TAVI	transcatheter aortic-valve implantation
TGF	*transforming growth factor*
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNFα	*Tumor-Nekrose-Faktor α*
TTE	*Transthorakale Echokardiographie*
VEC	*vascular endothelial cells*
VIC	*vascular interstitial cells*
VO_2max	*Maximale Sauerstoffaufnahmekapazität*
vWF	*von-Willebrand-Faktor*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung ... 1

1.1. Allgemein ... 1

1.2. Epidemiologie ... 1

1.3. Ätiologie/Pathophysiologie ... 3

1.4. Symptomatik ... 5

1.5. Diagnostik ... 7

1.6. Therapie ... 9

1.7. Mausmodelle der Aortenklappenstenose ... 11

1.8. Wire injury ... 12

1.9. Ziele der Arbeit ... 13

2. Material und Methoden ... 14

2.1. Versuchstiere ... 14

2.2. Gruppengröße und statistische Analyse ... 14

2.3. Allgemeiner Ablauf der Versuchsreihe ... 14

2.4. Voroperation zur Induktion einer Aortenklappenstenose ... 15

2.5. Ultraschalluntersuchungen ... 17

2.6. Langendorff-Perfusion isolierter Herzen ... 18

2.6.1. Langendorff-Perfusat ... 18

2.6.2. Injektionsnarkose ... 19

2.6.3. Herzentnahme, Präparation und Anschluss an die Langendorff-Anlage ... 19

2.6.4. Langendorff-Anlage ... 20

2.6.5. Perfusion isolierter Herzen ex vivo ... 23

2.6.6. Messwerte der Langendorff-Perfusion ... 24

2.6.7. Applizierte Pharmaka ... 25

2.6.8. ATP-Messungen im Langendorff-Efluat ... 28

2.6.9. Säuberung der Langendorff-Anlage 30
2.7. Verwendete Chemikalien 30
2.8. Histologische Untersuchungen der Aortenklappe 31
2.8.1. Entnahme, Präparation und Einbettung der Herzen 31
2.8.2. Schneiden der Herzen am Kryotom 31
2.8.3. Färbung der Herzschnitte 32
2.8.4. Digitalisierung der histologischen Bilder, gemessene sowie errechnete Werte 33
3. Ergebnisse 35
3.1. Langendorff-Perfusion 35
3.1.1. Koronarfluss 36
3.1.2. Linksventrikuläre Druckparameter 39
3.1.3. Mausgewicht, Herzgewicht und Ratio 43
3.1.4. ATP-Messungen im Langendorff-Efluat 45
3.2. Histologische Untersuchungen 46
3.2.1. Morphologische Veränderungen der Aortenklappe 46
3.2.2. Klappendicke und Klappenfläche 48
4. Diskussion 50
4.1. Mausmodelle und „wire injury“ 50
4.2. Langendorff-Perfusion 51
4.2.1. Koronarfluss und koronare Reagibilität 51
4.2.2. Myokardhypertrophie und „kontraktile Reserve“ 55
4.3. Histologische Untersuchungen 56
4.4. Limitationen dieser Arbeit 58
4.5. Zusammenfassung und Ausblick 59
5. Literatur- und Quellenverzeichnis 61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: LaPlace-Gesetz 5
Abbildung 2: Diagnosekriterien der schweren Aortenklappenstenose 8
Abbildung 3: Versuchsreihe in zeitlichem Zusammenhang 15
Abbildung 4: Schematische Darstellung des "wire injury" 16
Abbildung 5: Intraoperative transthorakale Echokardiographie 17
Abbildung 6: Flussgeschwindigkeiten über der Aortenklappe in der Echokardiographie. 18
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Langendorff-Anlage mit perfundiertem Herzen 22
Abbildung 8: schematische Darstellung des Versuchsablaufes während der Langendorff-Perfusion ex vivo 24
Abbildung 9: Struktur- und Summenformel Bradykinin 26
Abbildung 10: Struktur- und Summenformel Adenosin 27
Abbildung 11: Struktur- und Summenformel Isoproterenol 28
Abbildung 12: Enzymatisch katalysierte Phosphorylierung von Glycerin in Abhängigkeit von ATP 29
Abbildung 13: Lambert-Beersches Gesetz 29
Abbildung 14: Protokoll der Hämatoxylin/Eosin-Färbungen an den angefertigten Präparaten 33
Abbildung 15: Schnittebene zur Analyse von Klappendicke und -fläche 34
Abbildung 16: Messungen der Präparationszeiten der Versuchsherzen in Vergleichs- und Stenosegruppe 35
Abbildung 17: Messungen des Koronarflusses im Protokollverlauf, nach Globalischämie sowie unter Applikation von vasoaktiven und inotropen Pharmaka in Vergleichs- und Stenosegruppe 37
Abbildung 18: Messungen der myokardialen linksventrikulären Druckparameter im Protokollverlauf in Vergleichs- und Stenosegruppe 40
Abbildung 19: prozentuale Veränderungen der linksventrikulären Druckparameter unter Einfluss der einzelnen Medikamentenapplikationen in Vergleichs- und Stenosegruppe 42
Abbildung 20: Gesamtkörpergewicht- sowie Herzgewicht der Versuchstiere sowie Quotient aus beiden Messparametern in Vergleichs- und Stenosegruppe 44

Abbildung 21: Messung der ATP-Konzentration im Langendorff-Efluat nach Globalischämie 45
Abbildung 22: Übersichtsaufnahmen der Aortenklappe in der Vergleichs- und Stenosegruppe..... 46
Abbildung 23: Aortenklappenebene von Herzen der Vergleichs- und Stenosegruppe..... 47
Abbildung 24: Messungen von Klappenfläche und Klappendicke in Vergleichs- und Stenosegruppe..... 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung Langendorff-Perfusat mit angegebenen Konzentrationen sowie der entsprechenden Einwaage für einen Liter des Langendorff-Perfusats..... 19
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien in den Langendorff-Versuchen mit Herstellerangaben 30

1. Einleitung

1.1. Allgemein

Die kalzifizierende Aortenklappenstenose führt als eine der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen der westlichen Welt – vor allem mit steigendem Alter – oft zu plötzlich eintretenden kardialen Symptomen mit erhöhter Hospitalisierungsrate sowie Mortalität. Im Gegensatz zu der alten Meinung, dass diese Aortenklappenstenosen vor allem eine degenerative Komponente haben, zeigten neue Studien, dass in der Pathogenese der Sklerosierung der Aortenklappe bis hin zur Aortenklappenstenose vor allem auch komplex regulierte chronische Entzündungsprozesse maßgeblich sind.

Dabei stellt sich die Problematik dar, dass die Erkrankung zumeist erst in fortgeschrittenem Stadium symptomatisch wird und die konservativ-medikamentösen Therapieoptionen schnell ausgeschöpft sind. Daher stehen zur Behandlung der Erkrankung vor allem der chirurgische oder interventionelle Klappenersatz im Vordergrund, die mit möglichen Komplikationen für die Patienten einhergehen.

1.2. Epidemiologie

Vor allem in der westlichen Welt zeigt sich eine Häufung von Aortenklappenstenosen bei älteren Patienten. Diese hohe Prävalenz ist dabei analog zu der von atherosklerotischen Gefäßveränderungen – wie bspw. bei KHK, der pAVK und der Karotisstenose – durch ihre chronisch entzündliche langjährige Entwicklung zu erklären. Neben Aortenklappenstenosen durch rheumatisches Fieber, zu denen in hiesigen Populationen ein vergleichsweise geringer Prozentsatz gehört, und die bikuspide Klappe, fällt in die Kategorie der senilen (degenerativen/kalzifizierenden) Aortenklappenstenose über die Hälfte der valvulären Aortenstenosen (Baumgartner et al. 2009).

Als häufigste Erkrankung der Herzklappen, die in der westlichen Welt zu einer Operation oder Katheterintervention führt (Baumgartner et al. 2017), und dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung neben der koronaren Herzkrankheit (KHK) und arteriellen Hypertonie (aHTN) ('Calcific aortic stenosis' 2016) liegt dabei die Prävalenz einer moderaten bis schweren Aortenklappenstenose – ohne signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern – in jungem Alter unter 44 Jahren deutlich unter 1% (0,02% (Thaden, Nkomo, and Enriquez-Sarano 2014)) und erhöht sich mit steigendem Alter bis auf ca. 1,2

– 6% (Thaden, Nkomo, and Enriquez-Sarano 2014; Osnabrugge et al. 2013) bei einer Population über 75 Jahren. In dieser älteren Population liegt bei etwa 3% der Menschen eine schwere Aortenklappenstenose vor, die bei über 75% der Patienten auch symptomatisch ist (Osnabrugge et al. 2013; Thaden, Nkomo, and Enriquez-Sarano 2014).

Als Vorstufe einer degenerativen Aortenklappenstenose kommt eine Aortenklappensklerose auch in jüngeren Altersgruppen mit ca. 10% bei 50-60-Jährigen deutlich gehäuft vor. Bei Menschen über 80 Jahren wird das Vorhandensein einer Aortenklappensklerose sogar bei über 40% der Bevölkerung angegeben. Auch diese geht bereits mit einer Erhöhung der kardiovaskulären Mortalität einher und eine Progression zu einer Aortenklappenstenose wird dabei mit ca. 2% pro Jahr in allen Altersgruppen vermutet (Coffey, Cox, and Williams 2014).

Aufgrund der aktuellen demographischen Veränderungen mit einer älter werdenden Gesellschaft zum Einen und einer hohen Dunkelziffer von unentdeckten, asymptomatischen Klappenvitien (d'Arcy et al. 2016) zum Anderen wird mit einer deutlichen Erhöhung der Prävalenz degenerativ veränderter Aortenklappen und konsekutiv -stenosen in den nächsten Jahren gerechnet (Dweck, Boon, and Newby 2012).

Aufgrund der oft initial symptomarmen pathophysiologischen Veränderungen der Aortenklappe sowie des Myokards bis hin zur Entwicklung einer ausgeprägten Aortenklappenstenose ist auch die Prävalenz der Aortenklappenstenose bei Auftreten anderer atherosklerotisch bedingter kardialer Erkrankungen deutlich erhöht. So zeigten sich bei Patienten mit akutem ST-Hebungs-Infarkt (*ST-elevatory myocardial infarction*; STEMI) eine Häufung von als Zufallsdiagnose entdeckten Aortenklappenstenosen (Singh et al. 2021), die dann auch mit einer verschlechterten Prognose einhergingen. Eine erhöhte Mortalität konnte dabei auch bei Myokardinfarkten ohne von EKG-Veränderungen, also auch Nicht-ST-Hebungsinfarkten (Non-*ST-elevatory myocardial infarction; NSTEMI*) gezeigt werden (Mizutani et al. 2022). In der klinischen Situation ist hier besonders der Umstand erschwerend, dass typische Angina-pectoris-Beschwerden sowohl beim akuten Myokardinfarkt bei koronarer Herzerkrankung (KHK) als auch bei der Aortenklappenstenose ein Kardinalsymptom sind und eine Häufung beider Entitäten vor allem im höheren Alter zu beobachten ist.

1.3. Ätiologie/Pathophysiologie

Die Entstehung einer kalzifizierenden Aortenklappenstenose ist geprägt durch einen langjährigen Prozess, der über eine chronische Entzündungsreaktion, Fibrosierung und Kalziumeinlagerungen mit der Zeit zu einer Verdickung der Klappentaschen und so einer Einengung der Ausflussbahn des linken Ventrikels führt. Mit sinkender Öffnungsfläche der Aortenklappe entsteht eine Erhöhung der linksventrikulären Nachlast und es resultieren Adaptationsmechanismen im Sinne einer Hypertrophie des Myokards.

Risikofaktoren

Allgemeine irreversible Risikofaktoren sind vor allem ein hohes Alter und das weibliche Geschlecht (Boon et al. 1997), beim Nikotinabusus als Risikofaktor wird eine Reversibilität beschrieben (Larsson, Wolk, and Bäck 2017). Außerdem sind neben vermehrtem mechanischem Stress auf die Klappe – wie beispielsweise bei einer Bikuspidie mit nur zwei Klappentaschen – oder Stoffwechselveränderungen im Sinne eines metabolischen Syndroms (bestehend aus Adipositas, arterieller Hypertonie, Insulinresistenz und einer kombinierten Fettstoffwechselstörung (Saklayen 2018; Chu et al. 2016)) auch genetische Faktoren, wie bspw. Veränderungen im Gen für Lipoprotein a, die zu einer erhöhten Expression führen (LP(a))(Yeang, Wilkinson, and Tsimikas 2016; Zheng et al. 2019; Thanassoulis et al. 2013), bekannt, die das Risiko für die Entwicklung einer kalzifizierenden Aortenklappenstenose erhöhen.

Aufbau der Aortenklappe

Die Aortenklappe garantiert den gerichteten Fluss des Blutes in der linken Ausflussbahn des Herzens in den Körperkreislauf. Sie stellt sicher, dass in der Diastole kein Blut zurück in den linken Ventrikel gelangen kann und ist daher für viele Jahre starkem mechanischem Stress ausgesetzt. Die nur ca. 1mm dicken Klappentaschen sind dafür in drei Schichten aufgebaut, die diesen Voraussetzungen besonders gut gewappnet sind. Die gesamte Klappe ist von Endothelzellen umgeben, die weiteren Schichten gliedern sich wie folgt: Die erste an die Endothelzellen angrenzende Schicht vom Ventrikel aus betrachtet ist die Lamina ventricularis, die vor allem aus elastischen Kollagenfasern besteht. Daran schließt sich die Lamina spongiosa mit lockerem Bindegewebe an, auf der aortalen Seite der Klappe endet sie mit der Lamina fibrosa, die vor allem aus Typ-1 Kollagen aufgebaut ist (Singh and Torzewski 2019).

Aortenklappenstenose und Atherosklerose

Aufgrund von starken Überschneidungen bezüglich der Risikofaktoren für die Entstehung atherosklerotischer Erkrankungen zum einen und degenerativer Aortenklappenstenosen zum anderen, wird vermutet, dass die zu Grunde liegenden Pathomechanismen sehr ähnlich sind (Agmon et al. 2001). Analog zu Erkrankungen mit atherosklerotischer Ursache ist die Entwicklung einer kalzifizierten stenosierenden Klappe geprägt von chronisch-entzündlichen und komplex regulierten Umbauprozessen der Klappentaschen.

Zu Beginn des Pathomechanismus steht meist eine Endothelverletzung (Hulin et al. 2018) und endotheliale Dysfunktion der Klappentaschen oder Gefäßwand (Gibbons and Dzau 1996) durch mechanischen Stress. Bei atherosklerotischen Plaques kommt es in der Folge zur pathologischen Einlagerung von Lipiden und Lipoproteinen (Zhu et al. 2018), die ihrerseits eine lokale Entzündungsreaktion und eine Migration von Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten auslöst (Pirillo et al. 2018). Diese lokale Entzündungsreaktion begünstigt die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und oxidierten Lipoproteinen, die maßgeblich an der nachfolgenden Kalzifikation beteiligt sind (Hulin et al. 2018). In den Klappentaschen findet so neben einer Aktivierung von Endothelzellen („vascular endothelial cells“; VEC) – die im Normalzustand die Integrität der Zellen des Intersititums („vascular interstitial cells“; VIC) und damit die Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix maßgeblich mitbestimmen ('Valvular Endothelial Cells Regulate the Phenotype of Interstitial Cells in Co-culture: Effects of Steady Shear Stress' 2006) – auch eine vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL1, TGFβ, TNFα und konsekutiv IL6 und IL8 durch eingewanderte Monozyten (Kaden et al. 2003) statt, wodurch eine Differenzierung von ruhenden interstitiellen Fibroblasen vor allem zu Myofibrolasten (Rabkin-Aikawa et al. 2004) stimuliert wird (Singh and Torzewski 2019).

Diese – durch parakrine Reize und inflammatorische Zytokine ausgelöste – Differenzierung der interstitiellen Zellen hat eine veränderte Sekretion der Extrazellulärmatrix zur Folge, die vor allem durch verschiedene Matrix-Metalloproteasen (MMP) und auch knochenspezifische extrazelluläre Matrixproteine wie bspw. Osteoprotegerin, RANK und RANKL gekennzeichnet ist. Daher liegen Osteoblasten-ähnliche Funktionen dieser aktivierten Myofibrolasten (Mohler et al. 1999; Mohler et al. 2001) und der Osteogenese ähnliche Mechanismen nahe. Diese unterscheiden sich jedoch bezüglich der Verteilung der kristallinen Knochenstrukturen von der Entstehung tatsächlicher Knochen (Bertazzo and Gentleman 2017).

Myokardiale Hypertrophie

Die verschiedenen Stadien und ineinander übergreifenden Prozesse in dieser Entwicklung kann man dabei als chronische kalzifizierende Aortenklappenkrankheit (engl. „chronic aortic valve disease"; CAVD) zusammenfassen (Mathieu and Arsenault 2017). Die Verdickung der einzelnen Klappentaschen zieht insgesamt eine Verkleinerung der Öffnungsfläche der Aortenklappe nach sich, was gleichzeitig eine Steigerung der linksventrikulären Nachlast mit sich bringt. In Anlehnung an das Gesetz nach LaPlace (siehe Abbildung 1) zielen die myokardialen Adaptationsmechanismen auf eine Reduktion der Wandspannung ab, die vor allem durch eine Erhöhung der ventrikulären Wanddicke durch Myokardhypertrophie sichergestellt wird (Carabello 2013):

$$K = P\ x\ \frac{r}{2xd}$$

Abbildung 1: LaPlace-Gesetz

Das LaPlace-Gesetz beschreibt die Veränderungen der Wandspannung (K) in Abhängigkeit von transmuralem Druck (P), Ventrikelradius (r) sowie der ventrikulären Wanddicke (d)

Mit Progress der Erkrankung und den Anforderungen an die Herzkontraktion kommt es jedoch neben der adaptiven Myokardhypertrophie auch zu einer vermehrten Apoptose von Myozyten und fibrotischen Umbauten (Natarajan and Prendergast 2017).

Zudem können die adaptiven Mechanismen im Verlauf der strukturellen Veränderungen und zunehmenden Einengung der Aortenklappe nur begrenzt zur Aufrechterhaltung des linksventrikulären Schlagvolumens und des systemischen Blutdrucks beitragen (Grimard, Safford, and Burns 2016) und es kommt mit verstärkter Hypertrophie zu einem Defizit der myokardialen Neovaskularisation mit konsekutivem Sauerstoffmangel (Rader et al. 2015), der wiederum für die Entstehung der typischen angino-pektinösen Beschwerden ursächlich ist.

1.4. Symptomatik

Die klassische Symptomtrias der Aortenklappenstenose besteht aus pektanginösen Beschwerden, Synkopen und Herzinsuffizienz mit Dyspnoe (Grimard, Safford, and Burns 2016; Otto 1998). Insgesamt ist ein Auftreten von Symptomen zumeist ein Zeichen einer schon weit fortgeschrittenen Erkrankung und mit einer darauffolgenden stark erhöhten Mortalität und dringendem Interventionsbedarf verbunden (Leon et al. 2010; Widder and

Bauersachs 2014). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Schwere der Stenose und einer beginnenden Symptomlast besteht jedoch dabei nicht (Kamperidis et al. 2016).

Synkopen

Synkopen zeigen dabei im weitesten Sinne ein Unvermögen des linken Ventrikels an, besonders bei körperlicher Belastung den zerebralen Blutdruck adäquat aufrecht erhalten zu können. Bei der Aortenklappenstenose basiert dieser Pathomechanismus vor allem auf der verkleinerten Klappenöffnungsfläche und dementsprechend – bei fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung – verringertem Fluss durch die Klappe, der bei erhöhtem Sauerstoffbedarf der Peripherie mit systemischer Vasodilatation nicht mehr ausreichend ist. Bei Patienten mit auftretenden Synkopen konnte dabei ein deutlich fortgeschrittenes Krankheitsstadium – gekennzeichnet durch deutliche Hypertrophie, Rechtsherzbelastung, Verringerung der Aortenklappenöffungsfläche (KÖF) und des linksventrikulären Schlagvolumens – gezeigt werden (Goliasch et al. 2019).

Angina pectoris

Analog zur Minderperfusion des Gehirns bewirken ähnliche Mechanismen auch ein Ungleichgewicht zwischen myokardialer Perfusion und Sauerstoffbedarf.

Trotz einer initialen Erweiterung der epikardialen Koronargefäße und dadurch erhöhte Flussraten zur Versorgung des hypertrophen Myokards – mit erhöhtem Sauerstoffbedarf – (Irvine and Kenny 1997), kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer zunehmend schlechteren Perfusion der Koronararterien und in weit fortgeschrittenen Stadien sogar zu einer systolischen Flussumkehr (Irvine and Kenny 1997), sodass der ohnehin schon geringe Anteil der systolischen Perfusion sogar ins Negative umgekehrt wird. Eine Kombination von verringerter Koronarreserve, erhöhter systolischer und diastolischer Wandspannung in Folge der Myokardhypertrophie und Tachykardien wird dabei als Ursache für pektanginöse Beschwerden bei Patienten mit hochgradigen Aortenklappenstenosen beschrieben (Gould 1997).

Herzinsuffizienz mit Dyspnoe

Je nach Quelle wird die Prävalenz einer Herzinsuffizienz – mit einer Erniedrigung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) < 50% - bei Patienten mit schwerer AS mit größeren Abweichungen bei ca. 25% angegeben (Kamperidis et al. 2016).

Eine Herzinsuffizienz kann, aufgrund vieler Komorbiditäten älterer Menschen – wie COPD, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit mit Atherosklerose und chronischen Nierenerkrankungen (Lindman and Patel 2016) – entsprechender Risikofaktoren der älter werdenden Gesellschaft, oft nicht sicher nur auf eine Aortenklappenstenose zurückgeführt werden. Das Auftreten typischer Symptome einer Herzinsuffizienz, wie bspw. Dyspnoe, ist jedoch assoziiert mit einer erhöhten Mortalität, wobei akute Dekompensationen dabei eine schlechtere Prognose mit sich bringen (Nagao et al. 2018).

1.5. Diagnostik

Eine ausführliche körperliche Untersuchung kann bei Erkrankten zum einen Zeichen einer Herzinsuffizienz wie bspw. pulmonal verminderte Atemgeräusche bei Pleuraergüssen oder Rasselgeräusche bei Lungenödemen, generalisierte Ödeme der unteren Extremitäten und Zyanosen aufdecken und zum anderen bei der Auskultation der Herztöne unter Umständen das für die Aortenklappenstenose typische spindelförmige Systolikum über dem 2. Interkostalraum rechts mit Ausstrahlung in die Karotiden (Grimard, Safford, and Burns 2016) aufzeigen. Vor allem der Auskultation wird bei der Erstdiagnose auch bei asymptomatischen Patienten eine wichtige Rolle beigemessen (Chiang et al. 2016). Außerdem sind beim Erstkontakt noch andere diagnostische Maßnahmen sinnvoll, die unspezifische Anzeichen für ein Klappenvitium geben können: die Blutdruckmessung kann beispielsweise eine systemische Hypotonie, das EKG eine Myokardhypertrophie bspw. durch einen (überdrehten) Linkslagetyp und eine Röntgenaufnahme des Thorax eine vergrößerte Herzsilhouette und ggf. Einengung des Retrokardialraums anzeigen.

Den apparativen Goldstandard zur Diagnose einer Aortenklappenstenose stellt die Echokardiographie dar. Neben der Messungen für die Feststellung des Schweregrades können in der Untersuchung auch andere Klappenvitien, die Aortenklappenanatomie, Vegetationen, Wanddicken – und Bewegunsveränderungen, sowie die linksventrikuläre Pumpleistung evaluiert werden (Baumgartner et al. 2017). Zu den essentiellen Messungen für die Diagnosestellung und vor allem Feststellung der Schwere der Stenosierung gehören die Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe, der transvalvuläre Druckgradient und die Aortenklappenöffnungsfläche (AÖF) (siehe Abb. 2 nach „2014 AHA/ACC Guidelines for the management of patients with valvular heart disease“ (Nishimura et al. 2014)).

V_{max} Aorta	≥ 4 m/s
Δ P LV/Aorta	> 40mmHg
KÖF/AVA	≤ 1,0 cm^2

Abbildung 2: Diagnosekriterien der schweren Aortenklappenstenose:

Die Diagnosekriterien der Aortenklappenstenose umfassen die maximale Flussgeschwindigkeit über Aortenklappe (V_{max} Aorta), den transvalvulärer Druckgradient über Aortenklappe (ΔP LV/Aorta), sowie die Klappenöffnungsfläche/"aortic valve area" (KÖF/AVA). Tabelle modifiziert nach den AHA-Leitlinien für die Aortenklappenstenose 2014 (Nishimura et al. 2014).

Eine weitere, feinere Aufgliederung der speziellen Unterentitäten in der Gruppe der schweren Aortenklappenstenosen erfolgt dann noch durch die Bestimmung des linksventrikulären Schlagvolumenindex (als Quotient aus Schlagvolumen und Körperoberfläche; angegeben in ml/m^2) und der Ejektionsfraktion. So gibt es neben der klassischen Stenose mit hohem Gradienten und normaler oder erniedrigter Ejektionsfraktion auch solche, bei denen – durch eine Kombination aus linkventrikulärer Dysfunktion und niedriger Ejektionsfraktion – der transvalvuläre Gradient nicht stark erhöht und die maximale Flussgeschwindigkeit niedriger als 4 m/s ist (Sathyamurthy and Jayanthi 2014). Gründe hierfür können neben der körperlichen Konstitution – also bspw. der Körpergröße – auch ein schlecht eingestellter Hypertonus mit Nachlasterhöhung sein. Zur Minimierung des Einflussfaktors der Konstitution, ist in dieser Gruppe ein Bezug der Aortenklappenöffnungsfläche (AÖF) auf die Körperoberfläche sinnvoll.

Bei einem zusätzlich erniedrigten Schlagvolumenindex des linken Ventrikels < 35 ml/m^2 – der seinerseits unterschiedliche Gründe, wie Vorhofflimmern, linksventrikuläre Dysfunktionen oder Mitralklappenvitien oder KHK haben kann – wird von einer *„low flow low gradient AS"* (Sathyamurthy and Jayanthi 2014) gesprochen, die wiederrum in eine klassische Form mit erniedrigter Ejektionsfraktion und eine paradoxe Form mit noch erhaltener Ejektionsfraktion > 50% unterteilt werden kann (ten Freyhaus and Baldus 2016). Diese Aufteilung ist wichtig in Bezug auf die Risikostratifizierung und Therapieentscheidung im Verlauf (Baumgartner et al. 2017).

In der Literatur werden auch Korrelationen der verschiedenen Typen einer schweren Aortenklappenstenose mit ihrer Pathophysiologie beschrieben. So ist eine *„high gradient*

normal flow AS“ mit einer stärkeren Kalzifikation verbunden als eine *„low gradient low flow AS“* (Bhattacharyya et al. 2016).

Andere bildgebende Verfahren wie eine CT-Aufnahme des Herzens zur Quantifizierung der Kalzifikation der Klappentaschen, die im Rahmen der Prognose und Risikostratifikation sinnvoll ist (Clavel et al. 2014), oder auch ein Kardio-MRT können durch genaue Darstellung der Größenverhältnisse und Anatomie der veränderten Klappen zusätzliche Informationen – vor allem auch in Hinblick auf potentiell bevorstehende Operationen und Interventionen – liefern (Baumgartner et al. 2017).

Zusätzlich zur bildgebenden Evaluation gibt es auch einige Biomarker, die bei schweren Aortenklappenstenosen verändert im Blut von Patienten gemessen werden können. Für die Messung von NT-pro-BNP (N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid), Fetuin-A – das bei erniedrigter Plasmakonzentration eine Rolle in der Kalzifizierung von Gefäßen spielt – und vWF (von-Willebrand-Faktor, einem wichtigen Protein der primären Hämostase), wurden in einem kombinierten Score hohe negativ prädiktive Werte für das Vorliegen einer schweren Aortenklappenstenose entdeckt (Elmariah et al. 2018). Außerdem könnte die Messung des NT-pro-BNP – das in Volumen- oder Drucküberlastungssituationen von Myozyten der Vorhöfe ausgeschüttet wird – sowohl prognostische Informationen liefern als auch Hinweise auf einen Interventionsbedarf bei asymptomatischen Patienten geben (Bergler-Klein, Gyongyosi, and Maurer 2014).

1.6. Therapie

Die Therapie der Aortenklappenstenose erweist sich – wie oben beschrieben – vor allem aufgrund des späten Symptombeginns als äußerst schwierig, da dem dann schon fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung durch medikamentöse Therapie oft nicht mehr beizukommen ist. Bei symptomatischen Patienten steht daher oftmals der chirurgische oder interventionelle Aortenklappenersatz im Vordergrund. Bei Zufallsbefunden und asymptomatischen Patienten ist die Devise zumeist ein sogenanntes *„Watchful Waiting“,* bei dem das Operations- bzw. Interventionsrisiko mit einem Progress der Erkrankung abgewogen werden muss (Grimard, Safford, and Burns 2016). Wichtige Determinanten in der Prognose sind – unabhängig von der Symptomlast der Patienten – solche, die den Schweregrad der Stenose anzeigen, also insbesondere die Maximalgeschwindigkeit über der Aortenklappe und die Klappenöffnungsfläche (Rosenhek et al. 2000; Stewart et al. 2010).

Die 5-Jahres-Überlebensraten bei Patienten mit asymptomatischer Aortenklappenstenose variieren dabei zwischen 15-50% je nach Ausprägung der Klappeneinengung (Otto et al. 1997). So ist eine Therapieentscheidung immer in Kombination aus der Symptomlast der Patienten, der linksventrikulären Ejektionsfraktion und des Schweregrades der Stenose zu treffen (Nishimura et al. 2014).

Letztlich ist die einzige kausale Therapie der Ersatz der veränderten Aortenklappe. Dieser kann im Allgemeinen entweder offen chirurgisch oder interventionell über ein Stentsystem erfolgen. Zum ersten Mal 2002 beim Menschen angewandt (Cribier 2012), hat sich die interventionelle Methode der transarteriellen Aortenklappenimplantation (engl. *„transcatheter aortic-valve implantation“* TAVI) in den Folgejahren vor allem als Alternative für alte, multimorbide Patienten mit entsprechend hohem Operationsrisiko gegenüber dem offen chirurgischen Klappenersatz (*„surgical aortic valve replacement“* SAVR) durchgesetzt (Smith et al. 2011; Makkar et al. 2012). Neuere Studien weisen nun darauf hin, dass auch Patienten mit weniger fortgeschrittenen Erkrankungen und geringerem Operationsrisiko von einer solchen TAVI profitieren könnten (Khan et al. 2017). Sowohl die chirurgische Therapie als auch die TAVI als kausale Therapien lösen dabei direkt die Pathophysiologie der erkrankten Klappe und sowohl der Druckgradient als auch die Aortenklappenöffnungsfläche werden schlagartig normalisiert. Wie bei jeder anderen Therapie in der Medizin auch, gibt es jedoch auch spezifische Komplikationen. Dazu gehören bei der TAVI bspw. Schlaganfall, Gefäßverletzungen sowie die Induktion höhergradiger AV-Blockierungen mit Notwendigkeit einer Schrittmacherimplantation (Reinöhl et al. 2013). Wie bereits weiter oben beschrieben ist ein erschwerender Umstand in der interventionellen oder chirurgischen Therapie der Aortenklappenstenose die oft bestehende Komorbidität der stenosierenden koronaren Herzerkrankung (KHK). Hier stehen neben der gleichzeitigen chirurgischen Bypass-Operation mit Aortenklappenersatz auch andere Therapieschemata mit kombinierter perkutanen Interventionsmethoden und Stent-Einlage sowie chirurgischem Aortenklappenersatz zur Verfügung (Paradis et al. 2014).

Die medikamentösen Therapieansätze umfassen vor allem Maßnahmen, die einer bestehenden Herzinsuffizienz unter der Aortenklappenstenose entgegenwirken sollen. Für ACE-Hemmer konnten positive Effekte wie eine verringerte Progressionsrate der Stenosierung und myokardialer Umbauprozesse gezeigt werden (Bull et al. 2015; Davin, Dulgheru, and Lancellotti 2015). Ansonsten richtet sich die Therapie der Herzinsuffizienz an den entsprechenden Leitlinien. Trotz einem Zusammenhang von hohen

Plasmakonzentrationen von Cholesterinen (*„low density lipoproteins*“; LDL-C) und der Entstehung einer Aortenklappenstenose (Smith et al. 2014), konnte eine Statintherapie eine vermehrte Aortenklappensklerose nicht verhindern (Seo et al. 2018). Für die Progression einer Aortenklappenstenose ist die Datenlage noch unklar und in randomisiert kontrollierten Studien konnte kein signifikanter positiver Effekt einer Statintherapie gezeigt werden (Zhao et al. 2016).

Es gibt also noch keine Evidenz für eine medikamentöse Therapie, die die Progression und das Outcome einer Aortenklappenstenose für den Patienten dauerhaft vorteilhaft verändern.

1.7. Mausmodelle der Aortenklappenstenose

Das bisherige Verständnis der Pathophysiologie und Ätiogenese der kalzifizierenden Aortenklappenstenose und die Identifizierung verschiedener molekularer Mechanismen in der Entstehung der klassischen valvulären Veränderungen, wurde zum großen Teil durch verschiedene Tiermodelle der Aortenklappenstenose erbracht.

Eine Untersuchung in Mausmodellen ist dabei – gegenüber anderen verfügbaren Großtiermodellen wie bspw. in Kaninchen und Schweinen – vor allem von Vorteil, da Mäuse eine schnelle Reproduktionsrate und Reifung aufweisen und darüber hinaus die Anzucht von KO-Mauslinien gut erprobt ist (Sider, Blaser, and Simmons 2011). Ein anderer, entscheidender Vorteil der Mausmodelle ist der Umstand, dass die dort veränderten Klappenverhältnisse auch tatsächlich bei dem Großteil der Versuchstiere hämodynamische Veränderungen – im Sinne einer Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit über der Aortenklappe, des transvalvulären Druckgradienten sowie einer myokardialen Hypertrophie (Barrick et al. 2009) – in den Mäusen nach sich ziehen (Miller, Weiss, and Heistad 2011).

Die bisher am häufigsten verwendeten murinen Versuchsreihen basieren auf Knock-Out Mauslinien, deren genetische Veränderungen sich insbesondere im Cholesterin- und Fettstoffwechsel manifestieren. Mäuse mit einem homozygoten genetischen Verlust des Apolipoproteins E (ApoE KO-Mäuse/Apo E $^{-/-}$) – einem Modell, das 1992 zur genaueren Erforschung der Pathophysiologie der Atherosklerose etabliert wurde (Plump et al. 1992; Zhang et al. 1992) – entwickeln beispielsweise mit steigendem Alter häufiger Aortenklappenstenosen, als Wildtypmäuse (Tanaka et al. 2005). ApoE hat vor allem die physiologische Funktion, insbesondere LDL-Cholesterin aus der Peripherie für die Verstoffwechselung zurück in die Leber zu transportieren (Getz and Reardon 2018). Der Verlust hat dementsprechend eine erhöhte Atheroskleroseneigung zur Folge, die sich auch in der Ausbildung von Aortenklappenstenosen zeigt. Außerdem wurde eine

antiinflammatorische Wirkung von ApoE auf Makrophagen gezeigt (Nissilä et al. 2018), die nahelegt, dass eine ApoE-Defizienz neben der entstehenden Hypercholesterinämie auch proinflammatorische Veränderungen nach sich zieht. Vermehrte fibrotische Aortenklappenstenosen mit eher geringem Anteil an Calciumeinlagerungen wurden in einem Mausmodell entdeckt, in dem zusätzlich zur Hypercholesterinämie durch ApoE-Defizienz auch eine arterielle Hypertonie – durch transgene Mäuse mit humanen Angiotensinogen- und Renin-Genen (Merrill et al. 1996) – etabliert wurde (Chu et al. 2016). Auch in Mauslinien mit einem homozygoten Verlust des LDL-Rezeptors (LDLr $^{-/-}$) (Ishibashi et al. 1993) können vermehrt erhöhte Plasmakonzentrationen von Cholesterinen und senile Aortenklappenstenosen beobachtet werden (Weiss et al. 2006). Im Verlauf entwickelten sich dann auch Knock-out-Mausmodelle mit induzierter diabetischer Stoffwechsellage (Le Quang et al. 2014). Aber auch ohne genetische Veränderungen im Fett- und Cholesterinstoffwechsel, wurde eine Verdickung der Aortenklappentaschen und eine Flussbeschleunigung über der Klappe durch eine fett- und kohlenhydratreiche Diät bei Wildtyp-Mäusen gezeigt (Drolet et al. 2006).

Darüber hinaus sind auch einige andere Mausmodelle bekannt, die bei der Erforschung der Pathophysiologie kalzifizierender Aortenklappenstenosen verwendet wurden. Neben den besprochenen diätetischen und genetischen Interventionen, gibt es auch solche Modelle, bei denen kongenitale Genveränderungen bikuspide oder malformierte Aortenklappen bewirken (Sider, Blaser, and Simmons 2011).

1.8. Wire injury

Die Entwicklung einer Aortenklappenstenose in den oben beschriebenen Modellen wird dabei primär durch eine veränderte Stoffwechsellage begünstigt, die Dauer bis zur Manifestation an den Klappentaschen ist daher sehr lang – bei Apo E -defizienten Tieren in etwa 10 Monate (Tanaka et al. 2005). Außerdem entwickeln je nach Mauslinie und Futter nur relativ wenige – teils nur knapp mehr als 50% (Miller, Weiss, and Heistad 2011) – der Tiere eine hämodynamisch relevante Stenose der Aortenklappe.

Da jedoch auch ein mechanischer Stress auf die Klappentaschen maßgeblich an der Pathogenese der Aortenklappenstenose beim Menschen beteiligt ist und die bestehenden Modelle – bis auf die bikuspide Aortenklappe und die induzierte arterielle Hypertonie – diesen Mechanismus nur zu einem geringen Maß abbilden, braucht es noch weitere Forschung auf diesem Gebiet. 2014 wurde ein neues murines Mausmodell mit direkter mechanischer Verletzung der Aortenklappe durch einen flexiblen Draht (*„wire injury“*)

etabliert (Honda et al. 2014), das schnell hämodynamisch relevante Stenosen liefert. In weiteren, auf diese folgenden, Studien konnte auch eine Determinierung des Schweregrads der Aortenklappenstenose – in Abhängigkeit des verwendeten Protokolls – erzielt werden (Niepmann et al. 2019)

Eine Charakterisierung dieser neuen Methode in Hinblick auf myokardiale Adaptationsmechanismen mittels funktioneller Beurteilung der Herzen im Langendorff-Modell ist bis dahin – nach bestem Wissen – noch nicht vorgenommen worden und soll nun wichtige Informationen zu myokardialen und valvulären Umbauprozessen in diesem neuen Modell der Aortenklappenstenose aufzeigen.

1.9. Ziel der Arbeit

Ziel der hier vorliegenden Dissertation ist die Charakterisierung des neuen murinen Modells der Aortenklappenstenose nach Honda et al. 2014 (Honda et al. 2014) in Hinblick auf myokardiale Adaptationsmechanismen und valvuläre Umbauprozesse auch bei mittelgradigen, mechanisch induzierten Aortenklappenstenosen. Hauptmethode zur Messung der myokardialen Druck- sowie koronaren Flussparameter stellt hierbei die Langendorff-Perfusion dar. Zur Objektivierung der valvulären Umbauprozesse wurde eine histologische Herangehensweise gewählt.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Alle folgenden Untersuchungen und Versuche wurden bei Wildtypmäusen der Reihe C57BL/6J (Jackson Laboratory, USA) durchgeführt. Den vorgenommenen Versuchen liegt ein vom zuständigen Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW (LANUV, Fachbereich 81, Recklinghausen, Deutschland) genehmigter Tierversuchsantrag (Referenznummer: 84-02.04.2017.A172) zu Grunde. Die Haltung der Tiere erfolgte in normierten Käfigen mit keimarmer Laboreinstreu und unbegrenztem Zugang zu Frischwasser und Futterpellets gemäß §3. Die folgenden Versuche wurden gemäß §8 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt. Im Vorfeld der Versuchsreihe wurde ein theoretisch-praktischer Tierversuchskundekurs nach §9 TierSchG absolviert und die Abschlussprüfung erfolgreich bestanden (FELASA Certificate ID: F048/16_#_0260).

2.2. Gruppengröße und statistische Analyse

Eine im Vorfeld durchgeführte Power-Analyse erbrachte eine notwendige Anzahl von n=6-8 zur Generierung statistisch relevanter Ergebnisse sowohl in der Langendorff-Perfusion der isolierten Herzen als auch der histologischen Aufarbeitung der Aortenklappen. Die Sammlung der Daten erfolgte tabellarisch mit Hilfe der Microsoft Excel®-Software (Fa. Microsoft Coop., Redmond, Washington, USA). Die graphische Darstellung sowie statistische Auswertung der generierten Daten erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism® (Fa. GraphPad Software Inc., Kalifornien, USA).

2.3. Allgemeiner Ablauf der Versuchsreihe

In Abb. 3 ist die zeitliche Aufteilung der Versuche in einem Zeitstrahl aufgetragen. Die Zuteilung der Versuchstiere zu Stenose- oder Kontrollgruppe erfolgte im Alter von 12 bis 16 Wochen (t_0). Die Stenosegruppe bilden Versuchstiere, bei denen per mechanischer Klappenverletzung (*„wire injury“*) nach standardisiertem Schema (s. Kapitel 4.4. „Voroperation zur Induktion einer Aortenklappenstenose“) eine Aortenklappenstenose induziert wurde. Als Kontrollgruppe wurden altersgematchte Versuchstiere verwendet, bei denen keine solche Operation durchgeführt wurde. Zur Diagnosestellung und Quantifizierung der Aortenklappenstenose wurden in der Stenosegruppe im Anschluss an die Induktionsoperation wöchentlich transthorakale Echokardiographien (TTE)

durchgeführt. Im Alter von jeweils 16 bis 20 Wochen (t_1), entsprechend vier Wochen nach der Operation in der Stenosegruppe, wurden entweder die myokardialen und koronararteriellen Parameter mittels Langendorff-Perfusion oder im zweiten Versuchsarm die mikroskopische Klappenmorphologie untersucht.

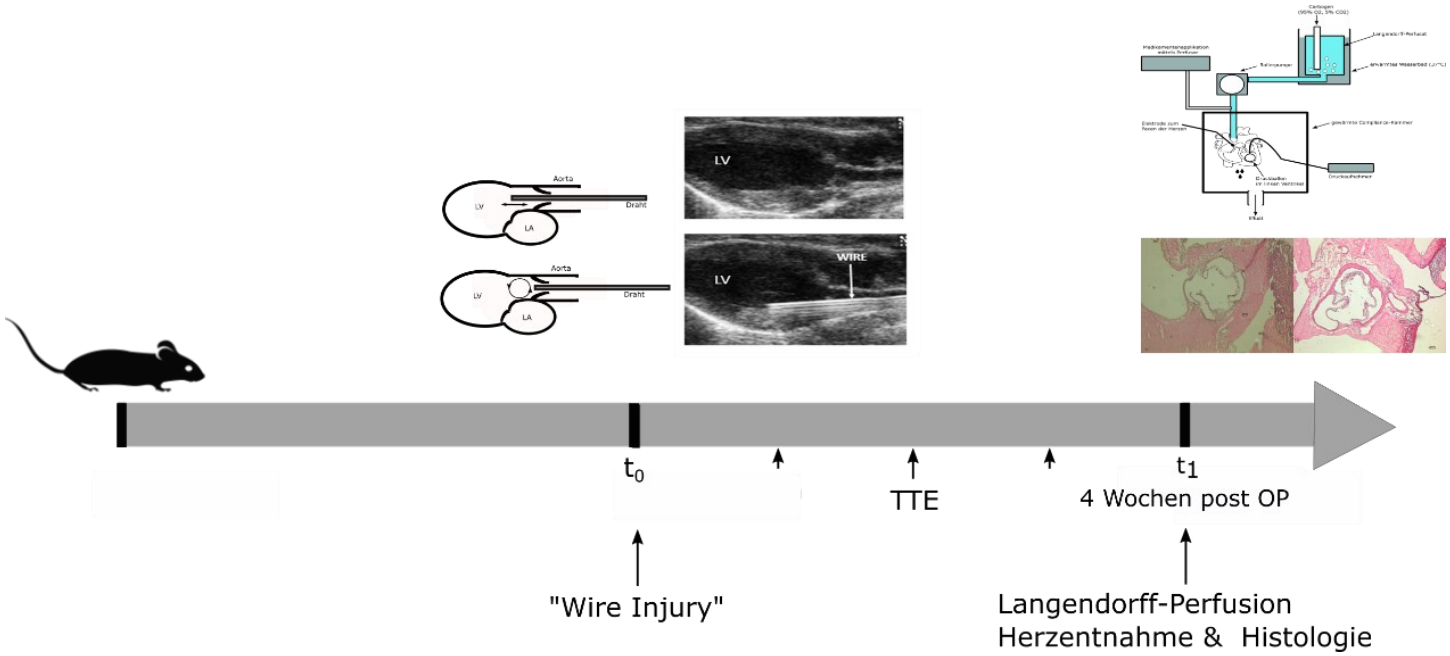


Abbildung 3: Versuchsreihe in zeitlichem Zusammenhang

Die Abbildung zeigt die zeitliche Abfolge der verschiedenen Versuchsarme in schematischer Weise. Nach stattgehabter „wire injury“ - im Alter von 12-16 Wochen der Versuchstiere – wird der Erfolg der Maßnahme mittels einwöchentlicher Echokardiographie (TTE) sichergestellt. 4 Wochen nach dem „wire injury“ werden die Herzen dann entnommen und entweder im Rahmen der Langendorff-Perfusion oder der histologischen Begutachtung weiterverwendet.

2.4. Voroperation zur Induktion einer Aortenklappenstenose

Die Induktion einer Aortenklappenstenose als Grundlage der Versuchsreihe (Honda et al. 2014) erfolgte als operativer Eingriff in balancierter Anästhesie. Vor Beginn der Operation wurde die Narkose der Versuchstiere mit Hilfe von S-(+)-Ketamin (Ketaset®, Fa. Zoetis, New Jersey, USA) in einer Dosierung von 100mg · $(kg \cdot KG)^{-1}$ und Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Fa. Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) in einer Dosierung von 5mg · $(kg \cdot KG)^{-1}$ eingeleitet. Nach Sicherstellung einer ausreichenden Narkosetiefe durch Induktion eines Schmerzreizes wurden die Versuchstiere zur Aufrechterhaltung von Oxygenierung und Narkose im Anschluss endotracheal intubiert (Vasofix Safety 20G, Fa. Sarstedt,

Deutschland). Nach Intubation wurden die Tiere auf dem Rücken liegend auf dem Operationstisch gelagert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Schere die Haut im Halsbereich eröffnet. Nach Präparation und Zügelung der linken A. carotis communis wurde durch einen kleinen Schnitt in die Arterie ein flexibler Draht über Carotis, Aorta ascendens und Aortenklappe bis in den linken Ventrikel eingeführt (siehe Abb. 4).

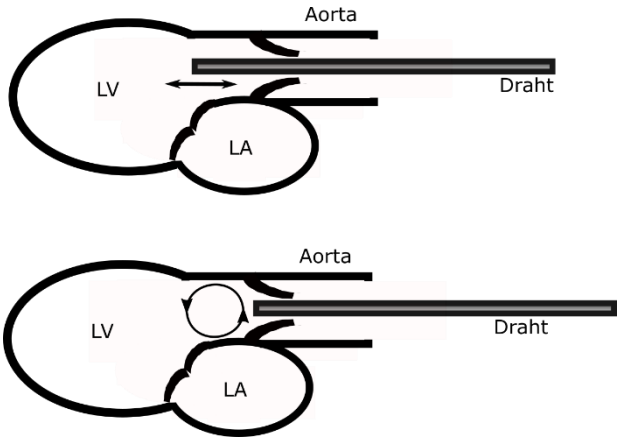


Abbildung 4: Schematische Darstellung des "wire injury"

Die Abbildung zeigt schematisch die Durchführung des „wire injury“. Diese mechanische Verletzung wird durch verschiedene Manöver erreicht. Zum einen durch Vorschub und Zurückziehen des Drahts über die Aorta in den linken Ventrikel (LV), siehe oberes Bild. Im unteren Bild ist eine Drehbewegung angedeutet, mittels derer der Draht in Aortenklappenebene rotiert wird. Der Vollständigkeit halber sind Mitralklappe sowie linker Vorhof (LA) mit abgebildet. Abbildung modifiziert nach Honda et al. (Honda et al. 2014).

Durch mechanische Manipulation in Form von Rotation sowie Vor- und Zurückschieben des Drahtes auf der Aortenklappenebene (jeweils 50x Vor- sowie Zurückschieben, jeweils 50x Rotation) wurde an dieser Stelle durch kleinste Verletzungen der Aortenklappe die Entwicklung einer Stenose im Verlauf induziert (siehe Abb. 4). Die richtige Platzierung des Drahtes im linken Ventrikel (LV) sowie die Manipulation an der Aortenklappe wurden dabei durchgängig echokardiographisch überwacht (siehe Abb. 5).

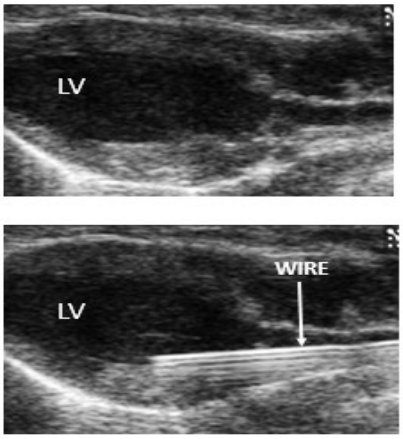


Abbildung 5: Intraoperative transthorakale Echokardiographie

Die Abbildungen zeigen echokardiographische Bilder des mechanischen „wire injury“. Im oberen Bild zeigt sich der linke Ventrikel (LV) ohne Draht, im unteren Bild sieht man dann deutlich den Draht (WIRE), der transaortal in die Mitte des linken Ventrikel geführt wurde.

Nach Abschluss der mechanischen Klappenverletzung wurde der Draht entfernt und die Inzision in der A. carotis communis sowie der zervikale Operationszugang mit Hilfe von Nähten verschlossen. Postoperativ erfolgte zur analgetischen Therapie eine subkutane Injektion von Buprenorphin in einer Dosierung von 0,05 - 2,5 mg · (kg · KG)$^{-1}$ (Temgesic®, Indivior Europe Lim., Dublin, Irland).

2.5. Ultraschalluntersuchungen

Der Erfolg der operativen Stenoseinduktion wurde anhand wöchentlicher echokardiographischer Untersuchungen der Versuchstiere überwacht. Die Untersuchungen erfolgten dabei mit einem speziell für Ultraschalluntersuchungen an kleinen Säugetieren konzipiertem Ultraschallgerät (Modell Vevo 3100, Fujifilm Visualsonics, Amsterdam, NL). In Vorbereitung auf die transthorakale Echokardiographie wurden die Versuchstiere in einer „Narkosebox“ mit Hilfe von Isofluran narkotisiert. In suffizienter Sedierung wurde nun der Thorax grob rasiert und übriggebliebene Haare mit Hilfe einer Enthaarungscreme (Fa. Veet, Heidelberg, Deutschland) entfernt, um eine bestmögliche Ankopplung der Ultraschallsonde zu gewährleisten. Die Versuchstiere wurden anschließend auf dem Rücken auf einer Wärmeplatte gelagert, um einer Auskühlung der Tiere mit Auswirkungen auf die kardiale Funktion vorzubeugen. Zusätzlich wurde die Körperkerntemperatur der Versuchstiere kontinuierlich über eine rektale Temperatursonde überwacht. Die Aufrechterhaltung der Sedierung erfolgte durch ein Isofluran- und Frischluftgemisch über eine Gesichtsmaske. Zur

kontinuierlichen EKG-Überwachung während der Echokardiographie wurden die Pfoten der Versuchstiere auf vier EKG-Elektroden platziert.

Auf diese Weise wurde 1- bis 2-wöchentlich je eine Untersuchung durchgeführt und so die Entstehung der Stenose quantifiziert, wobei als Referenzwert für die erhobenen Daten jeweils ein vor der Stenoseinduktion durchgeführtes TTE diente. Als diagnostische Hauptkriterien zur Klassifizierung der Aortenklappenstenose wurden die maximale Flussgeschwindigkeit über der Klappe sowie der transvalvuläre Druckgradient gemessen. In Abb. 6 sind exemplarisch Messungen der Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe bei einem Versuchstier vor und 4 Wochen nach Stenoseinduktion dargestellt.

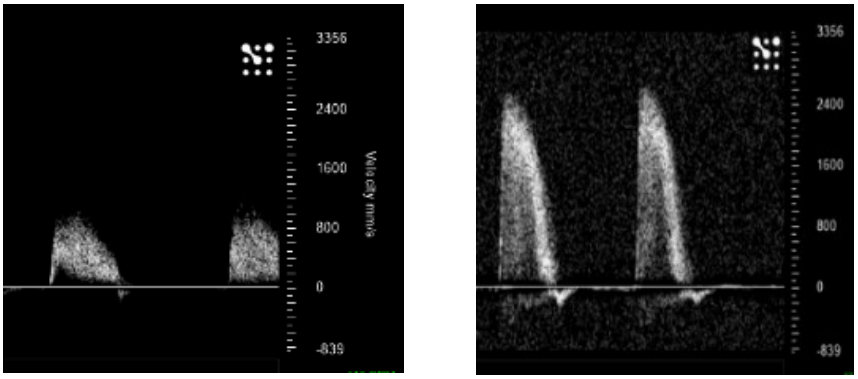


Abbildung 6: Flussgeschwindigkeiten über der Aortenklappe in der Echokardiographie

Die Abbildungen zeigen dopplersonographische Messungen der Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe vor (Bild links) und 4 Wochen nach (Bild rechts) Wire-injury-Operation. Auf der Abszisse ist kontinuierlich die Zeit (in Sekunden) aufgetragen, auf der Ordinate ist die Geschwindigkeit (in mm/s) aufgetragen. Nach ca. 4 Wochen zeigt sich hier eine deutliche Flussbeschleunigung im Rahmen der induzierten Aortenklappenstenose.

2.6. Langendorff-Perfusion isolierter Herzen

Zur Charakterisierung der myokardialen und koronararteriellen Adaptationsmechanismen wurden Untersuchungen in einem modifizierten Modell nach Langendorff (Langendorff 1895) am ex vivo schlagenden Herzen der Versuchstiere vorgenommen.

2.6.1. Langendorff-Perfusat

Die Perfusion der Herzen erfolgte über Langendorff-Perfusat, das einem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer entspricht. Dieses wurde am Vortag der Versuche frisch zubereitet und für maximal 2 Tage gelagert. Alle Bestandteile (siehe Tabelle 1) bis auf das Calciumchlorid wurden in destilliertem Wasser gelöst und anschließend das Perfusat für 15

Minuten mit Hilfe eines Rührfisches verrührt und mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) begast. Erst im Anschluss wurde das noch fehlende Calciumchlorid zugefügt, um ein Auskristallisieren vor der Carbogenbegasung zu verhindern. Zur Entfernung kleinster Rückstände und Staubpartikel wurde das Perfusat nun durch eine Nitrocellulose-Membran (Fa. GVS North America, Sanford, USA) gefiltert und bei 4°C gekühlt und lichtgeschützt bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 1: **Zusammensetzung Langendorff-Perfusat mit angegebenen Konzentrationen sowie der entsprechenden Einwaage für einen Liter des Langendorff-Perfusats**

Substanz	**Konzentration**	**Einwaage (1l Perfusat)**
Natriumchlorid (NaCl)	118 mM	6,9 g
Kaliumchlorid (KCl)	4,7 mM	0,35 g
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	0,8 mM	0,2 g
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	25 mM	2,09 g
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	1,2 mM	0,16 g
D-(+)-Glucose	5,0 mM	0,9 g
Natrium-Pyruvat	1,9 mM	0,22 g
Kalziumchlorid ($CaCl_2$)	2,5 mM	0,37 g

2.6.2. Injektionsnarkose

Die Anästhesie der Versuchstiere vor Beginn der Langendorff-Versuche erfolgte analog zur Narkose für die Stenoseinduktionsoperation durch eine Kombination von S-(+)-Ketamin (Ketaset®, Fa. Zoetis, New Jersey, USA) in einer Dosierung von $100mg \cdot (kg \cdot KG)^{-1}$ und Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Fa. Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) in einer Dosierung von $5mg \cdot (kg \cdot KG)^{-1}$.

2.6.3. Herzentnahme, Präparation und Anschluss an die Langendorff-Anlage

Nach Evaluation der Anästhesietiefe durch Setzen eines Schmerzreizes über dem Hinterlauf der Mäuse wurde zunächst das Operationsgebiet rasiert (favorita CL®, Aesculap®, Fa. B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) und die Tiere anschließend auf einem Operationstisch gelagert. Für die initial makroskopische Entfernung des Herz-Lungenpakets wurde die thorakale Haut mit einer groben Pinzette angehoben und linsenförmig mit einer Schere

entfernt. Daraufhin wurde der Thorax eröffnet und durch jeweils diagonale Schnitte unterhalb des Rippenbogens der Blick auf die intrathorakalen Organe freigelegt. Aorta descendens und Vena cava inferior wurden im Paket mit der Pinzette komprimiert, distal abgetrennt und dann aus dem Thorax gehoben. Über eine kraniale Durchtrennung der Vena cava superior, der Trachea sowie des Ösophagus konnte so das Herz-Lungen-Paket entfernt werden. Die weitere Präparation erfolgte feinchirurgisch unter einem Mikroskop (Nikon SMZ645, Fa. Nikon Metrology GmbH, Düsseldorf, Deutschland) in auf 4°C gekühltem Perfusat. Die Hypothermie hatte zum Ziel, für die Zeit der Präparation eine verringerte Herzaktivität und damit eine Kardioprotektion zu erreichen. Im Anschluss wurde überschüssiges Gewebe – vor allem die beiden Lungen, die große Thymusdrüse, Reste der Trachea und des Ösophagus sowie epikardiales Fettgewebe – entfernt. Die Aorta wurde zum Einführen einer Perfusionskanüle bis auf den Abgang des Truncus brachiocephalicus gekürzt und mit Hilfe einer kleinen Inzision im linken Vorhof wurde die spätere Implementierung eines Druckballons in den linken Ventrikel vorbereitet.

Über die Aorta wurden die Herzen auf die Perfusionskanüle aufgezogen und durch eine Ligatur mit Seide (Seraflex®, Stärke 5/0, Fa. SERAG-WIESSNER GmbH & CoKG) sicher befestigt. Dabei wurde streng darauf geachtet, die Kanüle nicht zu tief im aufsteigenden Aortenbogen zu platzieren, um eine ausreichende Perfusion der Koronarostien im Aortenbulbus zu gewährleisten. Unmittelbar im Anschluss wurde die Kanüle luftblasenfrei an das Langendorff-Gerät angeschlossen. Nach Beginn der Perfusion wurde dann ein größenadaptierter Druckballon zur kontinuierlichen Druckmessung über die Inzision im linken Vorhof durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingebracht. Außerdem wurde eine Elektrode zum beschleunigen (*„Pacen“*) der Versuchsherzen im Bereich des Vorhofseptums platziert, um durch eine Stimulation eine stabile Herzfrequenz von 600 Schlägen pro Minute aufrechtzuerhalten.

2.6.4. Langendorff-Anlage

Für die ex-vivo Perfusion der isolierten Herzen wurde das etablierte Langendorff-Modell (Langendorff 1895) verwendet. Die Untersuchungen erfolgten in einer speziell für Herzen kleiner Nagetiere entwickelten Langendorff-Anlage (IH-SR System for isolated small rodent heart, Fa. Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland).

Die Perfusion der Versuchsherzen erfolgte durch oben beschriebenes Langendorff-Perfusat. Dieses wurde während der Versuche in einem Wärmebad kontinuierlich auf 37°C erwärmt

und mit Carbogengas (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) begast. Durch die Begasung wurde zum einen die Oxygenierung des Perfusates sichergestellt und zum anderen über eine Neutralisierung des pH-Wertes physiologische Bedingungen geschaffen und eine Auskristallisierung von Salzen im Perfusat vermieden.

Das so vorbereitete Perfusat wurde über eine Rollerpumpe in die Langendorff-Anlage transportiert. Dort wurde das Perfusat wiederum gefiltert sowie über eine Luftfalle eventuell verbliebene Lufteinschlüsse entfernt. Mit konstantem Druck von 100mmHg wurde die Aorta retrograd mit dem Puffer perfundiert und die Flussrate kontinuierlich mit Hilfe eines ultraschallgestützten Flussmessers („flow probe“; TTFM2-Modul, Fa. Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) aufgezeichnet. Über die Aorta ascendens und den Aortenbulbus wurden die Ostien beider Koronararterien orthograd perfundiert, das Perfusat gelangte ins Myokard und später über myokardiale Venen und schlussendlich den Sinus coronarius in den rechten Vorhof, von wo aus das Perfusat das Herz über die obere und untere Hohlvene verlassen konnte. Neben der Erwärmung des Langendorff-Perfusates konnten durch die kontinuierliche Erwärmung der Schlauchsysteme des Langedorff-Perfusors und zusätzlich der die Herzen umgebenden Compliance-Kammer physiologische Temperaturen von ca. 37°C aufrechterhalten werden.

Über den Druckballon im linken Ventrikel konnten kontinuierlich Parameter zur Kontraktilität und Relaxation des Myokards sowie zu linksventrikulär aufgebrachten Drücken aufgezeichnet werden (siehe Kapitel 4.6.6. „Messwerte in Langendorff-Perfusion“). Über eine Infusionspumpe (Modell Precidor Typ 5003, Fa. Infors AG, Basel, CH) konnte während der Versuche die Applikation von verschiedenen Pharmaka in das einströmende Langendorff-Perfusat durch ein neben der Perfusionskanüle platziertes Schlauchsystem vorgenommen werden. Abbildung 7 zeigt schematisch den Aufbau des Langendorff-Perfusors inklusive der zuvor beschriebenen relevanten Komponenten.

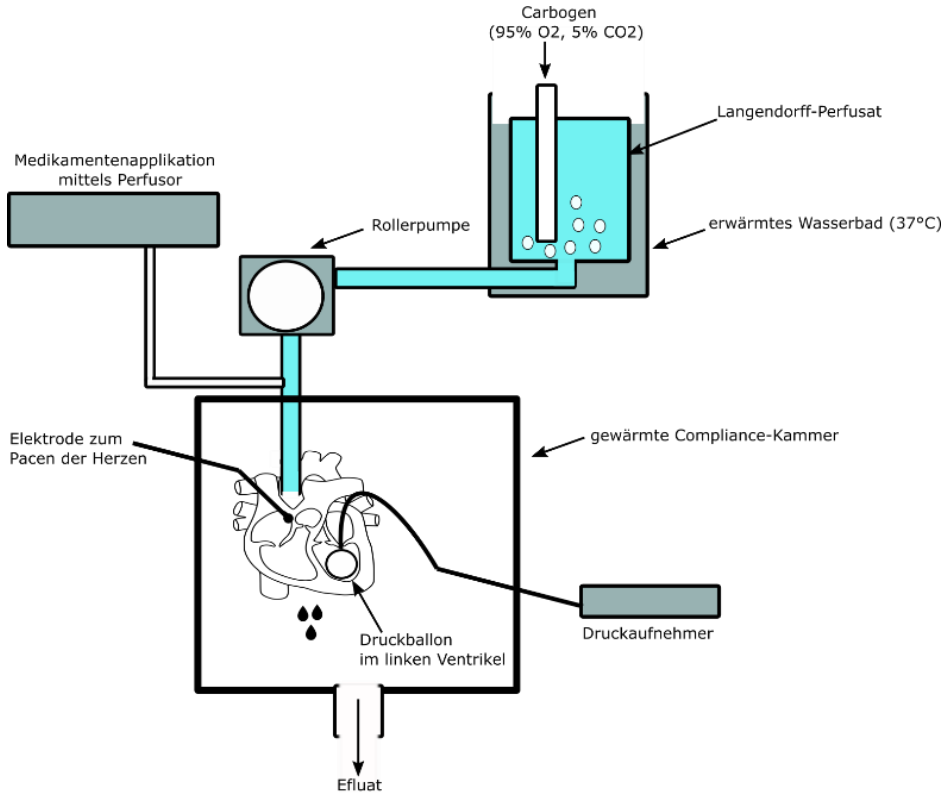


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Langendorff-Anlage mit perfundiertem Herzen

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau der Langendorff-Anlage. Mittig dargestellt zeigt sich hier das ex-vivo perfundierte Herz, das sich in einer gewärmten Compliance-Kammer befindet. Im Rahmen der Präparation wurde dieses über die Aorta ascendens auf eine Kanüle platziert. Über dieses werden die Herzen dann retrograd ein auf 37°C erwärmtes und mit Carbogen (95% O2/5% CO2-gemisch) begastes Langendorff-Perfusat versorgt. Über eine kleine Inzision im linken Vorhof wird ein Druckaufnehmer in den linken Ventrikel eingeführt, um dort die linksventrikulären Druckparameter aufzuzeichnen. Im Bereich des Sinusknotens wird von außen eine Elektrode platziert, die das Herz kontinuierlich auf eine Frequenz von 600/min stimuliert. Zur kontinuierlichen Medikamentenapplikation wird ein Perfusor genutzt, der mittels Schlauchsystem mit dem Perfusat-Zufluss verbunden ist. Das den Ventrikel über den Sinus coronarius und den rechten Vorhof verlassende Efluat wird in einer Auffangschale asserviert.

2.6.5. Perfusion isolierter Herzen ex vivo

Die Perfusion der Versuchsherzen in der Langendorff-Anlage folgte einem zuvor festgelegten Protokoll. Den Beginn bildete stets eine initiale Äquilibrierungsphase von 20 Minuten, in denen keine weiteren Manipulationen an den Herzen vorgenommen wurden. Diese hatte zum Ziel, nach der Extraktion und die dadurch kurzfristig gesteigerte Herzaktivität, erneut einen phyisologischen stabilen Ruhezustand zu erreichen.

Nach Erreichen des „steady state“ begannen die eigentlichen Versuchsreihen. Zur Bestimmung der Koronarreserve – definiert als die Perfusionsdifferenz der Koronararterien bei maximaler Vasodilatation verglichen mit dem Ruhezustand – der eingespannten Herzen erfolgte eine Globalischämie, während derer die Perfusion der Herzen für eine Minute komplett gestoppt wurde. Durch diesen ischämischen Stresstest wurde die maximal mögliche Vasodilatation der Koronararterien erreicht und nach Beginn der Reperfusion als Steigerung des Koronarflusses aufgezeichnet.

Es folgte eine erneute kurze Äquilibrierungsphase von 5 Minuten, danach wurde mit der Applikation von verschiedenen Pharmaka zur Untersuchung der Veränderlichkeit des koronaren Flusses, der Kontraktilitätsreserve und diastolischen Funktion begonnen. Die Applikation dieser Pharmaka erfolgte dabei adaptiert an den aktuell gemessenen Koronarfluss der Versuchsherzen, um eine standardisierte koronararterielle Konzentration bei allen Versuchstieren zu gewährleisten. Einer initialen Phase von einer Minute, in der die Pharmaka bis zur Perfusionskanüle vorgespült wurden, folgte dann jeweils eine fünfminütige Applikationsphase. Beendet wurde die Gabe des Pharmakons mit einer einminütigen Plateauphase, in der aufgrund der längsten Wirkdauer die stärksten pharmakologischen Effekte beobachtet wurden. Im Anschluss an jede insgesamt siebenminütige Applikationsphase erfolgte eine jeweils zehnminütige Auswaschphase allein mit Langendorff-Perfusat, die der Entfernung der zuvor verabreichten Pharmaka galt, um keine Wechselwirkungen bei der nächsten Applikationsphase hervorzurufen. Der zeitliche Ablauf des Versuchsprotokolls inklusive der Globalischämie und der Applikationsphasen sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

Nach Beendigung der letzten Applikationsphase wurde die Perfusion der Langendorff-Anlage gestoppt und die Versuchsherzen von der Perfusionskanüle dekonnektiert. Abschließend wurden die Herzen gewogen, um Herz- sowie Mausgewicht als Quotient in Beziehung zueinander setzen zu können.

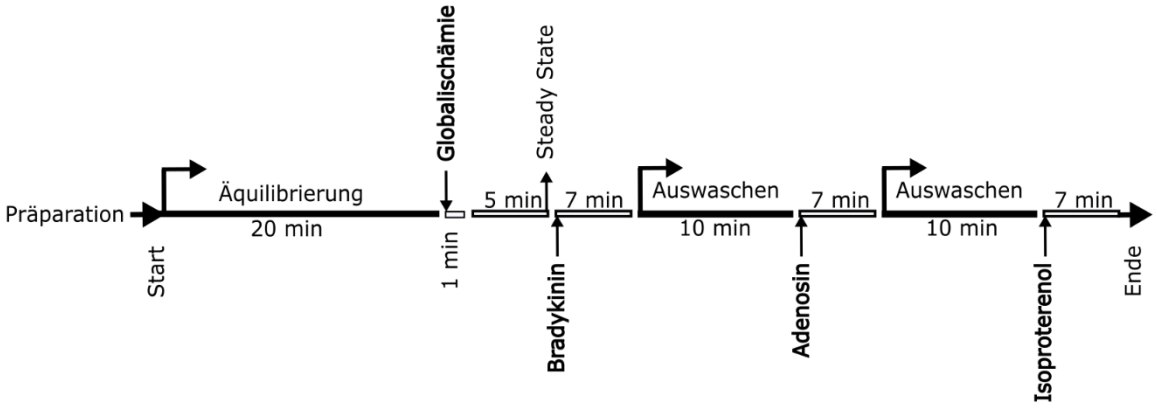


Abbildung 8: schematische Darstellung des Versuchsablaufes während der Langendorff-Perfusion ex vivo

Auf die Präparation der Herzen unter dem Mikroskop folgt eine 20-minütige Äquilibrierungsphase. Nach dann einminütiger Globalischämie sowie erneuter 5-minütiger Äquilibrierung folgt dann die Applikation der verschiedenen Medikamente. Zwischen den Applikationsphasen erfolgt jeweils eine 10-minütige „Auswaschphase".

2.6.6. Messwerte der Langendorff-Perfusion

Koronarfluss in ml · min^{-1}:

Der Koronarfluss wurde kontinuierlich über einen oberhalb der Perfusionskanüle platzierten ultraschallgestützten Flussmesser („flow probe"; TTFM2-Modul, Fa. Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) gemessen.

Endsystolischer und enddiastolischer linksventrikulärer Druck („end-systolic/diastolic pressure"; PES/PED) jeweils in mmHg:

Mit Hilfe eines größenadaptierten Druckballons wurde der systolische Spitzendruck sowie der enddiastolische Druck im linken Ventrikel durchgehend aufgezeichnet.

Linksventrikuläre Druckdifferenz („developed pressure"/DP = PES – PED; „end diastolic pressure") in mmHg**:**

Als Differenz aus systolischem Spitzendruck und enddiastolischem Druck wurde kontinuierlich der „developed pressure“ (DP) aufgezeichnet.

Kontraktilitäts- ($+dp \cdot dt^{-1}$) und Relaxationsgeschwindigkeit ($-dp \cdot dt^{-1}$) in $mmHg \cdot s^{-1}$**:**
Zur Charakterisierung von inotropen bzw. lusitropen Wirkungen der Interventionen am perfundierten linksventrikulären Myokard wurden die maximale isovolumetrische Druckanstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit kalkuliert. Die Berechnung dieser Werte erfolgte automatisch über die Isoheart®-Software (Fa. Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland).

Herzfrequenz in Schläge $\cdot min^{-1}$**:**
Die Herzfrequenz wurde von der Isoheart®-Software (Fa. Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) kontinuierlich über die Druckkurvenamplituden registriert.

2.6.7. Applizierte Pharmaka

Zur Untersuchung des koronararteriellen Flusses und der Kontraktilität sowie Relaxation des Myokards und deren Veränderlichkeit wurden während der Langendorff-Perfusion verschiedene Pharmaka appliziert. Im Folgenden werden diese näher charakterisiert.

2.6.7.1. Bradykinin

Das in den Versuchsreihen verwendete Bradykinin (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit einem Molekulargewicht von 1060,2 g/mol wurde als Bradykininacetat-Salz zunächst in Perfusat aufgelöst und bis zur Verwendung portionsweise eingefroren. Über die Infusionspumpe wurde die Applikationsgeschwindigkeit so gewählt, dass eine 5 µmolare koronararterielle Konzentration erreicht wurde. Bradykinin ist ein vasoaktives Peptid- und Gewebshormon der Kallikrein-Kinin-Gruppe, bestehend aus neun Aminosäuren (s. Abb. 9) mit ähnlichen Wirkungen wie Histamin. Endogen wird es vor allem bei Entzündungen und Verletzungen freigesetzt und vermittelt neben einer Steigerung des Schmerzempfindens endothelabhängig über Bradykininrezeptoren eine Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen. Bradykinin besteht aus neun Aminosäuren und entsteht dabei endogen durch eine proteolytische Freisetzung über Kininogenasen wie Kallikrein aus Vorläuferproteinen, den

Kininogenen. Der Abbau des Bradykinins wird durch Kininasen katalysiert, zu denen bspw. das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), Aminopeptidasen sowie Carboxypeptidasen gehören (Dendorfer et al. 2001). Die Wirkung von Bradykinin wird vor allem über den B_2-Rezeptor vermittelt. Durch Aktivierung dieses G-gekoppelten Rezeptors kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2). Dadurch aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetztes Calcium bewirkt im Komplex mit Calmodulin wiederum eine Synthese von Stickstoffmonooxid (NO) über die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Über das NO wird eine Relaxation der endothelialen glatten Gefäßmuskulatur und somit eine Vasodilatation bewirkt.

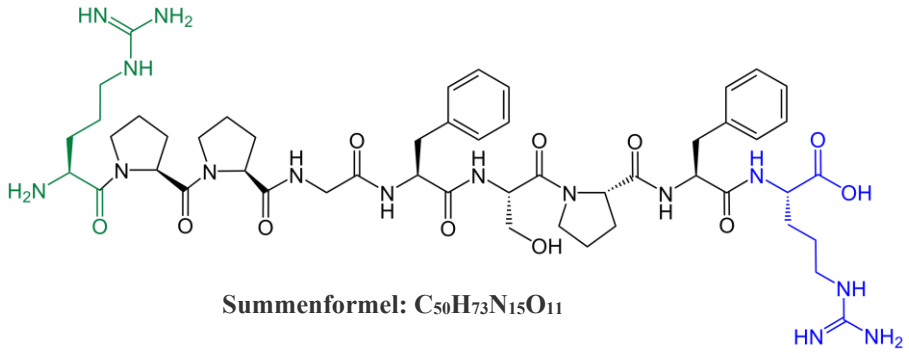
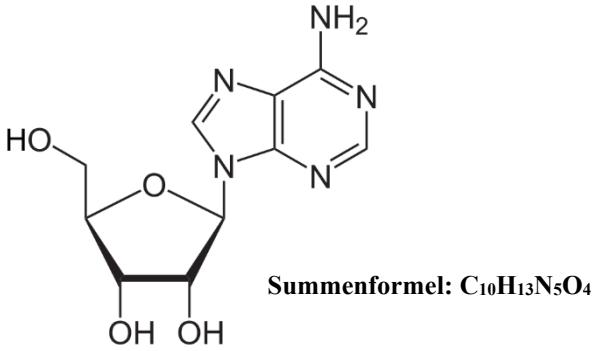


Abbildung 9: Struktur- und Summenformel Bradykinin

2.6.7.2. Adenosin

Für die Versuche wurde Adenosin-Hemisulfat-Salz (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit einem Molekulargewicht von 316,3 g/mol verwendet, das in Vorbereitung zur Applikation in Langendorff-Perfusat gelöst wurde. Über die Infusionspumpe wurde die Applikationsgeschwindigkeit so gewählt, dass eine 1 µmolare koronararterielle Konzentration erreicht wurde. Bei Adenosin handelt es sich um ein endogenes Purinnukleosid, vorkommend in allen Körperzellen. Es ist aufgebaut aus der Purinbase Adenosin, die n-glykosidisch an eine Desoxyribose gebunden ist (s. Abb. 10). Endogen entsteht extrazelluläres Adenosin dabei durch Dephosphorylierung der Nukleosidtri-, di- und monophosphate ATP, ADP und AMP durch an der Zelloberfläche lokalisierte Dephosphorylasen wie CD39 und die Exonukleotidase CD73. Über verschiedene Rezeptoren bewirkt Adenosin dabei eine Vielzahl physiologischer Reaktionen, wie beispielsweise eine Reduktion des myokardialen Sauerstoffbedarfs, eine Vasodilatation und Anregung der Angiogenese sowie eine Immunmodulation im Sinne einer

antiinflammatorischen Wirkung (Borea et al. 2018; Quast et al. 2017). Adenosin signalisiert seine vielen verschiedenen physiologischen Wirkungen über verschiedene jeweils G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptorsubtypen: A1-, A2- und A3-Rezeptor. Aufgrund der Fülle an Adenosinwirkungen an seinen Rezeptoren werden im Folgenden nur die kardiovaskulär relevanten besprochen. Über atriale G_i-gekoppelte A1-Rezeptoren und einen folgenden geringeren Ca^{2+}-Einstrom in atriale Myozyten werden dort negativ inotrope und chronotrope Effekte erzielt. Klinisch macht man sich diese Wirkungen beispielsweise zur Beendigung von AV-junktionalen Tachykardien zu Nutze. G_s-gekoppelte A2-Rezeptoren bewirken durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration und resultierender Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase eine Relaxation glatter Gefäßmuskulatur, bspw. in den Koronararterien und erhöhen damit die myokardiale Perfusion.



Summenformel: $C_{10}H_{13}N_5O_4$

Abbildung 10: Struktur- und Summenformel Adenosin

2.6.7.3. Isoproterenol

Für die Versuche wurde Isoproterenol-Hydrochlorid (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit einem Molekulargewicht von 247,72 g/mol verwendet. Isoproterenol (auch Isoprenalin) ist als synthetisches Noradrenalinderivat ein sehr selektiver Agonist an ß-adrenergen Rezeptoren (Hardy et al. 2018) und leitet sich strukturell als Noradrenalinderivat von den Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin ab (siehe Abb. 11). Über Stimulation dieser G_s-gekoppelten Transmembranrezeptoren kommt es gewebespezifisch zu verschiedenen Wirkungen. Die Aktivierung von ß1-Rezeptoren, die bspw. an Myozyten exprimiert werden, bewirkt über die gesteigerte Phosphorylierung von Calciumkanälen durch die Proteinkinase A (PKA) einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Dies führt zu einer Erhöhung der myokardialen Kontraktilität (Inotropie), Erregungsweiterleitung

(Dromotropie), beschleunigten myokardialen Erschlaffung (Lusitropie) und Steigerung der Herzfrequenz (Chronotropie).

Eine Stimulation von ß2-Rezeptoren – die vor allem an glatter Gefäß- und Bronchialmuskulatur exprimiert werden – bewirkt dort wiederum über eine vermehrte Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase eine Vaso- bzw. Bronchodilatation (de Lucia, Eguchi, and Koch 2018).

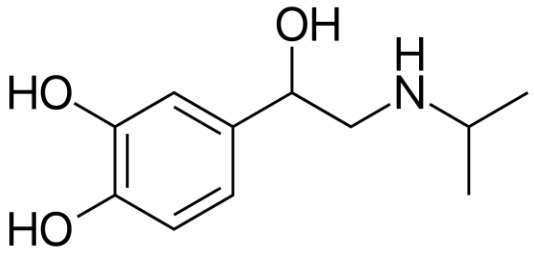


Abbildung 11: Struktur- und Summenformel Isoproterenol

2.6.8. ATP-Messungen im Langendorff-Efluat

Zur Messung von Adenosin- sowie ATP-Konzentrationen im von den Versuchsherzen austretenden Efluat wurden nach der einminütigen Globalischämie Proben asserviert. Nach stattgehabter Globalischämie folgte – wie oben beschrieben – eine erneute kurze Äquilibrierungsphase von 5 Minuten, zu Beginn dieser wurde für eine Minute pro Herz eine Probe des Efluats (siehe Abb. 7), das die Herzen über den rechten Vorhof verlässt, asserviert. Die Asservierung erfolgte dabei in Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5ml Fa Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Peter-Henlein-Straße 2, 50389 Wesseling). Mittels dieser Proben sollten dann im weiteren Verlauf der Untersuchungen (siehe unten) Messungen der ATP-Konzentrationen während der Hyperämie-Phase erfolgen. Dafür wurden diese direkt nach Asservierung auf Trockeneis eingefroren und bei -20°C für den Tag zwischengelagert, um dann am Ende des Versuchstages bis zur Verwendung bei -80°C gelagert zu werden.

Physikalische Grundlage der folgenden Messungen ist die Kolorimetrie (Absorptionsphotometrie/Spektrophotometrie), anhand derer eine Konzentrationsbestimmung von lichtabsorbierenden Substanzen erfolgen kann. Zur quantitativen Analyse der ATP-Konzentrationen im Langendorff-Efluat nach Globalischämie wurde ein ATP-Assay-Kit (ATP Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (ab83355), Fa. Abcam, USA) verwendet. Die Probenvorbereitung wurde dabei gemäß den

dem Kit beiliegendem Protokoll durchgeführt. Chemische Grundlage der kolorimetrischen Messung im verwendeten ATP-Assay-Kit ist die Phosphorylierung von Glyerin zu Glycerinphosphat mit Hilfe der Glycerinkinase unter Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP). Abbildung 12 zeigt die zugrunde liegende chemische Reaktion.

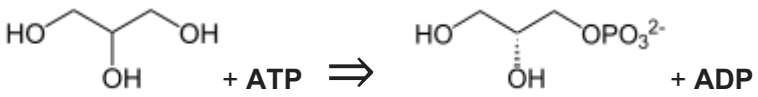


Abbildung 12: Enzymatisch katalysierte Phosphorylierung von Glycerin in Abhängigkeit von ATP

Die Abbildung zeigt schematisch die Phosphorylierung von Glycerin unter Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) unter enzymatischer Katalysierung durch die Glycerinkinase

Mittels eines Fluorometers (Fluorat-02 Series, Fa. Lumex Instruments, Canada) werden dabei die Proben mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (in diesem Kit 570nm) bestrahlt und anhand der konsekutiven Fluoreszenz und Messungen der Signalstärke dann quantitative ATP-Konzentrationen gemessen. Die Messungen folgen dabei dem Lambert-Beerschen-Gesetz (siehe Abb. 13):

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Abbildung 13: Lambert-Beersches Gesetz

Das Lambert-Beersche Gesetz zeigt die Proportionalität der Extinktion (Lichtschwächung, E) zur gelösten Konzentration (c), durchstrahlten Schichtdicke (d) und dem Extinktionskoeffizienten (ε).

Die gemessene Extinktion entspricht dabei bei den kolorimetrischen Messungen der „optischen Dichte“ (hier bei 570nm, „OD_{570}“), anhand derer – bei bekanntem Extinktionskoeffizienten der zu untersuchenden Substanz – die Konzentration nach der obenstehenden Formel ermittelt werden kann.

2.6.9. Säuberung der Langendorff-Anlage

Nach jedem Versuchstag am Langendorff-Perfusor wurden die Schlauchsysteme der Anlage für eine Stunde mit ca. 46°C warmem Perfusat gespült, um über den Tag entstandene Rückstände zu lösen. Jeweils einmal wöchentlich wurde die Anlage zudem in ihre Einzelteile zerlegt und die dem Perfusat ausgesetzten Schläuche mit Hilfe von zahnmedizinischem Instrumentarium mechanisch von Perfusatrückständen befreit sowie anschließend erneut für eine Stunde mit 46°C warmem destillierten Wasser gespült. Außerdem wurden stark verunreinigte Schlauchsysteme und Anlagenteile in der wöchentlichen Reinigung entfernt und durch neue ersetzt.

2.7.Verwendete Chemikalien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien in den Langendorff-Versuchen mit Herstellerangaben

Substanz	**Hersteller**
Adenosin-Hemisulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bradykininacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Isoproterenolhydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Heparin-Natrium	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Kaliumchlorid	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland
Kalziumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
S-(+)-Ketamin-Hydrochlorid	Zoetis, New Jersey, USA
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Xylazinhydrochlorid	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

2.8. Histologische Untersuchungen der Aortenklappe

2.8.1. Entnahme, Präparation und Einbettung der Herzen

Sowohl Anästhesie zur Vorbereitung der Versuchstiere sowie das Instrumentarium und die Methodik der Herzentnahme und -präparation gleichen der Vorgehensweise in Vorbereitung der Langendorff-Versuche (Kapitel 4.6.3. „Herzentnahme, Präparation und Anschluss an die Langendorff-Anlage“). Im Anschluss an die Präparation wurden die Versuchsherzen über die gekürzte aufsteigende Aorta wiederum auf eine Perfusionskanüle aufgezogen und mit Hilfe einer Seidenligatur (Seraflex®, Stärke 5/0, F
a. SERAG-WIESSNER GmbH & CoKG) locker festgezogen. Mit Hilfe einer Rollerpumpe wurden die Herzen nun retrograd mit Phosphat-gepufferter Salzlösung („dulbecco´s phosphate buffered saline“/PBS, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gespült, um Blutrückstände im Bereich der Aortenklappe und den Koronarostien zu entfernen und somit eine bestmögliche histologische Beurteilung der valvulären Morphologie zu ermöglichen.
Im Anschluss daran wurden die Herzen aufrecht in Einbettmedium (OCT-Compound™, Tissue Tek®, Fa. Sakura Finetek Europe E.V., Alphen aan den Rijn, NL) eingebracht und auf Trockeneis durch 2-Methylbutan (Isopentan, Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingefroren. Für den Rest des Versuchstages wurden die Herzen vorrübergehend bei -20°C zwischengelagert und am Ende des Versuchstages in einen -80°C-Kühlschrank überführt und dort für mindestens 24 Stunden gelagert.

2.8.2. Schneiden der Herzen am Kryotom

Die tiefgefrorenen Herzen wurden zum Anfertigen von Schnitten zur mikroskopischen Betrachtung vor Beginn des Versuchstags wiederrum auf -20°C zwischengelagert. Mit Hilfe von Einbettmedium wurden die gefrorenen Herzen auf Herzblöcke aufgebracht und in das auf -20°C vorgekühlte Kryotom (Modell CM 3050s, Fa. Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt. Daraufhin wurde überschüssiges Gewebe kranial der Aorta ascendens in größeren Schichtdicken von 100 bis 200 µm sukzessive heruntergetrimmt. Makroskopisch wurde dabei stets auf die Visualisierung von Gefäßanteilen geachtet und darauf mit einer kleineren Schichtdicke reagiert. Die Annäherung an die gewünschte Klappenebene wurde darüber hinaus mikroskopisch durch Probeschnitte verifiziert. Sobald beginnende Teile der kranialen Verwachsungszone der Aortenklappe im Bereich der sinotubulären Junktionszone (Akhtar et al. 2009) – als

Verbindung der Sinus nach Valsalva und der aufsteigenden Aorta – zu sehen waren, wurde die Schichtdicke über 50 und 30 µm reduziert, bis die Aortenklappe in Probeschnitten gut zur Darstellung kam. Darauffolgend wurde mit der Aufnahme von Schnitten der Klappenebene mit einer Schichtdicke zwischen 6,5 und 7 µm auf Objektträger (Superfrost®, Fa. Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) begonnen. Dabei wurden je nach Erfolg des Einbettens und Größe der Herzen zwischen 6 und 12 Schnitte auf jeweils 5-6 Objektträger pro Herz aufgebracht. Die Objektträger wurden daraufhin wiederrum bei -20°C bis zur Färbung gelagert.

2.8.3. Färbung der Herzschnitte

Zur Bestimmung der valvulären Morphologie in beiden Versuchsgruppen wurden die so angefertigten Schnitte der Aortenklappe im Folgenden mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Übersicht angefärbt. Vor Beginn der Färbung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur über eine Stunde aufgetaut. Sobald die Schnitte ausreichend luftgetrocknet waren, wurden die Schnitte zur Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (100% Ethanol – 96% Ethanol – 80% Ethanol, Fa. VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland) geführt und anschließend mit destilliertem Wasser vorsichtig abgespült. Anschließend wurden die Herzschnitte zur Färbung des Chromatins – und damit der Zellkerne – für zwei Minuten in Hämatoxylinlösung (Hämatoxylin-Lösung III modifiziert nach Gill, Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingebracht und danach erneut vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült. Zur Induktion des Farbumschlags des Hämatoxylins ins bläulich-violette (sog. „bläuen“) wurde durch 15-minütige Spülung unter fließendem Leitungswasser eine Alkalisierung des pH-Wertes herbeigeführt. Es folgte eine weitere Spülung mit destilliertem Wasser und nun die Gegenfärbung der zytoplasmatischen Strukturen mit Hilfe von Eosin (Eosin-G-Lösung 0,5% in wässriger Lösung, Fa. Carl Roth AG, Arlesheim, CH) für 4 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte erneut in destilliertem Wasser gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe (80% Ethanol – 96% Ethanol – 100% Ethanol) überschüssige intrazelluläre Flüssigkeit entfernt. Mit Hilfe von Roticlear® (Fa. Carl Roth AG, Arlesheim, CH) – einem Xylol-Ersatz-Intermedium – sowie einem selbst aushärtendem Eindeckmittel (Entellan®, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wurden die Schnitte schlussendlich mit Deckgläsern (Fa. Carl Roth AG, Arlesheim, CH) eingedeckt. Die Schnitte wurden daraufhin erneut für mindestens 24 Stunden luftgetrocknet und danach bis zur Digitalisierung der histologischen Bilder bei

Raumtemperatur lichtgeschützt und trocken gelagert. Zur besseren Übersicht ist das Versuchsprotokoll in Abbildung 14 graphisch aufgetragen.

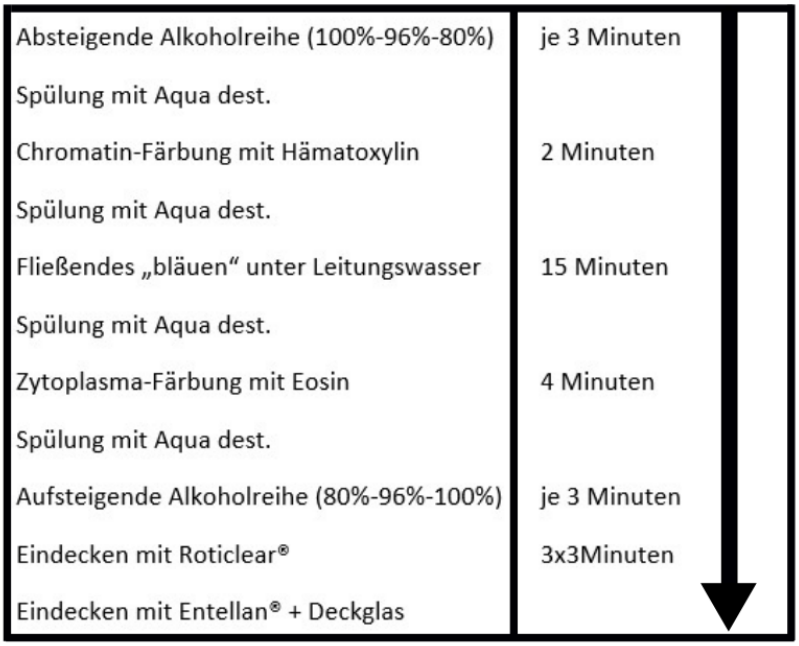


Abbildung 14: Protokoll der Hämatoxylin/Eosin-Färbungen an den angefertigten Präparaten
Abgebildet ist das zugrundeliegende Protokoll für die Färbungen an den Herzschnitten. Zunächst werden die Schnitte in eine absteigende Alkohlreihe (100%/96%/80%) für jeweils 3 Minuten eingestellt. Daraufhin erfolgt die einmalige Spülung mit destilliertem Wasser sowie der erste Färbeschritt mit Hämatoxylin für 2 Minuten. Nach einer 15-minütigen „Bläung“ unter Leitungswasser sowie erneuten Spülung mittels destilliertem Wasser erfolgt die Färbung mittels Eosin für 4 Minuten sowie die erneute Spülung mittels destilliertem Wasser. Abschließend erfolgt eine Dehydratation mittels aufsteigender Alkoholreihe sowie ein Endecken mittels Roticlear ®.

2.8.4. Digitalisierung der histologischen Bilder, gemessene sowie errechnete Werte

Die gefärbten und getrockneten Präparate wurden im Anschluss mit Hilfe eines digitalen Mikroskops (Modell DM-6B, Fa. Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) begutachtet. Für die weitere Analyse der Klappendicke und -fläche wurde jeweils ein repräsentativer Schnitt auf Höhe des medialen Drittels der Klappenebene verwendet (siehe Abb. 15). Es wurden mit Hilfe der LAS X Navigator-Software (Fa. Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) jeweils Aufnahmen in 10- und 40-facher Vergrößerung aufgenommen und in Bilddateien mit Maßstab umgewandelt.

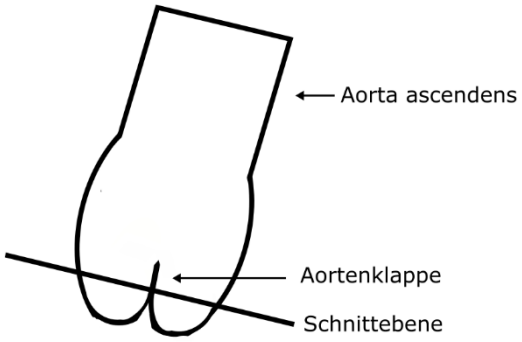


Abbildung 15: Schnittebene zur Analyse von Klappendicke und -fläche

Die Klappendicke wurde definiert als breitester Klappentaschenabschnitt in der gewählten Schnittebene. Die Klappenfläche berechnete sich als gesamte zweidimensionale Fläche aller Aortenklappenanteile im gegebenen Schnittbild. Die Bildverarbeitung im Nachhinein sowie die Berechnung der Klappendicke und -fläche erfolgten mit Hilfe der frei verfügbaren Fiji-Software (ImageJ, Erstentwickler Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

3. Ergebnisse

Zur Charakterisierung der koronaren sowie myokardialen Adaptation der Versuchstiere mit induzierter Aortenklappenstenose wurden die verschiedenen Parameter der Langendorff-Perfusion herangezogen. Diese Ergebnisse werden im Folgenden als erstes dargestellt. Im Anschluss werden die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen illustriert – vor allem die Messungen der Klappendicke und -fläche –, welche zur Darstellung von valvulären Umbauprozessen in den Versuchstieren mit induzierter Aortenklappenstenose durchgeführt wurden.

3.1. Langendorff-Perfusion

Die Messungen der Langendorff-Perfusion unterteilen sich im Folgenden zum einen in die Messungen des Koronarflusses und damit der Charakterisierung der koronaren Reserve als Vasodilatationsfähigkeit der Koronarien sowie zum anderen in linksventrikuläre Druckmessungen zur Darstellung von myokardialen Adaptationsmechanismen an eine induzierte Aortenklappenstenose. Vor Beginn der Versuche wurden für bestimmte Messwerte initiale Ausschlusskriterien formuliert, um eine Vergleichbarkeit der Versuchsherzen zu gewährleisten. Diese werden in den einzelnen Kapiteln näher besprochen. Ein wichtiges Gütekriterium vor Beginn der Versuche stellte die Präparations- und somit initiale Ischämiezeit von der Entnahme der Herzen aus dem Brustkorb der Versuchstiere bis zum Anschluss an die Langendorff-Perfusion dar. Hier zeigten sich mit einem Mittelwert von 458,2 ± 68,5 Sekunden in der Vergleichsgruppe und 502,5 ± 54,9 Sekunden in der Stenosegruppe keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 16).

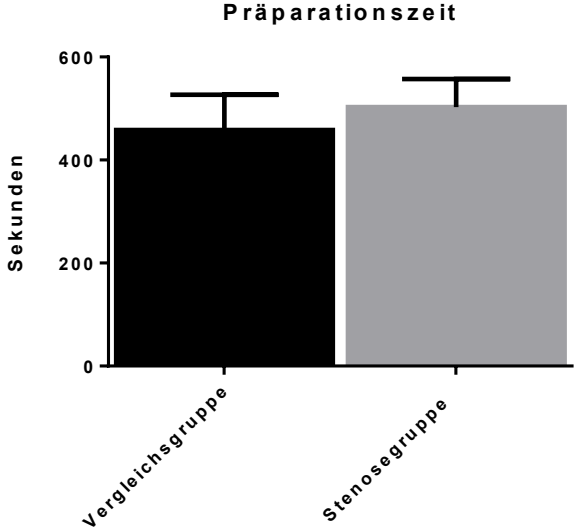


Abbildung 16: Messungen der Präparationszeiten der Versuchsherzen in Vergleichs- und Stenosegruppe

Die Abbildung zeigt die absoluten Werte der Präparationszeiten für beide Versuchsgruppen (Vergleichsgruppe, schwarz dargestellt n=11; Stenosegruppe, grau dargestellt n=8), signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden (ungepaarter t-Test p = 0,15).

3.1.1. Koronarfluss

Als wichtigster Parameter zur Evaluation der koronaren Reserve wurde der kontinuierlich gemessene Koronarfluss (angegeben in ml/min) herangezogen. Änderungen dieses Parameters – ausgelöst durch myokardiale Ischämie oder die Gabe vasoaktiver Pharmaka – wurden zur näheren Bestimmung der koronaren Vasodilatationsfähigkeit detektiert. Zur besseren Darstellung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse werden diese in der Folge nicht nur absolut, sondern auch als prozentuale Veränderungen präsentiert. Zur Sicherstellung einer qualitativen Präparation und Aortenligatur wurden nur solche Versuchsherzen in die Versuchsreihe eingeschlossen, die nach Äqulibrierung einen Koronarfluss von < 4 ml/min aufwiesen. Mit Mittelwerten von 2,68 ± 0,56 ml/min für die Vergleichs- und 2,95 ± 0,79 ml/min für die Stenosegruppe erfüllten alle Versuchsherzen diese Bedingung. Darüber hinaus wurde zur Selektion von geeigneten Versuchsherzen für die weiteren Flussmessungen eine Steigerung des Koronarflusses um >70% nach Globalischämie als Cut-Off-Wert festgelegt. Diese Bedingung wurde mit einem Mittelwert von 190,5% ± 27,5% in der Vergleichsgruppe und einem Mittelwert von 136,9% ± 43,7% in der Stenosegruppe von allen Versuchsherzen erfüllt.

Zur Bestimmung der Unterschiede bezüglich des koronaren Flusses der Versuchs- und Vergleichsgruppen erfolgte im gesamten Versuchsprotokoll eine kontinuierliche Messung des Koronarflusses. Die entsprechenden Messungen wurden zu den bestimmten Messzeitpunkten des Protokolls (s. Abb. 17 A) abgelesen. Zu Beginn der Versuchsreihe erfolgte zur Evaluierung der koronaren Flussreserve und zur Evaluation der individuellen Eignung der Versuchsherzen eine einminütige Globalischämie mit darauffolgender erneuter Messung des Koronarflusses. Um eine Vergleichbarkeit der Werte – auch vor dem Hintergrund unterschiedlicher absoluter Ausgangswerte – zu erlauben, erfolgte die Berechnung des prozentualen Anstiegs des Koronarflusses. Auf die Globalischämie folgten die einzelnen Medikamentenapplikationsphasen. Auch hier wurden die Veränderungen des Koronarflusses registriert und in den folgenden Abbildungen graphisch als prozentuale

Flussanstiege dargestellt. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Abbildung 17 zusammengefasst.

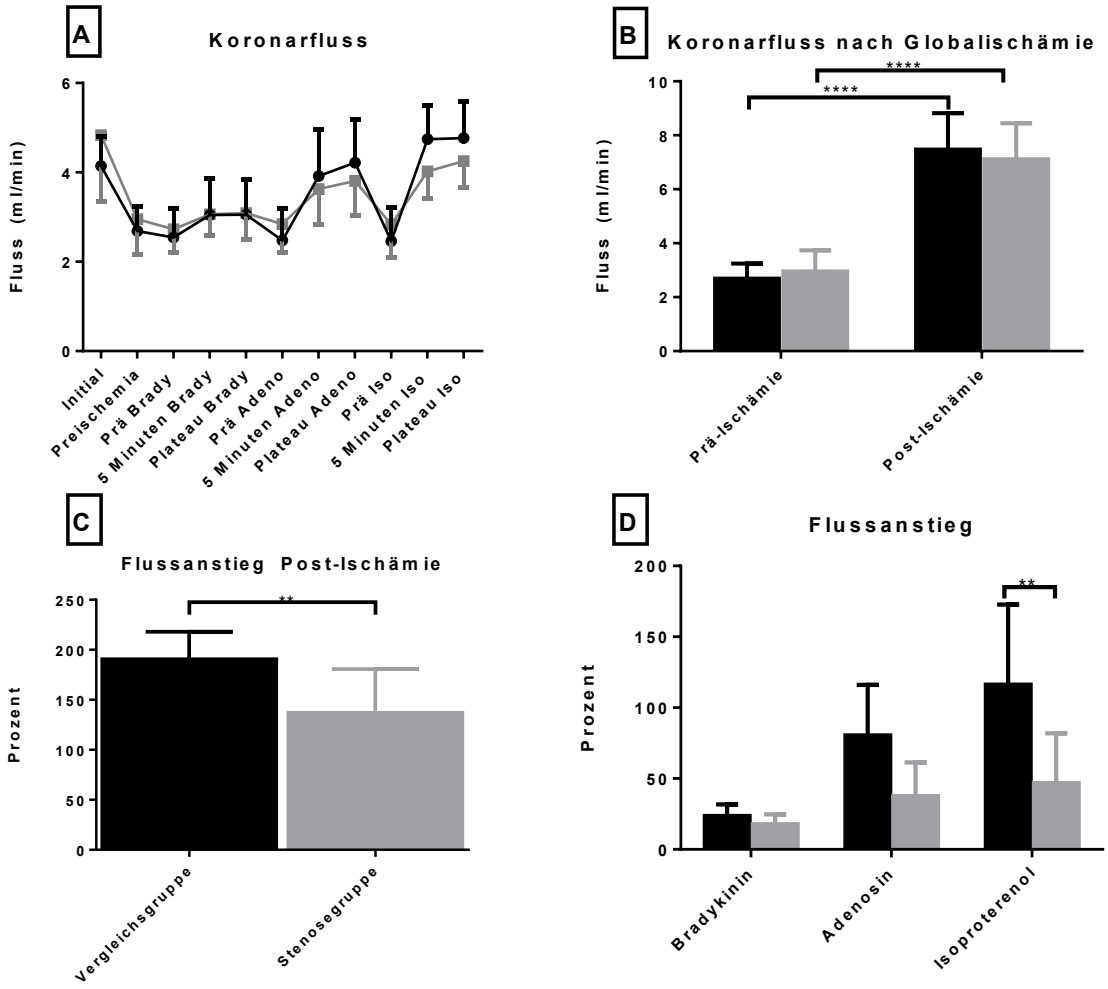


Abbildung 17: Messungen des Koronarflusses im Protokollverlauf, nach Globalischämie sowie unter Applikation von vasoaktiven und inotropen Pharmaka in Vergleichs- und Stenosegruppe

Abbildung 17 A zeigt die Veränderungen des Koronarflusses (als absolute Werte in ml/min) im zeitlichen Verlauf des Messprotokolls (zu Beginn; vor Globalischämie; vor den Medikamentenapplikationen, 5 Minuten während sowie im Plateau der jeweiligen Medikamentenapplikationen), 17 B zeigt einen deutlichen Flussanstieg in beiden Versuchsgruppen nach einminütiger Globalischämie. Zur besseren Vergleichbarkeit der absoluten Flussmessungen sind in Abb. 17 C der prozentuale Flussanstieg in beiden Gruppen nach Globalischämie und in Abb. 17 D nach den jeweiligen Medikamentenapplikationen dargestellt. Als Basis der prozentualen Angaben dienten die Messungen vor der Globalischämie (siehe Abb. 17 B „Prä-Ischämie“) sowie vor der jeweiligen Medikamentenapplikation (siehe Abbildung 17 A: „Prä Brady“, „Prä Adeno“, Prä Iso“). Brady = Bradykinin, Adeno = Adenosin, Iso = Isoproterenol. Die Daten der beiden Gruppen (Vergleichsgruppe, schwarz dargestellt n=9-10; Stenosegruppe, grau dargestellt n=7-8) sind als Mittelwerte ± SD angegeben. Statistische Signifikanzen mit einem Siginifikanzniveau von $p < 0,01$ (**) bzw. $p < 0,0001$ (****) (Abb, 17 A, B und D: two-way ANOVA; Abb. 17 C: ungepaarter t-Test, p=0,0095) sind graphisch

dargestellt. In allen Abbildungen sind die Messungen der Vergleichsgruppe schwarz, die der Stenosegruppe grau hinterlegt.

Die Messungen des Koronarflusses im zeitlichen Protokollverlauf zeigen für beide Gruppen eine deutliche Absenkung der Werte im Verlauf der initialen zwanzigminütigen Äquilibrierungsphase (Vergleichsgruppe: „Initial“ 4,14 ± 0,65 ml/min vs. „Preischemia“ 2,68 ± 0,56 ml/min, $p<0,01$; Stenosegruppe: „Initial“ 4,83 ± 1,49 ml/min vs. „Preischemia“ 2,95 ± 0,79 ml/min, $p<0,001$) und unterstreichen damit die Notwendigkeit des Erreichens eines „steady state“ als Ausgangspunkt für die weiteren Messungen. Darüber hinaus zeigen die oben graphisch dargestellten Ergebnisse für beide Versuchsgruppen einen deutlichen, signifikanten Anstieg des koronararteriellen Flusses von im Mittel 2,68 ± 0,56 ml/min auf 7,47 ± 1,35 ml/min ($p<0,0001$) in der Vergleichsgruppe sowie im Mittel 2,95 ± 0,78 ml/min auf 7,11 ± 1,33 ml/min ($p<0,0001$) in der Stenosegruppe nach einminütiger Globalischämie (siehe Abbildung 17 B). Initial ist dabei vor Globalischämie ein in der Tendenz gering erhöhter Koronarfluss in der Stenosegruppe zu sehen. Diese Tendenz zeigt sich nach Ischämie umgekehrt, hier waren absolut betrachtet leicht erhöhte Flusswerte in der Vergleichsgruppe zu beobachten. In vergleichender Zusammenschau der prozentualen Flussanstiege zeigt sich ein in der Stenosegruppe mit einem Mittelwert von 136,9% ± 43,7% signifikant niedrigerer Anstieg des Koronarflusses nach Globalischämie als in der Vergleichsgruppe mit einem Mittelwert von 190,5% ± 27,5% (siehe Abbildung 17 C; $p<0,001$). In den einzelnen Medikamentenapplikationsphasen von Bradykinin, Adenosin und Isoproterenol zeigen sich Anstiege des Koronarflusses in beiden Gruppen mit in der Tendenz höheren Flüssen in der Vergleichsgruppe. Dabei zeigten sich für Bradykinin die geringsten absoluten und prozentualen Veränderungen des Koronarflusses. Den stärksten Einfluss auf den Koronarfluss zeigte Isoproterenol, gefolgt von Adenosin. Die absoluten Werte zeigen, bei in der Tendenz erhöhten Werten in der Vergleichsgruppe, keine signifikanten Unterschiede. Ähnliche Tendenzen zeigen sich auch für die prozentualen Flussanstiege für Bradykinin mit einem Mittelwert von 23,58 ± 8,11% in der Vergleichs- sowie 17,70 ± 7,02% in der Stenosegruppe und Adenosin mit einem Mittelwert von 80,40 ± 35,68% in der Vergleichs- und 37,59 ± 14,85% in der Stenosegruppe ($p > 0,05$) ohne Signifikanz. Für Isoproterenol konnten mit im Mittel 116,18 ± 56,62% in der Vergleichsgruppe und 46,75 ± 35,19% in der Stenosegruppe zum einen die stärksten relativen und absoluten Anstiege des Koronarflusses ausgelöst und zum anderen signifikante

Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (siehe Abbildung 17 D, $p<0,01$).

3.1.2. Linksventrikuläre Druckparameter

Wichtige Parameter zur Charakterisierung der linksventrikulären Druckverhältnisse und Kontraktilität sind der linksventrikulär erzeugte Druck (DP = developed pressure), der endsystolische linksventrikuläre Druck (PES = endsystolic pressure) sowie die Kontraktilitäts- und Relaxationsgeschwindigkeiten des Myokards (dPmax/dt und dPmin/dt). Zur Gewährleistung einer Vergleichbarkeit der Versuchsherzen wurde im Vorhinein stellvertretend für die linksventrikulären Druckparameter ein Cut-Off-Wert für den erzeugten Druck von DP > 40mmHg nach Äquilibrierung festgelegt, der mit einem Mittelwert von 52,7 ± 9,66 mmHg in der Vergleichsgruppe und 71,13 ± 14,85 mmHg in der Stenosegruppe von allen Versuchsherzen erfüllt wurde. Die folgende Abbildung 18 zeigt analog zur Darstellung des Koronarflusses in Abbildung 17A eine zeitliche Zusammenstellung der linkskardialen Druckparameter im Protokollverlauf. Diese Ergebnisse geben einen Eindruck der Unterschiede zwischen Stenose- und Vergleichsgruppe.

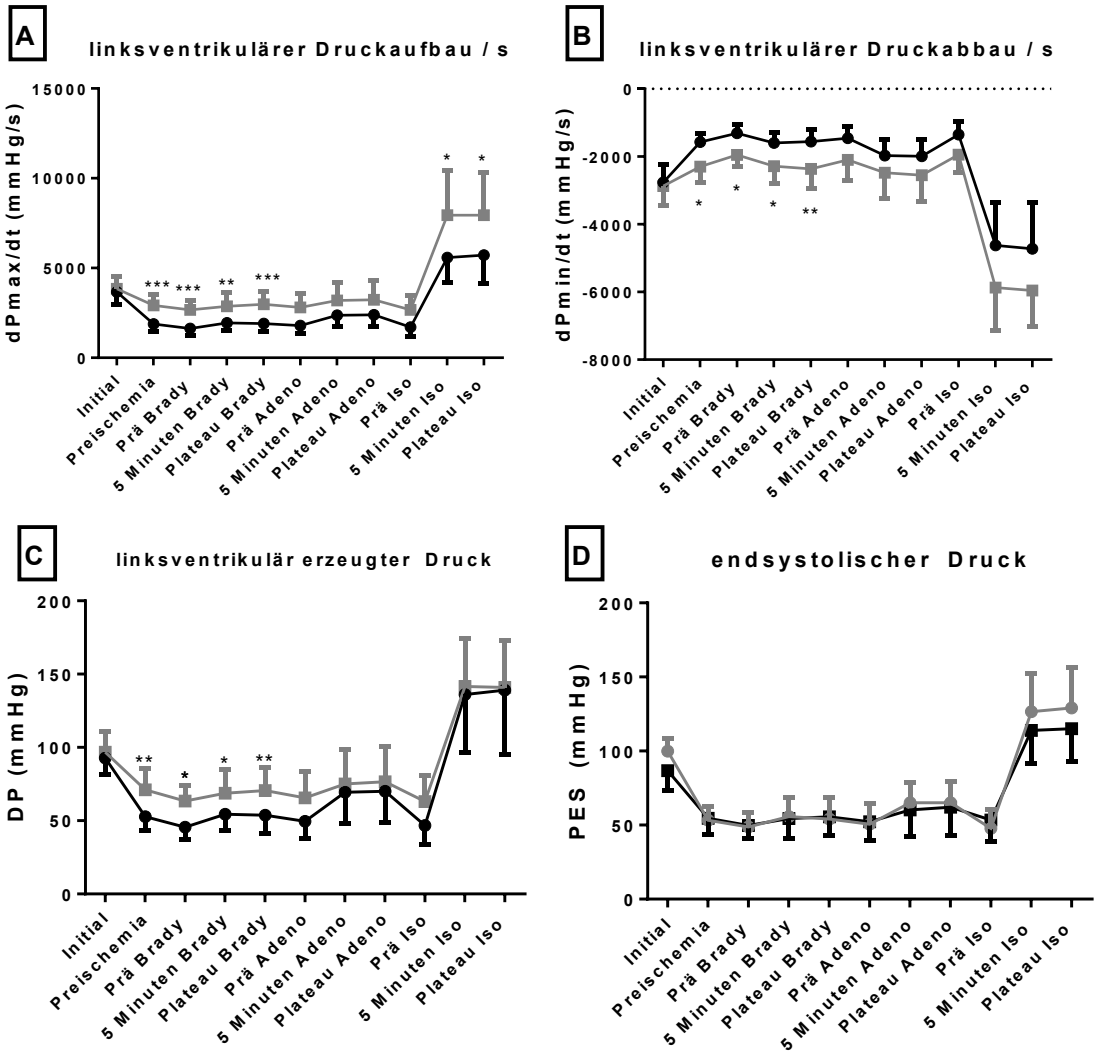


Abbildung 18: Messungen der myokardialen linksventrikulären Druckparameter im Protokollverlauf in Vergleichs- und Stenosegruppe

Abbildungen 18 A&B zeigen den zeitlichen Verlauf der myokardialen Messgrößen des linksventrikulären Druckauf- und -abbaus/s (dPmax/dt sowie dPmin/dt) im Langendorff-Protokoll. In Abbildung 18 C ist der zeitliche Verlauf des linksventrikulär erzeugten Druckes (DP) dargestellt, 16 D zeigt analog den zeitlichen Verlauf des endsystolischen Drucks (PES).

Brady = Bradykinin, Adeno = Adenosin, Iso = Isoproterenol, DP = developed pressure, PES = *endsystolic pressure,* dPmax/dt; dPmin/dt = Δ des maximalen Druckauf- und -abbaus (mmHg) pro Δ der Zeit (s). Die Daten der beiden Gruppen (Vergleichsgruppe, schwarz dargestellt n=9; Stenosegruppe, grau dargestellt n=7) sind der Übersicht halber als Mittelwerte und jeweilige positive oder negative SD angegeben. Statistische Signifikanzen mit einem Siginifikanzniveau von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) (two-way ANOVA) sind graphisch dargestellt.

Der Verlauf der linksventrikulären Druckmessungen zeigt über das gesamte Versuchsprotokoll hinweg höhere Werte für die Versuchsherzen der Stenosegruppe in

Hinblick auf den linksventrikulär erzeugten Druck sowie die Kontraktilitäts- und Relaxationsgeschwindigkeiten. Neben den durch die absoluten Werte insgesamt abgebildeten Tendenzen, zeigten sich insbesondere in den frühen Phasen zu Beginn des Versuchsprotokolls signifikant erhöhte Werte der Druckparameter für die Stenosegruppe im Gegensatz zur Vergleichsgruppe (siehe Abbildungen 18 A-C in den Phasen „Preischemia“ bis „Plateau Brady“). Darüber hinaus zeigten sich für den linksventrikulären Druckaufbau pro Sekunde während der Applikation des ß1-selektiven synthetischen Inotropikums Isoproterenol mit Mittelwerten von 5586,56 ± 1423,99 mmHg/s bzw. 5723,78 ± 1571,36 mmHg/s für die Vergleichs- und 7940,75 ± 2482,12 mmHg/s bzw. 7939,50 ± 2405,84 mmHg/s für die Stenosegruppe signifikante Unterschiede (siehe Abb. 18A „5 Minuten Iso“ sowie „Plateau Iso“ $p < 0,05$) und die stärksten absoluten Veränderungen der linksventrikulären Druckparameter. Eine analoge Tendenz zeigte sich auch für den entsprechenden linkskardialen Druckverlust, hier jedoch ohne statistische Signifikanz (-4621,22 ± 1250,01 mmHg/s vs. -5871,86 ± 1260,45 mmHg/s $p = 0,06793$).

Zur Darstellung der relativen Kontraktilitätsreserve wurden die absoluten Werte der Druckmessungen im Folgenden durch Berechnung des jeweils relativen, prozentual angegebenen Anstiegs für die einzelnen Druckparameter ausgewertet. In Abbildung 19 ist eine graphische Zusammenstellung dieser berechneten Ergebnisse dargestellt.

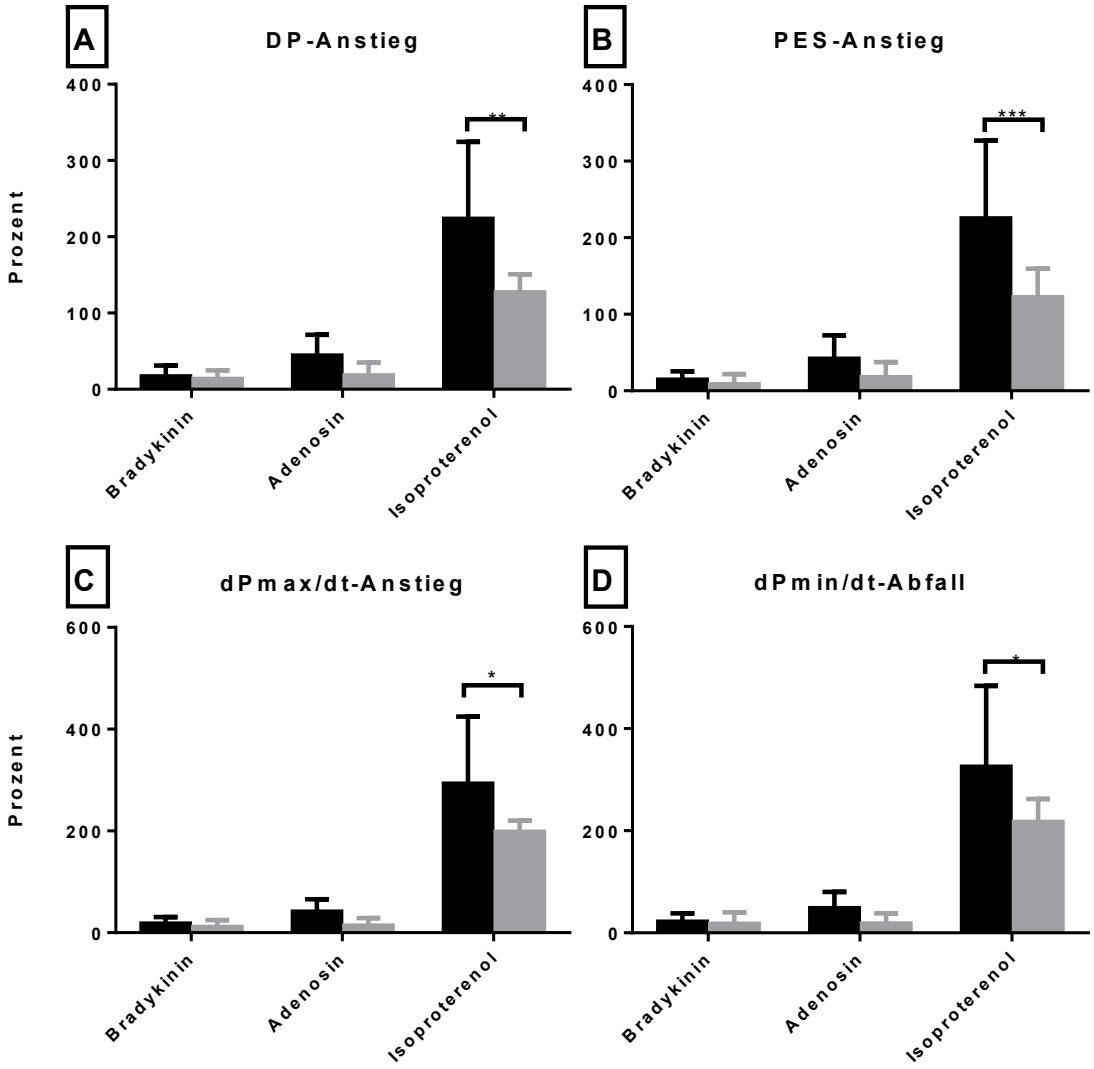


Abbildung 19: prozentuale Veränderungen der linksventrikulären Druckparameter unter Einfluss der einzelnen Medikamentenapplikationen in Vergleichs- und Stenosegruppe

Abbildung 19 zeigt die relativen, prozentual angegebenen Veränderungen des linksventrikulär erzeugten Drucks (DP = developed pressure), endsystolischen Drucks (PES) sowie der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten (dPmax/dt und dPmin/dt). Als Basis der prozentualen Angaben dienten die Messungen vor der jeweiligen Medikamentenapplikation (siehe Abbildung 18: „Prä Brady“, „Prä Adeno“, Prä Iso“).

DP = developed pressure, PES = *endsystolic pressure,* dPmax/dt; dPmin/dt = Δ des maximalen Druckauf- und abbaus (mmHg) pro Δ der Zeit (s). Die Daten der beiden Gruppen (Vergleichsgruppe, schwarz dargestellt n=9; Stenosegruppe, grau dargestellt n=7-8) sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Statistische Signifikanzen mit einem Siginifikanzniveau von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) (two-way ANOVA) sind graphisch dargestellt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der absoluten Messungen der linksventrikulären Druckparameter, geben die in Abbildung 19 dargestellten prozentualen Ergebnisse einen Hinweis auf das Ausmaß der Kontraktilitätssteigerung des linksventrikulären Myokards unter dem Einfluss der verschiedenen Pharmaka. Zunächst zeigt die graphische Zusammenstellung, dass es unter Einfluss aller verschiedenen Pharmaka zu einer Erhöhung der linksventrikulären Druckparameter kommt. Für Bradykinin und Adenosin zeigten sich die Messergebnisse zwischen den beiden Gruppen für alle Druckparameter in der Tendenz unterschiedlich, jedoch konnten keine statistischen Signifikanzen entdeckt werden. Isoproterenol zeigte als ß1-selektives Inotropikum die stärkste Wirkung auf die linksventrikuläre Kontraktilität. Darüber hinaus zeigten sich unter Applikation von Isoproterenol signifikante Unterschiede für die prozentuale Veränderung der Druckparameter während der Applikation zwischen der Vergleichs- und Stenosegruppe: Es zeigten sich für den linksventrikulär erzeugten Druck mit einem Mittelwert von 223,59 ± 101,07% in der Vergleichsgruppe (n=9) und 127,06 ± 23,77% in der Stenosegruppe (n=8; $p<0,01$), bezüglich der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit mit 292,93 ± 131,80% in der Vergleichs- und 198,19 ± 21,97% in der Stenosegruppe ($p<0,05$) , sowie der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit mit 325,03 ± 158,48% in der Vergleichs- und 217,26 ± 44,89% in der Stenosegruppe ($p<0,05$) signifikante Unterschiede. Auch der ensystolische linksventrikuläre Druck zeigte sich mit Mittelwerten von 225,16 ± 101,67 % in der Vergleichs- und 122,19 ± 37,40% in der Stenosegruppe ($p<0,001$) signifikant erhöht.

3.1.3. Mausgewicht, Herzgewicht und Ratio

Als Parameter zur Quantifizierung einer myokardialen Hypertrophie wurden – neben den oben beschriebenen Messungen der linksventrikulären Druckparameter – Messungen des Körper- und Herzgewichts der Versuchstiere durchgeführt.

Vor Beginn eines jeden Versuchs wurde das jeweilige Gesamtgewicht der Versuchstiere bestimmt, um zum einen die Dosierung der zur Anästhesie verwendeten Medikamente zu berechnen sowie zum anderen Rückschlüsse über den Habitus der Versuchstiere ziehen zu können. Am Ende der Versuche wurden die Versuchsherzen gewogen. Eine Zusammenschau dieser Messwerte ist in den Abbildungen 20 A&B gezeigt, zusätzlich erfolgte als Quotient aus Herz- und Mausgewicht eine prozentuale Angabe des Herzgewichts am Gesamtgewicht der Versuchstiere (siehe Abbildung 20 C)

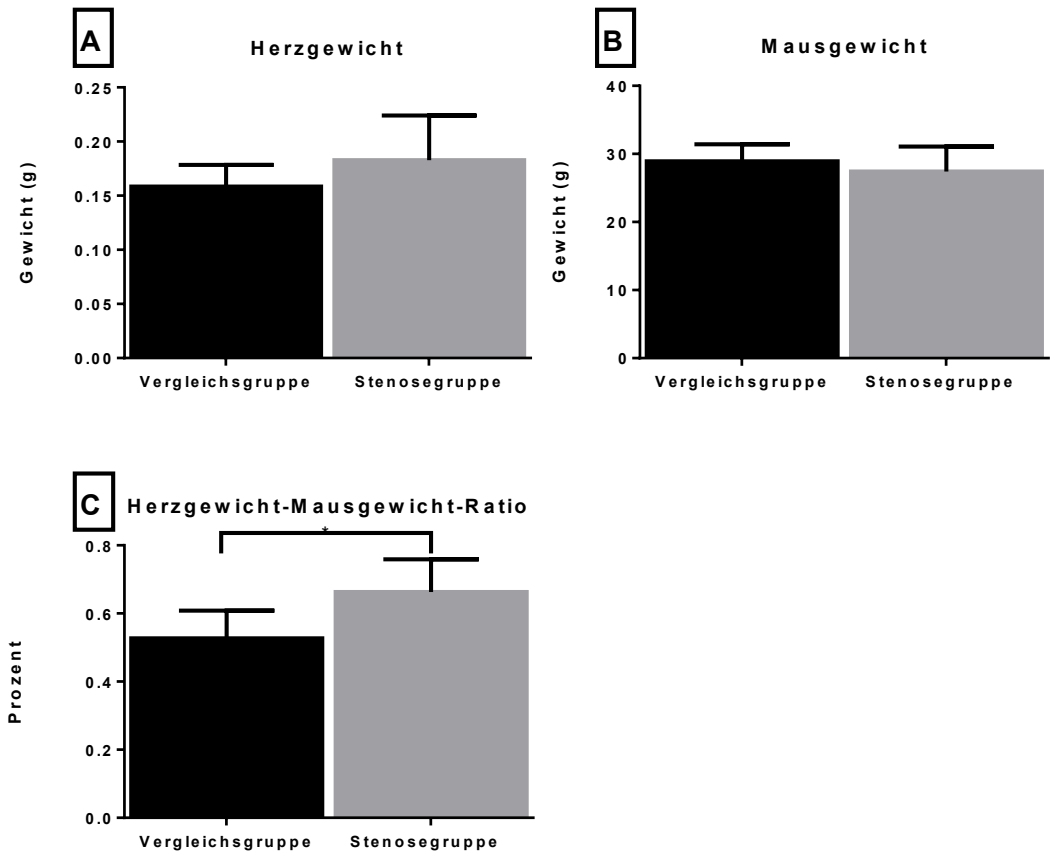


Abbildung 20: Gesamtkörpergewicht- sowie Herzgewicht der Versuchstiere sowie Quotient aus beiden Messparametern in Vergleichs- und Stenosegruppe

Abbildungen 20 A&B zeigen jeweils die absoluten Messwerte für das Herzgewicht (A) und das Gesamtkörpergewicht (B) der Versuchstiere. Zur relativen Darstellung sind in Abbildung 20 C die Ergebnisse der Berechnung des Quotienten aus beiden absoluten Werten dargestellt.
Die Daten der beiden Gruppen (Vergleichsgruppe, schwarz dargestellt n=10; Stenosegruppe, grau dargestellt n=8) sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Statistische Signifikanzen mit einem Siginifikanzniveau von $p < 0,05$ (*) (ungepaarter t-Test) sind graphisch dargestellt.

Das absolute Herzgewicht mit Mittelwerten von 0,155 ± 0,02g in der Vergleichs- sowie 0,183 ± 0,04g in der Stenosegruppe und das Gesamtkörpergewicht der Versuchstiere mit 28,93 ± 2,49g in der Vergleichs- sowie 27,43 ± 3,66g unterschieden sich zwar in der Tendenz, jedoch ohne statistische Relevanz ($p=0,12$ für Herzgewicht bzw. $p=0,31$ für Mausgewicht). Unter Bildung des Quotienten aus Herz- und Gesamtkörpergewicht konnten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im Sinne eines erhöhten prozentualen Herzgewichts in der Stenosegruppe festgestellt werden (0,527 ± 0,08% in der Vergleichs- vs. 0,663 ± 0,09% in der Stenosegruppe; $p<0,05$).

3.1.4. ATP-Messungen im Langendorff-Efluat

Die photometrischen Messungen der ATP-Konzentrationen im Langendorff-Efluat von Tieren der Vergleichsgruppe sowie solchen aus der Stenosegruppe erfolgte, um weitere Einblicke in zu Grunde liegende Mechanismen der koronaren Autoregulation im neuen murinen Modell der Aortenklappenstenose zu liefern. Dabei zeigten sich im Efluat der Tiere aus der Stenosegruppe signifikant niedrigere ATP-Konzentrationen als bei denen der Vergleichsgruppe. Zusammengefasst sind die Messergebnisse dabei in Abbildung 21:

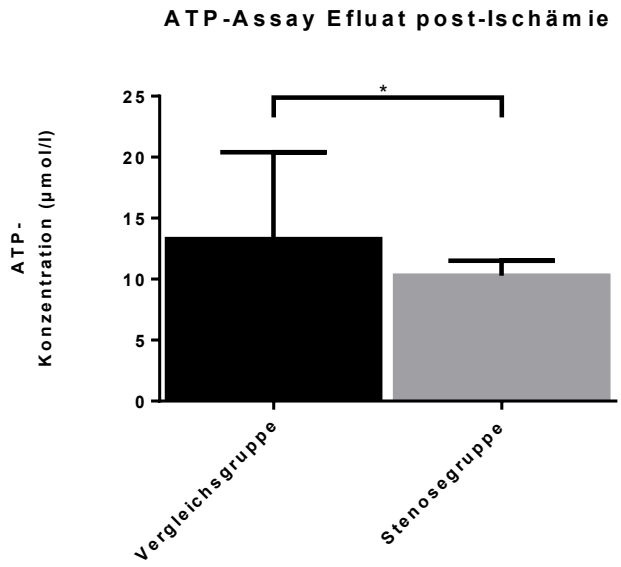


Abbildung 21: Messung der ATP-Konzentration im Langendorff-Efluat nach Globalischämie

Dargestellt sind die Messungen der ATP-Konzentrationen im Langendorff-Efluat nach einminütiger Globalischämie. Die Daten der beiden Gruppen (Vergleichsgruppe, schwarz dargestellt n=3; Stenosegruppe, grau dargestellt n=4) sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Statistische Signifikanzen mit einem Siginifikanzniveau von $p < 0,05$ (*) (ungepaarter t-Test) sind graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen hier mit ATP-Konzentrationen von 13,28 ± 4,12 µmol/l in der Vergleichs- sowie 10,28 ± 0,61 µmol/l in der Stenosegruppe – bei niedrigen n-Zahlen für die Versuchstiere (n=3 in der Vergleichsgruppe, n=4 in der Stenosegruppe; $p = 0,018$) – signifikante Unterschiede.

3.2. Histologische Untersuchungen

3.2.1. Morphologische Veränderungen der Aortenklappe

Zur Darstellung der valvulären Umbauprozesse im Sinne von morphologischen Klappenveränderungen, die durch mechanische Induktion einer Aortenklappenstenose in den Versuchstieren hervorgerufen wurden, erfolgte eine histologische Betrachtung der Aortenklappen von Versuchstieren der Vergleichs- und Stenosegruppe. Zur besseren Darstellung der mikroskopischen Strukturen wurden die Schnittbildpräparate mit Hilfe von Hämatoxylin und Eosin angefärbt. In Abbildung 22 sind exemplarisch jeweils zwei Übersichtsaufnahmen von Aortenklappen aus der Vergleichs- (Abb. 22 A&B) und der Stenosegruppe (Abb. 22 C&D) gegenübergestellt.

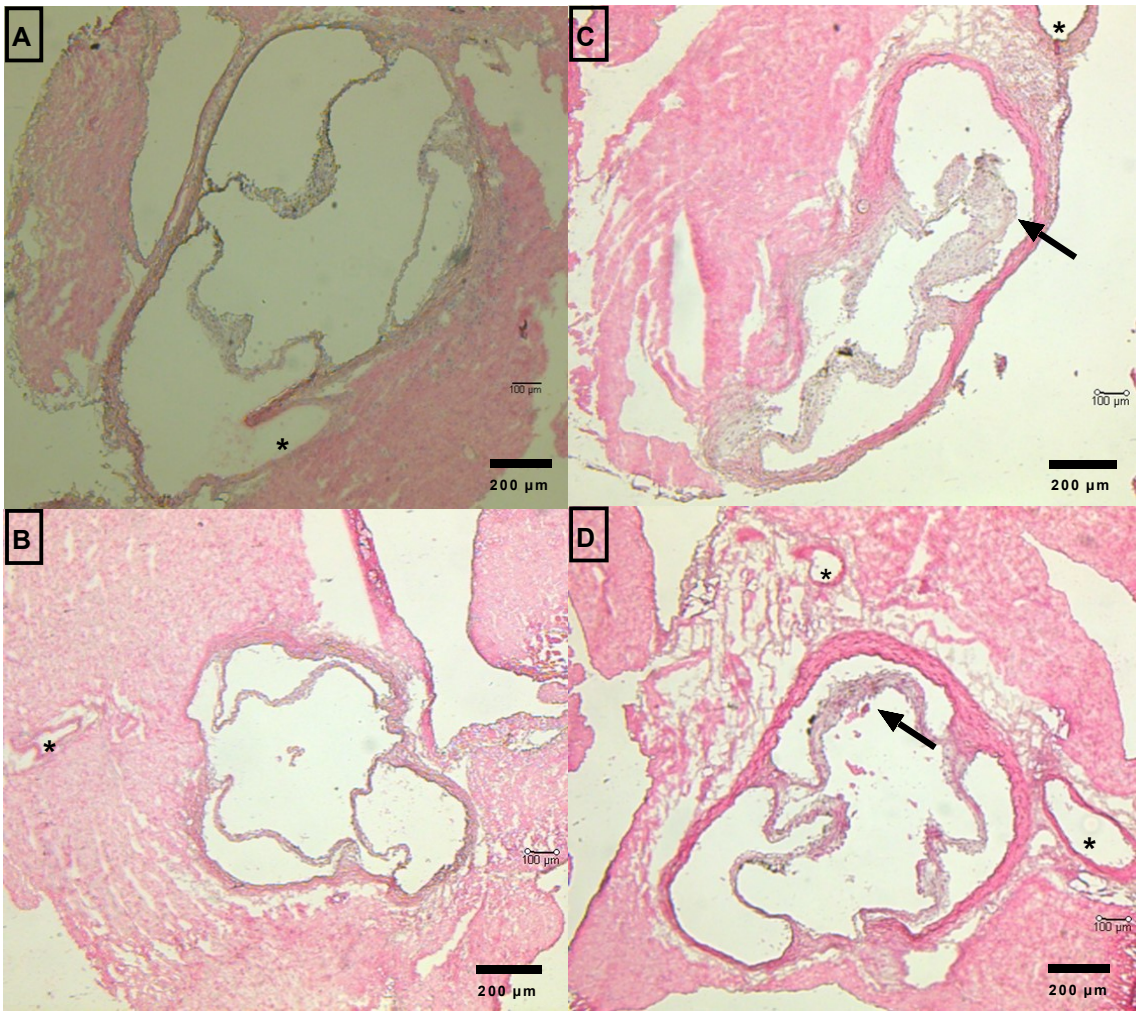


Abbildung 22: Übersichtsaufnahmen der Aortenklappe in der Vergleichs- und Stenosegruppe

Abbildungen 19 A&B zeigen Übersichtsaufnahmen der Aortenklappenebene von altersgematchten Versuchstieren der Vergleichsgruppe, 19 C&D solche der Stenosegruppe in H&E-Färbung sowie 10-facher Vergrößerung. Mit Pfeilen sind die deutlich verdickten und verplumpten Klappentaschen in der Stenosegruppe

markiert. Die mit Sternen (*) markierten, ungefüllten Koronararterien bestätigen das erfolgreiche „Auswaschen“ der restlichen Blutbestandteile vor der histologischen Aufbereitung.

Durch die retrograde Perfusion der Koronarostien sowie des Aortenbulbus mit phosphat-gepufferter Saline (PBS) konnten Blutrückstände an den Aortenklappen sowie in den Koronararterien entfernt werden. Den Erfolg dieser Maßnahme zeigen die mit Markierungen (*) versehenen ungefüllten Querschnitte der Koronararterien in Abbildungen 22 A-D. In allen Übersichtsaufnahmen ist die trikuspide Aortenklappe mit ihren drei Klappentaschen zu sehen. Die Ebene der Aufnahme entspricht dabei in etwa der Höhe des Abganges der Koronararterien (siehe „*“ in Abb. 22 A-D). Auf dieser Höhe sind auch die Insertionsstellen der Klappentaschen am Aortenbulbus (siehe beispielsweise „#“ in Abb. 23 B-D) zu sehen. Die mikroskopischen Aufnahmen der Versuchstiere in der Vergleichsgruppe zeigten schlanke, regelrecht konfigurierte Klappentaschen (siehe Abbildungen 22 A&B). Im Gegensatz dazu zeigten sich die Aortenklappen der Stenosegruppe deutlich verplumpt und die einzelnen Klappentaschen verdickt (siehe Pfeile in Abbildungen 22 C&D).

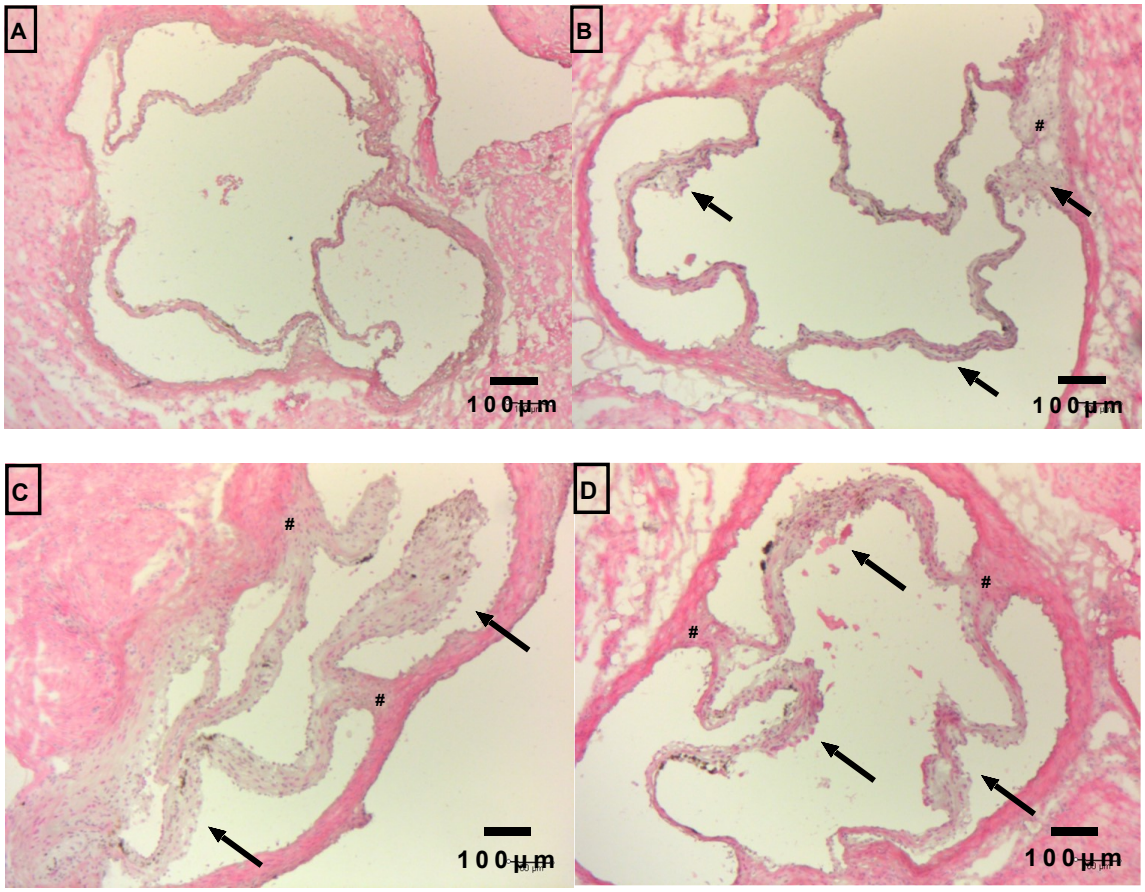


Abbildung 23: Aortenklappenebene von Herzen der Vergleichs- und Stenosegruppe

Abbildung 23 A-D zeigt die Aortenklappenebene eines Herzens eines Versuchstieres der Vergleichsgruppe (20A) im Gegensatz zu solchen der Stenosegruppe (20 B-D) in Hämatoxylin-Eosin Verfärbung in 40-facher

Vergrößerung. Mit Pfeilen markiert sind die deutlich verdickten sowie aufgetriebenen Klappentaschen der Aortenklappen von Tieren der Stenosegruppe, Rautezeichen markieren deutlich verdickte Insertionsstellen (Raphen) der Klappentaschen am Bulbus aortae.

Darüber hinaus zeigen sich bei Betrachtung der histologischen Bilder in stärkerer Vergrößerung endotheliale Defekte der Klappentaschen mit Abschilferungen von Endothelzellen sowie eine unschärfere Abgrenzbarkeit der Klappentaschen von Aortenklappen in Versuchstieren der Stenosegruppe (siehe auch hier die Pfeile in Abbildung 23 B-D). Die Klappen der Vergleichsgruppe zeigten sich zart und glatt berandet (siehe exemplarisch Abbildung 23 A). Außerdem zeigten sich histologisch auch die Insertionsstellen der Klappentaschen am Aortenbulbus deutlich aufgetrieben und verdickt (siehe Rautezeichen „#“ in Abbildungen 23 B-D).

3.2.2. Klappendicke und Klappenfläche

Zur Quantifizierung der oben bildlich dargestellten morphologischen valvulären Umbauprozesse der Aortenklappen bei Versuchstieren der Stenosegruppe erfolgten mit Hilfe der Graphiksoftware Fiji (ImageJ, Erstentwickler Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) Messungen der maximalen Dicke der einzelnen Klappentaschen sowie der Gesamtklappenfläche einer geeigneten Klappenebene in beiden Versuchsgruppen. Durch Bestimmung dieser beiden Parameter wurden der maximalen morphologischen Größenzunahme einer Klappentasche zum einen und der Veränderungen der jeweiligen Aortenklappe im Gesamten Rechnung getragen. Eine graphische Gegenüberstellung dieser Messergebnisse zeigt die Abbildung 24.

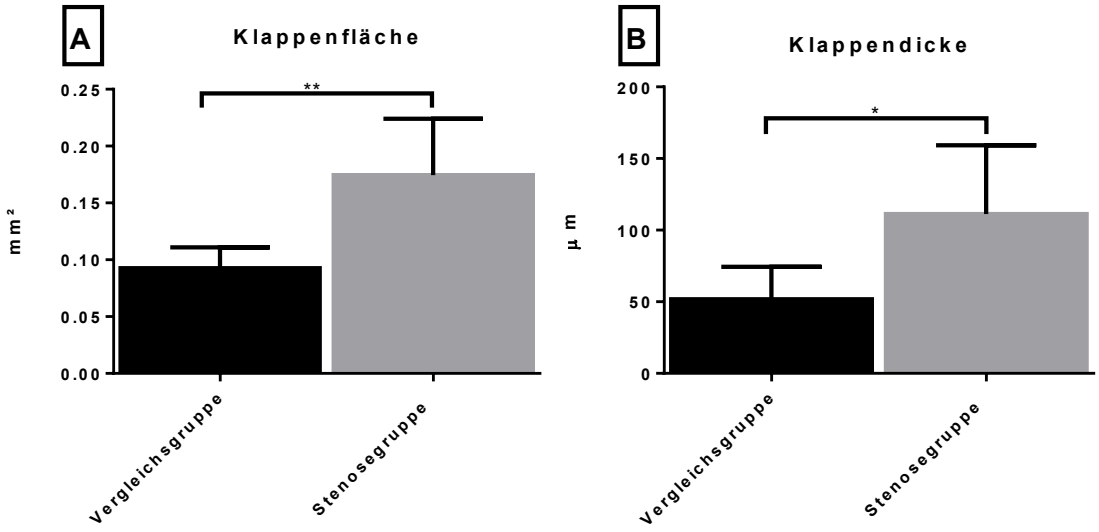


Abbildung 24: Messungen von Klappenfläche und Klappendicke in Vergleichs- und Stenosegruppe

Abbildungen 24 A&B zeigen graphisch gegenübergestellt Messungen der Klappenfläche sowie – dicke jeweils in der Vergleichs- im Gegensatz zur Stenosegruppe.
Die Daten der beiden Gruppen (Vergleichsgruppe, schwarz dargestellt n=8; Stenosegruppe, grau dargestellt n=6) sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Statistische Signifikanzen mit einem Siginifikanzniveau von $p < 0,05$ (*) sowie $p < 0,01$ (**) (ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) sind graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen für die Klappendicke mit Mittelwerten von 51,75 ± 22,74 µm in der Vergleichs- und 111,2 ± 48,06 µm in der Stenosegruppe signifikante Unterschiede ($p<0,05$) der jeweils dicksten Klappentaschen. Auch die Messungen der gesamten Klappenfläche zeigen mit Mittelwerten von 0,092 ± 0,018 mm² in der Vergleichs- und 0,174 ± 0,049 mm² in der Stenosegruppe ($p<0,01$) signifikante Unterschiede und unterstreichen damit den morphologischen Eindruck der Übersichtsaufnahmen.

4. Diskussion

4.1. Mausmodelle und „wire injury“

Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Methode zur Induktion einer solchen Aortenstenose stellt der mechanische „*wire injury“* dar, die erstmals von Honda et al. 2014 beschrieben wurde. Hier wurde – wie im Methodenteil beschrieben – unter volatiler Anästhesie mittels eines flexiblen Drahts durch mechanische Manipulation im Bereich der Aortenklappe ein Umbauprozess induziert, der letztlich zur Aortenklappenstenose führte (Honda et al. 2014).
Bis zur Entdeckung dieser mechanisch induzierten Aortenklappenstenose fokussierte sich die Forschung im Bereich der murinen Aortenklappenstenose auf verschiedene andere Methoden. Hierbei seien zuerst die diätetisch geprägten Methoden genannt, in denen durch eine fett- sowie kohlenhydratreiche Ernährung der Versuchstiere ein erhöhtes Vorkommen von Aortenklappenstenosen induziert wurde (Drolet et al. 2006).
Zusätzlich existierten etablierte Modelle bezüglich der degenerativen Aortenklapenstenose beruhend auf verschiedenen Methoden mit transgenen Mausstämmen (ApoE-KO-Mäuse, Angiotensin/Renin-transgene Mäuse, LDL-R-KO-Mäuse), beispielsweise mit genetisch induzierten Stoffwechselstörungen im Sinne von Hypercholesterinämien (Plump et al. 1992; Zhang et al. 1992) und arterieller Hypertonie (Merrill et al. 1996).
Ein entscheidender Nachteil dieser Methoden war dabei vor allem die lange Dauer (ca. 10 Monate in Apo-E-defizienten Mäusen (Tanaka et al. 2005)) bis zum Auftreten entsprechender Aortenklappenstenosen. Zusätzlich zeigten in diesen Modellen teils nur ca. die Hälfte der Tiere im Verlauf der Untersuchungen eine hämodynamisch relevante Aortenklappenstenose (Miller, Weiss, and Heistad 2011). Entsprechende Vorteile soll nun die neue Methode von Honda et al. bieten, um in kürzerer Zeit von ca. 4 Wochen echokardiographisch sowie hämodynamisch relevante Stenosierungen der Aortenklappe zu induzieren (Honda et al. 2014). In weiteren Versuchen zeigte sich im Verlauf auch die Möglichkeit der Bestimmung der Intensität der Aortenklappenstenose anhand des verwendeten Protokolls für die *„wire injury“* und hiermit bessere Adaptation auf die humane Aortenklappenstenose (Niepmann et al. 2019; Quast et al. 2022).
Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war die weitere Charakterisierung dieser Methode und die dabei in den Versuchstieren/-herzen entstehenden myokardialen Adaptations- sowie valvulären Umbauprozesse.

Der generellen Aufteilung im Ergebnisteil folgend, werden nun im Rahmen der Diskussion zunächst die Ergebnisse der Langendorff-Perfusion – einschließlich der Messungen bezüglich des Koronarflusses sowie der linksventrikulären Druckparameter – analysiert und in den Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse gesetzt.
Darauffolgend werden dann die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen näher beleuchtet. Insgesamt sollen dabei auch weitere Ausblicke gegeben, sowie Limitationen der angewandten Methoden und Untersuchungstechniken beleuchtet werden.

4.2. Langendorff-Perfusion

Zur Charakterisierung der myokardialen Adaptation nach erfolgreicher Induktion einer Aortenklappenstenose wurden an murinen Versuchstierherzen ex vivo im Rahmen der Langendorff-Perfusion zum einen Messungen des Koronarflusses – und damit Rückschlüsse auf die Reagibilität der Koronararterien – sowie zum anderen Messerungen der linksventrikulären Druckparameter durchgeführt. Im Folgenden sollen nun zunächst die Messungen für Koronarfluss und koronare Reagibilität vorgestellt und die wichtigsten Ergebnisse besprochen werden. Darauf folgen die linksventrikulären Druckparameter. In den einzelnen Kapiteln wird dann auch eine Verknüpfung zum klinischen Forschungsstand im Bereich der humanen Aortenklappenstenose stattfinden.

4.2.1. Koronarfluss und koronare Reagibilität

Als erster Versuchsarm wurde zu Beginn der Langendorff-Perfusion nach Äquilibrierungsphase eine einminütige Globalischämie induziert. Hauptziel dieser kompletten Unterbrechung der Perfusion war die Evaluation des Koronarflusses und etwaiger Unterschiede bezüglich der koronararteriellen Reagibilität von Versuchstierherzen sowie solchen mit Aortenklappenstenose. Schon 2004 wurde in Langendorff-Studien die Messung der koronaren Reserve nach Globalischämie bei gesunden Versuchstieren beschrieben (Bratkovsky et al. 2004). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten dabei auf einen in Ruhe – nicht signifikant – erhöhten Koronarfluss in der Stenosegruppe im Gegensatz zur Vergleichsgruppe hin. Darüber hinaus konnte nach Globalischämie im Rahmen einer Hyperämiephase in den Herzen der Stenosegruppe ein signifikant niedrigerer absolut gemessener Koronarfluss sowie signifikant geringerer relativer Anstieg des Koronarflusses gegenüber der Vergleichsgruppe gezeigt werden (siehe Abbildung 17 B und C).

Dieser Effekt ist durch die myokardiale Hypertrophie als Adaptation an die erhöhte linksventrikuläre Nachlast zu erklären. Als Adaptationsmechanismus im Rahmen der Myokardhypertrophie wird so durch einen erhöhten koronararteriellen Fluss in Ruhe eine adäquate Myokardperfusion aufrechterhalten. Im Rahmen einer Ischämie – wie bspw. der Globalischämie im Versuchsaufbau – kann jedoch aufgrund mangelnder koronarer Reservekapazitäten keine adäquate Steigerung des Koronarflusses erreicht werden.

Angewandt auf die Aortenklappenstenose bei Menschen ist dabei die Entstehung von Kardinalsymtpomen der Aortenklappenstenose im Sinne von Angina pectoris, Synkopen sowie Dyspnoe vor allem in Situationen mit erhöhtem myokardialen Perfusionsbedarf unter Belastung (Michail et al. 2018; Lancellotti and Nchimi 2017) die klinische Konsequenz der verminderten koronaren Flussreserve (Zhou et al. 2022). Untermauert werden diese Ergebnisse durch Studien mit invasiver Koronarflussmessung beim Menschen mittels Thermodilution (Carberry, Ang, and Berry 2022; Paolisso et al. 2022). Auch in vorhergehenden Untersuchungen des Koronarflusses im Tiermodel (mittels transaortaler Konstriktion; TAC), konnte eine Einschränkung der koronararteriellen Flussreserve in Abhängigkeit zur myokardialen Hypertrophie gezeigt werden (Hartley et al. 2008). In diesen Studien wurden zur Eruierung der koronararteriellen Flussreserve echokardiographische Messungen der Flussgeschwindigkeiten des Ramus interventricularis anterior (RIVA) durchgeführt – ähnlich wie bei der Stressechokardiographie im Menschen (siehe weiter unten) (Wu et al. 2013). Auch in einem murinen Modell der Aortenklappeninsuffizienz konnte eine myokardiale Hypertrophie und eingeschränkte Koronarreserve gezeigt werden (Wang et al. 2015).

Pathophysiologisch kommen bei der Aortenklappenstenose in vivo dann neben der myokardialen Hypertrophie und der daraus resultierenden Kompression der Koronarien von außen auch eine im Verlauf entstehende diastolische kardiale Dysfunktion im Rahmen der sinkenden Elastizität des linken Ventrikels sowie ein verminderter Koronarfluss aufgrund einer verminderten diastolischen Perfusion im Rahmen des Venturi-Effekts (McConkey et al. 2019) hinzu. Limitierend ist hier bezüglich der Messungen in dieser Arbeit zu erwähnen, dass im Rahmen der Langedorff-Perfusion ex-vivo, diese Faktoren aufgrund der retrograden Perfusion mit methodisch bedingt konstantem Perfusionsdruck nicht von entscheidender Bedeutung sind. Zusammengefasst deuten sie jedoch auf die wichtige Rolle der myokardialen Hypertrophie bei der Entstehung einer mangelnden koronaren Perfusionsreserve im Rahmen der Aortenklappenstenose hin. Die Ergebnisse zeigen somit,

dass das Modell geeignet ist, humane myokardiale und koronare Pathomechanismen abzubilden und zu untersuchen.

Die koronare Perfusion wird von verschiedenen Mechanismen determiniert. Dabei spielen endotheliale Faktoren besonders in größeren Arteriolen und Arterien eine Rolle. Hier ist vor allem eine Aktivierung der NO-Synthase – ausgelöst durch mechanischen „*shear-stress*" auf die Arterienwand – sowie Adenosin- sowie Adrenorezeptoren zu nennen. Darüber hinaus spielen in kleineren und mittleren Arteriolen Autoregulationsmechanismen in Gegenwart von metabolischen Faktoren (bspw. Sauerstoff- sowie Kohlenstoffdioxid-Konzentrationen, pH-Wert) (de Waard et al. 2018) eine entscheidende Rolle.

Die in dieser Arbeit dargestellten ATP-Messungen im Langendorff-Efluat weisen auf die wichtige Rolle von Adenosin und seinen Metaboliten im Rahmen der koronaren Autoregulation vor allem im Bereich der größeren Arteriolen und Koronararterien hin. Hier konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die im Mausmodell durch intravenöse Adenosin- sowie auch ATP-Applikation resultierende koronare Vasodilatation bei Apo-E-KO-Mäusen eingeschränkt ist (Mercier et al. 2012). Die im Ergebnisteil gezeigten erniedrigen ATP-Konzentrationen im Efluat nach Globalischämie (siehe Abbildung 21) bei Versuchstieren mit induzierter Aortenklappenstenose weisen auch in dieser Arbeit auf den Einfluss von ATP sowie Adenosin bei der koronaren Autoregulation und Determinierung der koronaren Reserve hin.

Die wichtige Funktion der NO-Synthase im Rahmen der koronaren Flussreserve und endothelialen Dysfunktion konnte auch in Studien an NO-Knock-Out-Mauslinien gezeigt werden (Gödecke et al. 1998), wo eine eingeschränkte Reagibilität der Flussreserve auf Globalischämie im Langendorff-Modell gezeigt werden konnte. Durch vorhergehende Analysen der Arbeitsgruppe konnte auch im hier vorgestellten Modell der murinen Aortenklappenstenose nach 4 Wochen eine endotheliale Dysfunktion gezeigt werden (Gyamfi Poku 2022).

Auch unter Applikation von primär vasodilatativen Substanzen wie Bradykinin sowie Adenosin deuten in der hier vorgelegten Arbeit Trends auf eine erniedrigte Koronarreserve bei den Herzen mit Aortenklappenstenose hin. Unter Einfluss des positiven Inotropikums und Vasodilatators an glatter Gefäßmuskulatur Isoproterenol zeigen sich die relativen Flussanstiege signifikant niedriger in der Stenosegruppe. Hier kann vermutet werden, dass die ohnehin schon verringerte Koronarreserve unter den induzierten positiv inotropen, gepaart mit den zusätzlich vasodilatativen (Rodriguez et al. 1993) Eigenschaften des Isoproterenols durch die gleichzeitig verstärkte Myokardkontraktion weiterhin

eingeschränkt wird. Diese Ergebnisse sind vor allem interessant im Hinblick auf die zunehmende Patientenzahl mit asymptomatischer höhergradiger Aortenklappenstenose, welche sich im klinischen Monitoring vor zukünftiger interventioneller Therapie befinden. Im Rahmen der beschriebenen Adaptationsmechanismen sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen, ist hier von einer über eine längere Zeit bestehenden Kompensation der steigenden linksventrikulären Nachlast durch einen basal erhöhten Koronarfluss auszugehen. Erst bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf reicht dann die koronare Reserve sowie Kontraktilitätsreserve (siehe Kapitel „Myokardhypertrophie und kontraktile Reserve“) nicht mehr aus, um eine ausreichende systemische sowie koronararterielle Perfusion zu gewährleisten. Bei Patienten, die dann „symptomatisch“ werden, ist eine deutliche Zunahme der Mortalität zu beobachten (Grimard, Safford, and Burns 2016).

Studien bei Patienten mit Aortenklappenstenosen und interventioneller Therapie mittels transarteriellem Aortenklappenersatz (TAVI) konnten eine deutliche Verbesserung der koronaren Reserve sowie Senkung der linksventrikulären Druckverhältnisse direkt nach Intervention zeigen (Wiegerinck et al. 2015; Ben-Dor et al. 2014), was auf eine teilweise Reversibilität der Pathomechanismen hindeutet. Diese deuten darauf hin, dass vor allem die verringerten intrakavitären Druckverhältnisse im linken Ventrikel schlagartig die koronare Perfusion verbessern und damit auch die koronare Reservefunktion optimiert wird (Rolandi et al. 2016).

In Hinblick auf die bei entsprechendem Risikoprofil (metabolisches Syndrom, Nikotinkonsum, hohes Alter, familiäre Prädisposition) auch verstärkt auftretende Komorbidität von Aortenklappenstenosen mit einer relevanten stenosierenden koronaren Herzerkrankung erhält die Relevanz einer erhaltenen Koronarreserve einen hohen Stellenwert. Bei Patienten mit KHK zeigt sich bei erhaltener Koronarreserve – bei Snoer et al. echokardiographisch gemessen – eine erhöhte kardiopulmonale Fitness in spiroergometrischen Untersuchungen der maximalen Sauerstoffaufnahmekapazität (VO_2max) (Snoer et al. 2014). Die Messung der koronaren Reserve erfolgt dabei beim Menschen stress-echokardiographisch – durch direkte dopplersonographische Messungen des Flusses im RIVA in Ruhe sowie unter „Stressbedingungen“ (Dimitrow 2003; Mulvagh and Mokhtar 2019). Hier hat sich im Verlauf der letzten Jahre die „Quadrupel-Stressechokardiographie“ etabliert, zu der – neben der Detektion von regionalen Wandbewegungsstörungen – auch die echokardiographische Messung von koronarer sowie kontraktiler Reserve gehört (Picano, Morrone, et al. 2019).

4.2.2. Myokardhypertrophie und kontraktile Reserve

Im Weiteren werden nun die erhobenen Messdaten der linksventrikulären Druckparameter besprochen. Wie schon im Kapitel „Koronarfluss und koronare Reagibilität“ beschrieben, deuten auch die Messdaten aus dieser Arbeit hier deutlich auf eine linksventrikuläre Myokardhypertrophie im Rahmen der myokardialen Adaptation an die Aortenklappenstenose hin. Vor allem in den frühen Phasen der Perfusion nach stattgehabter Äquilibrierung zeigen sich signifikant erhöhte linksventrikulär aufgebrachte Drücke („developed pressure“, DP) sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten (dPmax/dt; dPmin/dt = Δ des maximalen Druckauf- und abbaus (mmHg) pro Δ der Zeit (s)) in der Stenosegruppe im Gegensatz zur Vergleichsgruppe (siehe Abb. 16). Unter positiv inotropem sowie lusitropem Einfluss von Isoproterenol zeigt sich in den absoluten Messwerten in der Vergleichs- sowie Stenosegruppe ein signifikanter Unterschied im Rahmen der Kontraktions- sowie Relaxationsgeschwindigkeiten. Diese Effekte sind im Trend auch unter Einfluss von Adenosin zu verzeichnen, hier aber nicht signifikant.

Diesen basal erhöhten linksventrikulären Druckparametern der Herzen aus der Stenosegruppe ist eine funktionelle Einbuße der „kontraktilen Reserve“ gegenüberzusetzen. Diese zeigt sich bei Betrachtung der relativen Anstiege der linksventrikulären Druckparameter unter Einfluss verschiedener Pharmaka: bei Bradykinin sowie Adenosin schon im Trend höhere prozentuale Anstiege von erzeugtem Druck sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, zeigen sich unter positiv inotropem, lusitropem und vasodilatativem Einfluss von Isoproterenol signifikante Unterschiede in diesen Parametern (siehe Abbildung 19). Das spricht insgesamt für eine herabgesetzte „kontraktile Reserve“ im Rahmen der fortschreitenden myokardialen Hypertrophie. Ähnliches konnte auch in Studien mittels Zellkultur an Kardiomyozyten im Sinne einer geringeren Kontraktilität gezeigt werden (Ott et al. 2021; Ito et al. 2000). Die myokardiale Hypertrophie wurde in diesen Studien mittels transversaler aortaler Konstriktion (TAC) erreicht, einer der induzierten Aortenklappenstenose ähnlichen Methode mit dem primären Ziel der Induktion einer myokardialen Hypertrophie (deAlmeida, van Oort, and Wehrens 2010). Studien unter Verwendung dieser Methode konnten bereits einen engen Zusammenhang zwischen eingeschränkter koronarer sowie kontraktiler Reserve zeigen (Hartley et al. 2008).

Im Rahmen von echokardiographischen Untersuchungen unter Einfluss inotroper Pharmaka („Stress-Echokardiographie“) hat sich im Laufe der letzten 20 Jahre eine funktionelle Messung der kontraktilen Reserve im Rahmen von Stress-Echokardiographien auch im Menschen etabliert. Zur Berechnung werden hier die Verhältnisse des systolischen

Blutdrucks zum endsystolischen Volumen in Ruhe sowie unter induziertem myokardialem Stress – mittels körperlicher Belastung oder unter Zuhilfenahme inotroper/vasodilatativer Substanzen (Dobutamin/Adenosin) – verwendet (Picano, Bombardini, et al. 2019). Hier konnte für Menschen mit linksventrikulärer Hypertrophie eine verminderte kontraktile Reserve unter Einfluss von Dobutamin gezeigt werden (Fontanet, Pérez, and Dávila-Román 1996). In Studien konnte auch gezeigt werden, dass eine solche erniedrigte kontraktile Reserve bei Patienten mit – noch asymptomatischer – hochgradiger Aortenklappenstenose mit einer erhöhten Mortalität einhergeht (Arbucci et al. 2022; O'Connor et al. 2010).

Zusätzlich zu den funktionellen Messungen in der Langendorff-Perfusion in dieser Arbeit, zeigen auch bildgebende Verfahren wie Echokardiographie und Kardio-MRT-Untersuchungen von Tieren mit induzierter Aortenstenose eine deutliche linksventrikuläre Myokardhypertrophie (Quast et al. 2022). Angetrieben wird dieser Adaptationsmechanismus dabei von erhöhten Plasmaspiegeln von Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (Insulin-like-growth-factor 1)(Villar et al. 2009), die initial vor allem durch Hypertrophie der Kardiomyozyten charakterisiert ist. Erst bei weiter fortschreitender Erkrankung und längerfristig bestehender erhöhter linksventrikulärer Nachlast spielen dann Umbauprozesse im Sinne einer Fibrosierung eine stärkere Rolle (Bing et al. 2019).
Auch die Messungen von Maus- sowie Herzgewicht bei Versuchs- und Stenosetieren in dieser Arbeit unterstützen dabei die zentrale Rolle der myokardialen Hypertrophie und zeigen dabei unter Bildung eines Herzgewicht-/Mausgewicht-Quotienten signifikant höhere Anteile des Herzgewichts am Gesamtgewicht bei Tieren mit Aortenklappenstenosen (siehe Abbildung 20). Ähnliche Ergebnisse bezüglich des gestiegenen Herzgewichts zeigen dabei auch andere Studien an hypercholesterinämen Mäusen mit Aortenklappenstenose (Miller et al. 2010). Dabei schreitet die Hypertrophie im Verlauf im murinen Modell weiter fort und trägt dann auch zu einer erhöhten Mortalität in den Versuchstieren bei, gezeigt im initialen *„Wire injury“*-Modell von 2014 (Honda et al. 2014).

4.3. Histologische Untersuchungen

Grund der oben beschriebenen myokardialen Umbauprozesse mit resultierend eingeschränkter kontraktiler sowie koronarer Reserve ist bei der Aortenklappenstenose funktionell eine Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstrakts im Bereich der Aortenklappe. Diese Obstruktion entsteht dabei durch fortschreitend zunehmende Umbauprozesse und somit Verdickung der Aortenklappentaschen, die zu einer Reduktion

der Aortenklappenöffnungsfläche führen. Dabei wurde lange eine primäre Kalzifizierung der Klappentaschen als zentraler Pathomechanismus vermutet. Hier hat sich jedoch mit vermehrten wissenschaftlichen Erkenntnissen ein komplexerer pathomechanischer Zusammenhang verschiedener Faktoren wie Inflammation, endothelialer Dysfunktion und Calcium- sowie Fetteinlagerungen in die Klappe gezeigt (Katsi et al. 2021). Die morphologischen Veränderungen solcher stenosierten Aortenklappen konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels histologischer Untersuchungen dargestellt und quantifiziert werden und dadurch bei Tieren mit induzierter Aortenklappenstenose nach *„wire injury“* deutliche valvuläre Umbauprozesse gezeigt werden.

Anatomisch zeigen physiologische Aortenklappentaschen ein fibrinöses Gerüst, dem zur ventrikulären und aortalen Seite jeweils eine schmale Endothelschicht aufliegt (Piazza et al. 2008). Im Rahmen der valvulären Umbauprozesse bei induzierter Aortenklappenstenose zeigt sich vor allem eine Verplumpung sowie Verdickung der Klappentaschen. Diese ist in der histologischen Aufarbeitung in den mittigen/zentralen Anteilen der Aortenklappe im Bereich der Adaptationszone am deutlichsten zu erkennen (siehe Abb. 20 B, C & D). Zusätzlich zeigt sich auch im Bereich der Raphen (Insertionsstellen der Aortenklappentaschen mit dem Aortenbogen) eine deutliche Auftreibung des Gewebes (siehe Abbildung 23, Raute-Zeichen). In den in dieser Arbeit vorgelegten histologischen Abbildungen der Aortenklappen zeigt sich hier zusätzlich zur Vermehrung des valvulären Gewebes auch eine erhöhte Zelldichte. Diese äußert sich in einer morphologisch deutlich gestiegenen Anzahl an Zellkernen. Dazu kommt eine morphologische Vermehrung des extrazellularen Raums (EZM) im Bereich der Klappentaschen. In Mausmodellen mit metabolisch induzierter Aortenklappenstenose konnten hier vermehrt Makrophagen, „Schaumzellen“ (Makrophagen mit intrazellulären Lipidansammlungen) sowie Calcium-Einlagerungen festgestellt werden (Drolet et al. 2006). Die histologischen Untersuchungen deuten hier im Rahmen der unterschiedlichen Ausprägung der Verplumpung auch auf die Möglichkeit einer Differenzierung des Schweregrades der Aortenklappenstenose hin, die mit dem *„wire injury“* erreicht wird (Niepmann et al. 2019; Quast et al. 2022). Ähnliche inflammatorisch/proliferative Prozesse und histologische Veränderungen konnten auch im initialen *„wire-injury“*-Modell (Honda et al. 2014) gezeigt werden und deuten damit auf die hohe Wertigkeit und Reproduzierbarkeit dieser neuen Methode zur Evaluation der Aortenklappenstenose im Mausmodell hin.

4.4. Limitationen dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung eines murinen Modells der Aortenklappenstenose nach mechanisch induziertem *„wire injury“* im Hinblick auf die myokardiale Adaptation sowie valvuläre Umbauprozesse. In der Langendorff-Perfusion konnte gezeigt werden, dass bei Versuchstieren mit Aortenklappenstenose eine myokardiale Hypertrophie, gepaart mit einer eingeschränkten koronaren Perfusionsreserve vorliegen.

An dieser Stelle sollen jedoch auch methodische Limitationen aufgezeigt werden. Hier ist zum einen zu erwähnen, dass in dieser Versuchsreihe alle Medikamentenapplikationen an einem Herzen – zwar unter Einhaltung von „Auswaschphasen“ – hintereinander durchgeführt wurden. So könnten mögliche Einschränkungen bezüglich der Aussagekraft der zuletzt gemessenen Werte für die Adenosin- sowie Isoproterenol-Applikationen entstehen. Für eine weitere Differenzierung wären hier sicher im Verlauf weitere Messungen mit alleiniger Applikation der einzelnen Pharmaka sinnvoll, um Fehlmessungen auszuschließen. Auch eine Applikation verschiedener Dosierungen der Pharmaka kann hier von Vorteil sein, um den aktuell nicht signifikanten Einfluss der Bradykinin- sowie Adenosin auf sowohl den koronararteriellen Fluss sowie die linksventrikulären Druckparameter in Stenosetieren weiter zu erforschen.

Darüber hinaus wurden im Rahmen der Messungen in dieser Arbeit die linksventrikulären Ejektionsfraktionen (EF) der Versuchstiere mit induzierter Aortenklappenstenose sowie der Vergleichsgruppe nicht im Prozedere der Langendorff-Perfusion sowie histologischen Untersuchungen unterschieden. Hier sollten im Verlauf weitere Untersuchungen in diesem murinen Modell der Aortenklappenstenose unter Berücksichtigung der Ejektionsfraktion erfolgen, um noch differenziertere Aussagen treffen zu können. Dieser Punkt führt zur Limitation, dass in dieser Arbeit aktuell nur „junge“ Versuchstiere, relativ kurz nach Induktion der Aortenklappenstenose (4 Wochen nach *„wire injury“*) untersucht wurden. Für die weitere Untersuchung myokardialer Veränderungen sowie auch histologischer Parameter ist hier weitere Forschung auch in weiter fortgeschrittenen Erkrankungsstadien notwendig.

Im Rahmen der histologischen Untersuchungen wurden in dieser Arbeit die valvulären Umbauprozesse fokussiert. Wie jedoch weiter oben mehrfach beschrieben, nimmt die myokardiale Hypertrophie eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese fortgeschrittener Aortenklappenstenosen ein. Hier sind im Verlauf weitere histologische Untersuchungen zur Beurteilung der myokardialen Adaptionsvorgänge auf Gewebe- und zellulärer Ebene notwendig.

4.5. Zusammenfassung und Ausblick

Als häufigste Herzklappenerkrankung in der westlichen Welt stellt die degenerative Aortenklappenstenose eine wichtige Entität mit steigender Prävalenz und Mortalität dar. Besonders auch aufgrund der initial lange schleichend voranschreitenden Aortenklappensklerose ohne hämodynamische Relevanz und klinische Symptomatik, ist die Diagnosestellung dabei oft sehr verzögert. Bei Erstdiagnose liegt dann oft bereits eine höhergradige Stenosierung vor und die therapeutischen Möglichkeiten zeigen sich begrenzt, wobei bis heute keine suffiziente medikamentöse Therapieoption zur Prävention der Aortenklappenstenose vorliegt.

In dieser Arbeit konnte nun ein 2014 neu etabliertes Mausmodell zur mechanischen Induktion einer Aortenklappenstenose weiter charakterisiert werden. Die in diesem Modell induzierten Aortenklappenstenosen zeigen dabei ähnliche pathomechanistische Grundlagen wie die degenerative Aortenklappenstenose beim Menschen, eine Vergleichbarkeit ist damit gegeben. Durch die in diesem Modell vor allem induzierten mittelgradigen Aortenklappenstenosen wird hiermit vor allem die im Menschen initiale Phase der symptomfreien Aortenklappenstenose abgebildet und in dieser Arbeit gezeigt, dass auch schon früh im Erkrankungsverlauf entscheidende myokardiale sowie valvuläre Adaptationen und Umbauprozesse stattfinden. Das legt nahe, dass durch eine frühe Diagnosestellung und Therapie die Umbauprozesse zum Teil unterbunden und somit eine Verringerung der Mortalität bewirken könnte im Sinne einer zukünftigen sogenannten „targeted therapy“.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten dabei auf die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie als wichtigsten Pathomechanismus im Rahmen der myokardialen Adaptation an die steigende linksventrikuläre Nachlast hin. Im Rahmen dieser Hypertrophie konnte deutlich eine funktionelle Einschränkung der koronaren Flussreserve bei Versuchstieren mit Aortenklappenstenose – unter Einfluss einer Globalischämie sowie verschiedener vasodilatativer und inotroper Pharmaka – gezeigt werden. Konsekutiv zeigte sich auch die kontraktile Reserve bei Versuchstieren mit induzierter Aortenklappenstenose eingeschränkt. All diese strukturellen und funktionellen Adaptationsmechanismen basieren dabei auf einer erhöhten linksventrikulären Nachlast als Ausdruck der sich verkleinernden Aortenklappenöffnungsfläche bei fortschreitender Stenosierung der Klappentaschen. Eine deutliche Verplumpung und Verdickung der Aortenklappen konnte in dieser Arbeit im Mausmodell verdeutlicht werden.

Zusammenfassend liegt mit diesem neuen murinen Modell der Aortenklappenstenose also eine neue valide Methode zur weiteren Erforschung der Erkrankung vor. Im Verlauf sind hier weitere Forschungsbemühungen sinnvoll und notwendig, um weitere Gesichtspunkte der Erkrankung wie morphologische myokardiale Veränderungen darzustellen.
Hierbei ist im Verlauf vor allem die Möglichkeit der Etablierung verschiedener medikamentöser Therapieregime zur Verlangsamung der Erkrankungsprogredienz ein wichtiges Forschungsbestreben.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

Agmon, Y., B. K. Khandheria, I. Meissner, J. R. Sicks, W. M. O'Fallon, D. O. Wiebers, J. P. Whisnant, J. B. Seward, and A. J. Tajik. 2001. 'Aortic valve sclerosis and aortic atherosclerosis: different manifestations of the same disease? Insights from a population-based study', *J Am Coll Cardiol*, 38: 827-34.

Akhtar, M., E. M. Tuzcu, S. R. Kapadia, L. G. Svensson, R. K. Greenberg, E. E. Roselli, S. Halliburton, V. Kurra, P. Schoenhagen, and S. Sola. 2009. 'Aortic root morphology in patients undergoing percutaneous aortic valve replacement: evidence of aortic root remodeling', *J Thorac Cardiovasc Surg*, 137: 950-6.

Arbucci, R., D. M. Lowenstein Haber, M. G. Rousse, A. K. Saad, L. Martínez Golleti, N. Gastaldello, M. Amor, C. Caniggia, P. Merlo, G. Zambrana, M. Galello, E. Clos, V. Mora, and J. A. Lowenstein. 2022. 'Long Term Prognostic Value of Contractile Reserve Assessed by Global Longitudinal Strain in Patients with Asymptomatic Severe Aortic Stenosis', *J Clin Med*, 11.

Barrick, C. J., R. B. Roberts, M. Rojas, N. M. Rajamannan, C. B. Suitt, K. D. O'Brien, S. S. Smyth, and D. W. Threadgill. 2009. 'Reduced EGFR causes abnormal valvular differentiation leading to calcific aortic stenosis and left ventricular hypertrophy in C57BL/6J but not 129S1/SvImJ mice', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297: H65-75.

Baumgartner, H., J. Hung, J. Bermejo, J. B. Chambers, A. Evangelista, B. P. Griffin, B. Iung, C. M. Otto, P. A. Pellikka, M. Quinones, and Eae/Ase. 2009. 'Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice', *Eur J Echocardiogr*, 10: 1-25.

Baumgartner, Helmut, Volkmar Falk, Jeroen J Bax, Michele De Bonis, Christian Hamm, Per Johan Holm, Bernard Iung, Patrizio Lancellotti, Emmanuel Lansac, Daniel Rodriguez Muñoz, Raphael Rosenhek, Johan Sjögren, Pilar Tornos Mas, Alec Vahanian, Thomas Walther, Olaf Wendler, Stephan Windecker, Jose Luis Zamorano, and ESC Scientific Document Group. 2017. '2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease', *European Heart Journal*, 38: 2739-91.

Ben-Dor, I., R. Malik, S. Minha, S. A. Goldstein, Z. Wang, M. A. Magalhaes, G. Weissman, P. G. Okubagzi, R. Torguson, J. Lindsay, L. F. Satler, A. D. Pichard, and R. Waksman. 2014. 'Coronary blood flow in patients with severe aortic stenosis before and after transcatheter aortic valve implantation', *Am J Cardiol*, 114: 1264-8.

Bergler-Klein, J., M. Gyongyosi, and G. Maurer. 2014. 'The role of biomarkers in valvular heart disease: focus on natriuretic peptides', *Can J Cardiol*, 30: 1027-34.

Bertazzo, S., and E. Gentleman. 2017. 'Aortic valve calcification: a bone of contention', *Eur Heart J*, 38: 1189-93.

Bhattacharyya, S., T. Mittal, M. Abayalingam, T. Kabir, M. Dalby, J. G. Cleland, A. Baltabaeva, and S. Rahman Haley. 2016. 'Classification of Aortic Stenosis by Flow and Gradient Patterns Provides Insights into the Pathophysiology of Disease', *Angiology*, 67: 664-9.

Bing, R., J. L. Cavalcante, R. J. Everett, M. A. Clavel, D. E. Newby, and M. R. Dweck. 2019. 'Imaging and Impact of Myocardial Fibrosis in Aortic Stenosis', *JACC Cardiovasc Imaging*, 12: 283-96.

Boon, Arthur, Emile Cheriex, Jan Lodder, and Fons Kessels. 1997. 'Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve', *Heart*, 78: 472-74.

Borea, P. A., S. Gessi, S. Merighi, F. Vincenzi, and K. Varani. 2018. 'Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art', *Physiol Rev*, 98: 1591-625.

Bratkovsky, S., E. Aasum, C. H. Birkeland, R. A. Riemersma, E. S. Myhre, and T. S. Larsen. 2004. 'Measurement of coronary flow reserve in isolated hearts from mice', *Acta Physiologica Scandinavica*, 181: 167-72.

Bull, S., M. Loudon, J. M. Francis, J. Joseph, S. Gerry, T. D. Karamitsos, B. D. Prendergast, A. P. Banning, S. Neubauer, and S. G. Myerson. 2015. 'A prospective, double-blind, randomized

controlled trial of the angiotensin-converting enzyme inhibitor Ramipril In Aortic Stenosis (RIAS trial)', *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 16: 834-41.
'Calcific aortic stenosis'. 2016. *Nat Rev Dis Primers*, 2: 16007.
Carabello, Blase A. 2013. 'Introduction to Aortic Stenosis', *Circulation Research*, 113: 179-85.
Carberry, J., D. Ang, and C. Berry. 2022. 'Coronary blood flow and severe aortic stenosis', *Heart*, 109: 6-7.
Chiang, S. J., M. Daimon, S. Miyazaki, T. Kawata, R. Morimoto-Ichikawa, M. Maruyama, H. Ohmura, K. Miyauchi, S. L. Lee, and H. Daida. 2016. 'When and how aortic stenosis is first diagnosed: A single-center observational study', *J Cardiol*, 68: 324-8.
Chu, Yi, Donald D. Lund, Hardik Doshi, Henry L. Keen, Kevin L. Knudtson, Nathan D. Funk, Jian Q. Shao, Justine Cheng, Georges P. Hajj, Kathy A. Zimmerman, Melissa K. Davis, Robert M. Brooks, Mark W. Chapleau, Curt D. Sigmund, Robert M. Weiss, and Donald D. Heistad. 2016. 'Fibrotic Aortic Valve Stenosis in Hypercholesterolemic/Hypertensive Mice', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36: 466-74.
Clavel, M. A., P. Pibarot, D. Messika-Zeitoun, R. Capoulade, J. Malouf, S. Aggarval, P. A. Araoz, H. I. Michelena, C. Cueff, E. Larose, J. D. Miller, A. Vahanian, and M. Enriquez-Sarano. 2014. 'Impact of aortic valve calcification, as measured by MDCT, on survival in patients with aortic stenosis: results of an international registry study', *J Am Coll Cardiol*, 64: 1202-13.
Coffey, Sean, Brian Cox, and Michael J. A. Williams. 2014. 'The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis', *Journal of the American College of Cardiology*, 63: 2852-61.
Cribier, A. 2012. 'Development of transcatheter aortic valve implantation (TAVI): a 20-year odyssey', *Arch Cardiovasc Dis*, 105: 146-52.
d'Arcy, J. L., S. Coffey, M. A. Loudon, A. Kennedy, J. Pearson-Stuttard, J. Birks, E. Frangou, A. J. Farmer, D. Mant, J. Wilson, S. G. Myerson, and B. D. Prendergast. 2016. 'Large-scale community echocardiographic screening reveals a major burden of undiagnosed valvular heart disease in older people: the OxVALVE Population Cohort Study', *Eur Heart J*, 37: 3515-22.
Davin, L., R. Dulgheru, and P. Lancellotti. 2015. 'ACE inhibitors in aortic stenosis: no fear just hope', *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 16: 828-30.
de Lucia, C., A. Eguchi, and W. J. Koch. 2018. 'New Insights in Cardiac beta-Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging', *Front Pharmacol*, 9: 904.
de Waard, G. A., C. M. Cook, N. van Royen, and J. E. Davies. 2018. 'Coronary autoregulation and assessment of stenosis severity without pharmacological vasodilation', *Eur Heart J*, 39: 4062-71.
deAlmeida, A. C., R. J. van Oort, and X. H. Wehrens. 2010. 'Transverse aortic constriction in mice', *J Vis Exp*.
Dendorfer, A., S. Wolfrum, M. Wagemann, F. Qadri, and P. Dominiak. 2001. 'Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H2182-8.
Dimitrow, P. P. 2003. 'Transthoracic Doppler echocardiography - noninvasive diagnostic window for coronary flow reserve assessment', *Cardiovascular Ultrasound*, 1: 4.
Drolet, M. C., E. Roussel, Y. Deshaies, J. Couet, and M. Arsenault. 2006. 'A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice', *J Am Coll Cardiol*, 47: 850-5.
Dweck, M. R., N. A. Boon, and D. E. Newby. 2012. 'Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium', *J Am Coll Cardiol*, 60: 1854-63.
Elmariah, S., C. McCarthy, N. Ibrahim, D. Furman, R. Mukai, C. Magaret, R. Rhyne, G. Barnes, R. R. J. van Kimmenade, and J. L. Januzzi, Jr. 2018. 'Multiple biomarker panel to screen for severe aortic stenosis: results from the CASABLANCA study', *Open Heart*, 5: e000916.

Fontanet, H. L., J. E. Pérez, and V. G. Dávila-Román. 1996. 'Diminished contractile reserve in patients with left ventricular hypertrophy and increased end-systolic stress during Dobutamine stress echocardiography', *Am J Cardiol*, 78: 1029-35.

Getz, G. S., and C. A. Reardon. 2018. 'Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport', *Int J Mol Sci*, 19.

Gibbons, G. H., and V. J. Dzau. 1996. 'Molecular therapies for vascular diseases', *Science*, 272: 689-93.

Gödecke, A., U. K. Decking, Z. Ding, J. Hirchenhain, H. J. Bidmon, S. Gödecke, and J. Schrader. 1998. 'Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice', *Circ Res*, 82: 186-94.

Goliasch, G., A. A. Kammerlander, C. Nitsche, C. Dona, L. Schachner, B. Öztürk, C. Binder, F. Duca, S. Aschauer, G. Laufer, C. Hengstenberg, D. Bonderman, and J. Mascherbauer. 2019. 'Syncope: The Underestimated Threat in Severe Aortic Stenosis', *JACC Cardiovasc Imaging*, 12: 225-32.

Gould, K. L. 1997. 'Why angina pectoris in aortic stenosis', *Circulation*, 95: 790-2.

Grimard, B. H., R. E. Safford, and E. L. Burns. 2016. 'Aortic Stenosis: Diagnosis and Treatment', *Am Fam Physician*, 93: 371-8.

Gyamfi Poku, Isabella 2022. Dissertation. "The role of systemic endothelial dysfunction in an experimental model of aortic valve stenosis." In *Publikationsservice Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf*.

Hardy, R. N., Z. D. Simsek, B. Curry, S. L. Core, T. Beltz, B. Xue, A. K. Johnson, R. L. Thunhorst, and K. S. Curtis. 2018. 'Aging affects isoproterenol-induced water drinking, astrocyte density, and central neuronal activation in female Brown Norway rats', *Physiol Behav*, 192: 90-97.

Hartley, C. J., A. K. Reddy, S. Madala, L. H. Michael, M. L. Entman, and G. E. Taffet. 2008. 'Doppler estimation of reduced coronary flow reserve in mice with pressure overload cardiac hypertrophy', *Ultrasound in Medicine and Biology*, 34: 892-901.

Honda, S., T. Miyamoto, T. Watanabe, T. Narumi, S. Kadowaki, Y. Honda, Y. Otaki, H. Hasegawa, S. Netsu, A. Funayama, M. Ishino, S. Nishiyama, H. Takahashi, T. Arimoto, T. Shishido, T. Miyashita, and I. Kubota. 2014. 'A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 270-8.

Hulin, A., A. Hego, P. Lancellotti, and C. Oury. 2018. 'Advances in Pathophysiology of Calcific Aortic Valve Disease Propose Novel Molecular Therapeutic Targets', *Front Cardiovasc Med*, 5: 21.

Irvine, T., and A. Kenny. 1997. 'Aortic stenosis and angina with normal coronary arteries: the role of coronary flow abnormalities', *Heart*, 78: 213-4.

Ishibashi, Shun, Michael S Brown, Joseph L Goldstein, Robert D Gerard, Robert E Hammer, and Joachim Herz. 1993. 'Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery', *The Journal of clinical investigation*, 92: 883-93.

Ito, K., X. Yan, M. Tajima, Z. Su, W. H. Barry, and B. H. Lorell. 2000. 'Contractile reserve and intracellular calcium regulation in mouse myocytes from normal and hypertrophied failing hearts', *Circ Res*, 87: 588-95.

Kaden, Jens J., Carl-Erik Dempfle, Rainer Grobholz, Hanh-Thai Tran, Refika Kılıç, Aslıhan Sarıkoç, Martina Brueckmann, Christian Vahl, Siegfried Hagl, Karl K. Haase, and Martin Borggrefe. 2003. 'Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis', *Atherosclerosis*, 170: 205-11.

Kamperidis, V., V. Delgado, N. M. van Mieghem, A. P. Kappetein, M. B. Leon, and J. J. Bax. 2016. 'Diagnosis and management of aortic valve stenosis in patients with heart failure', *Eur J Heart Fail*, 18: 469-81.

Katsi, V., N. Magkas, A. Antonopoulos, G. Trantalis, K. Toutouzas, and D. Tousoulis. 2021. 'Aortic valve: anatomy and structure and the role of vasculature in the degenerative process', *Acta Cardiol*, 76: 335-48.

Khan, Safi U., Ahmad N. Lone, Muhammad A. Saleem, and Edo Kaluski. 2017. 'Transcatheter vs surgical aortic-valve replacement in low- to intermediate-surgical-risk candidates: A meta-analysis and systematic review', *Clinical cardiology*, 40: 974-81.

Lancellotti, P., and A. Nchimi. 2017. 'Coronary microvascular reserve and outcome in aortic stenosis: Pathophysiological significance vs. clinical relevance', *Eur Heart J*, 38: 1230-32.

Langendorff, O. 1895. 'Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen', *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 61: 291-332.

Larsson, S. C., A. Wolk, and M. Bäck. 2017. 'Alcohol consumption, cigarette smoking and incidence of aortic valve stenosis', *J Intern Med*, 282: 332-39.

Le Quang, K., R. Bouchareb, D. Lachance, M. A. Laplante, D. El Husseini, M. C. Boulanger, D. Fournier, X. P. Fang, R. K. Avramoglu, P. Pibarot, Y. Deshaies, G. Sweeney, P. Mathieu, and A. Marette. 2014. 'Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 2283-91.

Leon, Martin B., Craig R. Smith, Michael Mack, D. Craig Miller, Jeffrey W. Moses, Lars G. Svensson, E. Murat Tuzcu, John G. Webb, Gregory P. Fontana, Raj R. Makkar, David L. Brown, Peter C. Block, Robert A. Guyton, Augusto D. Pichard, Joseph E. Bavaria, Howard C. Herrmann, Pamela S. Douglas, John L. Petersen, Jodi J. Akin, William N. Anderson, Duolao Wang, Stuart Pocock, and Partner Trial Investigators. 2010. 'Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery', *The New England journal of medicine*, 363: 1597-607.

Lindman, B. R., and J. N. Patel. 2016. 'Multimorbidity in Older Adults with Aortic Stenosis', *Clin Geriatr Med*, 32: 305-14.

Makkar, R. R., G. P. Fontana, H. Jilaihawi, S. Kapadia, A. D. Pichard, P. S. Douglas, V. H. Thourani, V. C. Babaliaros, J. G. Webb, H. C. Herrmann, J. E. Bavaria, S. Kodali, D. L. Brown, B. Bowers, T. M. Dewey, L. G. Svensson, M. Tuzcu, J. W. Moses, M. R. Williams, R. J. Siegel, J. J. Akin, W. N. Anderson, S. Pocock, C. R. Smith, and M. B. Leon. 2012. 'Transcatheter aortic-valve replacement for inoperable severe aortic stenosis', *The New England journal of medicine*, 366: 1696-704.

Mathieu, P., and B. J. Arsenault. 2017. 'CAVD: civilization aortic valve disease', *Eur Heart J*, 38: 2198-200.

McConkey, H. Z. R., M. Marber, A. Chiribiri, P. Pibarot, S. R. Redwood, and B. D. Prendergast. 2019. 'Coronary Microcirculation in Aortic Stenosis', *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 12: e007547.

Mercier, N., T. O. Kiviniemi, A. Saraste, M. Miiluniemi, J. Silvola, S. Jalkanen, and G. G. Yegutkin. 2012. 'Impaired ATP-induced coronary blood flow and diminished aortic NTPDase activity precede lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice', *Am J Pathol*, 180: 419-28.

Merrill, D. C., M. W. Thompson, C. L. Carney, B. P. Granwehr, G. Schlager, J. E. Robillard, and C. D. Sigmund. 1996. 'Chronic hypertension and altered baroreflex responses in transgenic mice containing the human renin and human angiotensinogen genes', *J Clin Invest*, 97: 1047-55.

Michail, M., J. E. Davies, J. D. Cameron, K. H. Parker, and A. J. Brown. 2018. 'Pathophysiological coronary and microcirculatory flow alterations in aortic stenosis', *Nature Reviews: Cardiology*, 15: 420-31.

Miller, J. D., R. M. Weiss, and D. D. Heistad. 2011. 'Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms', *Circ Res*, 108: 1392-412.

Miller, J. D., R. M. Weiss, K. M. Serrano, L. E. Castaneda, R. M. Brooks, K. Zimmerman, and D. D. Heistad. 2010. 'Evidence for active regulation of pro-osteogenic signaling in advanced aortic valve disease', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30: 2482-6.

Mizutani, H., N. Fujimoto, H. Ito, T. Sato, K. Moriwaki, A. Takasaki, Y. Ogihara, S. Kasuya, T. Mori, M. Tanimura, I. Goto, K. Ichikawa, J. Masuda, T. Sawai, T. Kurita, T. Tanigawa, and K. Dohi.

2022. 'Prognostic Impact of Peak Aortic Jet Velocity on Patients With Acute Myocardial Infarction', *Circ J*, 86: 1539-46.

Mohler, E. R., 3rd, M. K. Chawla, A. W. Chang, N. Vyavahare, R. J. Levy, L. Graham, and F. H. Gannon. 1999. 'Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves', *J Heart Valve Dis*, 8: 254-60.

Mohler, E. R., 3rd, F. Gannon, C. Reynolds, R. Zimmerman, M. G. Keane, and F. S. Kaplan. 2001. 'Bone formation and inflammation in cardiac valves', *Circulation*, 103: 1522-8.

Mulvagh, S. L., and A. T. Mokhtar. 2019. 'Coronary Flow Velocity Reserve in Stress Echocardiography: Time to Go With the Global Flow?', *J Am Coll Cardiol*, 74: 2292-94.

Nagao, K., T. Taniguchi, T. Morimoto, H. Shiomi, K. Ando, N. Kanamori, K. Murata, T. Kitai, Y. Kawase, C. Izumi, M. Miyake, H. Mitsuoka, M. Kato, Y. Hirano, S. Matsuda, T. Inada, T. Murakami, Y. Takeuchi, K. Yamane, M. Toyofuku, M. Ishii, E. Minamino-Muta, T. Kato, M. Inoko, T. Ikeda, A. Komasa, K. Ishii, K. Hotta, N. Higashitani, Y. Kato, Y. Inuzuka, C. Maeda, T. Jinnai, Y. Morikami, N. Saito, K. Minatoya, and T. Kimura. 2018. 'Acute Heart Failure in Patients With Severe Aortic Stenosis - Insights From the CURRENT AS Registry', *Circ J*, 82: 874-85.

Natarajan, D., and B. Prendergast. 2017. 'Aortic stenosis - pathogenesis, prediction of progression, and percutaneous intervention', *J R Coll Physicians Edinb*, 47: 172-75.

Niepmann, Sven Thomas, Eva Steffen, Andreas Zietzer, Matti Adam, Julia Nordsiek, Isabella Gyamfi-Poku, Kerstin Piayda, Jan-Malte Sinning, Stephan Baldus, Malte Kelm, Georg Nickenig, Sebastian Zimmer, and Christine Quast. 2019. 'Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype', *Clinical Research in Cardiology*, 108: 847-56.

Nishimura, R. A., C. M. Otto, R. O. Bonow, B. A. Carabello, J. P. Erwin, 3rd, R. A. Guyton, P. T. O'Gara, C. E. Ruiz, N. J. Skubas, P. Sorajja, T. M. Sundt, 3rd, and J. D. Thomas. 2014. '2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines', *Circulation*, 129: e521-643.

Nissilä, E., P. Hakala, K. Leskinen, A. Roig, S. Syed, K. P. M. Van Kessel, J. Metso, C. J. C. De Haas, P. Saavalainen, S. Meri, A. Chroni, J. A. G. Van Strijp, K. Öörni, M. Jauhiainen, T. S. Jokiranta, and K. Haapasalo. 2018. 'Complement Factor H and Apolipoprotein E Participate in Regulation of Inflammation in THP-1 Macrophages', *Front Immunol*, 9: 2701.

O'Connor, K., P. Lancellotti, E. Donal, and L. A. Piérard. 2010. 'Exercise echocardiography in severe asymptomatic aortic stenosis', *Arch Cardiovasc Dis*, 103: 262-9.

Osnabrugge, Ruben L. J., Darren Mylotte, Stuart J. Head, Nicolas M. Van Mieghem, Vuyisile T. Nkomo, Corinne M. LeReun, Ad J. J. C. Bogers, Nicolo Piazza, and A. Pieter Kappetein. 2013. 'Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study', *Journal of the American College of Cardiology*, 62: 1002-12.

Ott, C., T. Jung, S. Brix, C. John, I. R. Betz, A. Foryst-Ludwig, S. Deubel, W. M. Kuebler, T. Grune, U. Kintscher, and J. Grune. 2021. 'Hypertrophy-Reduced Autophagy Causes Cardiac Dysfunction by Directly Impacting Cardiomyocyte Contractility', *Cells*, 10.

Otto, C. M. 1998. 'Aortic stenosis. Clinical evaluation and optimal timing of surgery', *Cardiol Clin*, 16: 353-73, vii.

Otto, C. M., I. G. Burwash, M. E. Legget, B. I. Munt, M. Fujioka, N. L. Healy, C. D. Kraft, C. Y. Miyake-Hull, and R. G. Schwaegler. 1997. 'Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome', *Circulation*, 95: 2262-70.

Paolisso, P., E. Gallinoro, M. Vanderheyden, G. Esposito, D. T. Bertolone, M. Belmonte, N. Mileva, K. Bermpeis, C. De Colle, D. Fabbricatore, A. Candreva, D. Munhoz, I. Degrieck, F. Casselman, M. Penicka, C. Collet, J. Sonck, F. Mangiacapra, B. de Bruyne, and E. Barbato.

2022. 'Absolute coronary flow and microvascular resistance reserve in patients with severe aortic stenosis', *Heart*, 109: 47-54.

Paradis, J. M., J. Fried, T. Nazif, A. Kirtane, K. Harjai, O. Khalique, K. Grubb, I. George, R. Hahn, M. Williams, M. B. Leon, and S. Kodali. 2014. 'Aortic stenosis and coronary artery disease: what do we know? What don't we know? A comprehensive review of the literature with proposed treatment algorithms', *Eur Heart J*, 35: 2069-82.

Piazza, N., P. de Jaegere, C. Schultz, A. E. Becker, P. W. Serruys, and R. H. Anderson. 2008. 'Anatomy of the aortic valvar complex and its implications for transcatheter implantation of the aortic valve', *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 1: 74-81.

Picano, E., T. Bombardini, T. Kovačević Preradović, L. Cortigiani, K. Wierzbowska-Drabik, and Q. Ciampi. 2019. 'Left ventricular contractile reserve in stress echocardiography: the bright side of the force', *Kardiol Pol*, 77: 164-72.

Picano, E., D. Morrone, M. C. Scali, A. Huqi, K. Coviello, and Q. Ciampi. 2019. 'Integrated quadruple stress echocardiography', *Minerva Cardioangiologica*, 67: 330-39.

Pirillo, A., F. Bonacina, G. D. Norata, and A. L. Catapano. 2018. 'The Interplay of Lipids, Lipoproteins, and Immunity in Atherosclerosis', *Curr Atheroscler Rep*, 20: 12.

Plump, A. S., J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin, and J. L. Breslow. 1992. 'Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells', *Cell*, 71: 343-53.

Quast, C., C. Alter, Z. Ding, N. Borg, and J. Schrader. 2017. 'Adenosine Formed by CD73 on T Cells Inhibits Cardiac Inflammation and Fibrosis and Preserves Contractile Function in Transverse Aortic Constriction-Induced Heart Failure', *Circ Heart Fail*, 10.

Quast, C., F. Kober, K. Becker, E. Zweck, J. Hoffe, C. Jacoby, V. Flocke, I. Gyamfi-Poku, F. Keyser, K. Piayda, R. Erkens, S. Niepmann, M. Adam, S. Baldus, S. Zimmer, G. Nickenig, M. Grandoch, F. Bönner, M. Kelm, and U. Flögel. 2022. 'Multiparametric MRI identifies subtle adaptations for demarcation of disease transition in murine aortic valve stenosis', *Basic Res Cardiol*, 117: 29.

Rabkin-Aikawa, E., M. Farber, M. Aikawa, and F. J. Schoen. 2004. 'Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves', *J Heart Valve Dis*, 13: 841-7.

Rader, F., E. Sachdev, R. Arsanjani, and R. J. Siegel. 2015. 'Left ventricular hypertrophy in valvular aortic stenosis: mechanisms and clinical implications', *Am J Med*, 128: 344-52.

Reinöhl, J., C. von Zur Mühlen, M. Moser, S. Sorg, C. Bode, and M. Zehender. 2013. 'TAVI 2012: state of the art', *J Thromb Thrombolysis*, 35: 419-35.

Rodriguez, E., H. R. Weiss, M. Gonzalez, and J. Tse. 1993. 'Effect of isoproterenol on coronary blood flow and signal transduction responses in thyroxine-treated rabbit hearts', *J Mol Cell Cardiol*, 25: 939-47.

Rolandi, M. C., E. M. Wiegerinck, L. Casadonte, Z. Y. Yong, K. T. Koch, M. Vis, J. J. Piek, J. Baan, Jr., J. A. Spaan, and M. Siebes. 2016. 'Transcatheter Replacement of Stenotic Aortic Valve Normalizes Cardiac-Coronary Interaction by Restoration of Systolic Coronary Flow Dynamics as Assessed by Wave Intensity Analysis', *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 9: e002356.

Rosenhek, R., T. Binder, G. Porenta, I. Lang, G. Christ, M. Schemper, G. Maurer, and H. Baumgartner. 2000. 'Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis', *The New England journal of medicine*, 343: 611-7.

Saklayen, M. G. 2018. 'The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome', *Curr Hypertens Rep*, 20: 12.

Sathyamurthy, I., and K. Jayanthi. 2014. 'Low flow low gradient aortic stenosis: clinical pathways', *Indian Heart J*, 66: 672-7.

Seo, J. H., K. J. Chun, B. K. Lee, B. R. Cho, and D. R. Ryu. 2018. 'Statins Have No Role in Preventing the Progression of Aortic Valve Sclerosis', *J Cardiovasc Imaging*, 26: 229-37.

Sider, K. L., M. C. Blaser, and C. A. Simmons. 2011. 'Animal models of calcific aortic valve disease', *Int J Inflam*, 2011: 364310.

Singh, G. K., P. van der Bijl, L. Goedemans, E. M. Vollema, R. Abou, N. Ajmone Marsan, J. J. Bax, and V. Delgado. 2021. 'Prevalence of Aortic Valve Stenosis in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction and Effect on Long-Term Outcome', *Am J Cardiol*, 153: 30-35.

Singh, S., and M. Torzewski. 2019. 'Fibroblasts and Their Pathological Functions in the Fibrosis of Aortic Valve Sclerosis and Atherosclerosis', *Biomolecules*, 9.

Smith, C. R., M. B. Leon, M. J. Mack, D. C. Miller, J. W. Moses, L. G. Svensson, E. M. Tuzcu, J. G. Webb, G. P. Fontana, R. R. Makkar, M. Williams, T. Dewey, S. Kapadia, V. Babaliaros, V. H. Thourani, P. Corso, A. D. Pichard, J. E. Bavaria, H. C. Herrmann, J. J. Akin, W. N. Anderson, D. Wang, and S. J. Pocock. 2011. 'Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients', *The New England journal of medicine*, 364: 2187-98.

Smith, J. G., K. Luk, C. A. Schulz, J. C. Engert, R. Do, G. Hindy, G. Rukh, L. Dufresne, P. Almgren, D. S. Owens, T. B. Harris, G. M. Peloso, K. F. Kerr, Q. Wong, A. V. Smith, M. J. Budoff, J. I. Rotter, L. A. Cupples, S. Rich, S. Kathiresan, M. Orho-Melander, V. Gudnason, C. J. O'Donnell, W. S. Post, and G. Thanassoulis. 2014. 'Association of low-density lipoprotein cholesterol-related genetic variants with aortic valve calcium and incident aortic stenosis', *JAMA*, 312: 1764-71.

Snoer, M., R. H. Olsen, T. Monk-Hansen, L. R. Pedersen, S. B. Haugaard, F. Dela, and E. Prescott. 2014. 'Coronary flow reserve predicts cardiopulmonary fitness in patients with coronary artery disease independently of systolic and diastolic function', *Echocardiography*, 31: 654-62.

Stewart, R. A., A. J. Kerr, G. A. Whalley, M. E. Legget, I. Zeng, M. J. Williams, J. Lainchbury, A. Hamer, R. Doughty, M. A. Richards, and H. D. White. 2010. 'Left ventricular systolic and diastolic function assessed by tissue Doppler imaging and outcome in asymptomatic aortic stenosis', *Eur Heart J*, 31: 2216-22.

Tanaka, K., M. Sata, D. Fukuda, Y. Suematsu, N. Motomura, S. Takamoto, Y. Hirata, and R. Nagai. 2005. 'Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice', *J Am Coll Cardiol*, 46: 134-41.

ten Freyhaus, H., and S. Baldus. 2016. 'Paradoxe Low-flow-low-gradient-Aortenstenose', *Der Internist*, 57: 317-22.

Thaden, J. J., V. T. Nkomo, and M. Enriquez-Sarano. 2014. 'The global burden of aortic stenosis', *Prog Cardiovasc Dis*, 56: 565-71.

Thanassoulis, George, Catherine Y. Campbell, David S. Owens, J. Gustav Smith, Albert V. Smith, Gina M. Peloso, Kathleen F. Kerr, Sonali Pechlivanis, Matthew J. Budoff, Tamara B. Harris, Rajeev Malhotra, Kevin D. O'Brien, Pia R. Kamstrup, Børge G. Nordestgaard, Anne Tybjaerg-Hansen, Matthew A. Allison, Thor Aspelund, Michael H. Criqui, Susan R. Heckbert, Shih-Jen Hwang, Yongmei Liu, Marketa Sjogren, Jesper van der Pals, Hagen Kälsch, Thomas W. Mühleisen, Markus M. Nöthen, L. Adrienne Cupples, Muriel Caslake, Emanuele Di Angelantonio, John Danesh, Jerome I. Rotter, Sigurdur Sigurdsson, Quenna Wong, Raimund Erbel, Sekar Kathiresan, Olle Melander, Vilmundur Gudnason, Christopher J. O'Donnell, Wendy S. Post, and Charge Extracoronary Calcium Working Group. 2013. 'Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis', *The New England journal of medicine*, 368: 503-12.

'Valvular Endothelial Cells Regulate the Phenotype of Interstitial Cells in Co-culture: Effects of Steady Shear Stress'. 2006. *Tissue Engineering*, 12: 905-15.

Villar, A. V., M. Cobo, M. Llano, C. Montalvo, F. González-Vílchez, R. Martín-Durán, M. A. Hurlé, and J. F. Nistal. 2009. 'Plasma levels of transforming growth factor-beta1 reflect left ventricular remodeling in aortic stenosis', *PloS One*, 4: e8476.

Wang, X., J. Wu, D. Zhu, J. You, Y. Zou, J. Qian, and J. Ge. 2015. 'Characterization of coronary flow reserve and left ventricular remodeling in a mouse model of chronic aortic regurgitation with carvedilol intervention', *Journal of Ultrasound in Medicine*, 34: 483-93.

Weiss, R. M., M. Ohashi, J. D. Miller, S. G. Young, and D. D. Heistad. 2006. 'Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice', *Circulation*, 114: 2065-9.

Widder, J. D., and J. Bauersachs. 2014. '[Therapy of aortic valve stenosis]', *Internist (Berl)*, 55: 1391-2, 94-6, 98-9.

Wiegerinck, E. M., T. P. van de Hoef, M. C. Rolandi, Z. Yong, F. van Kesteren, K. T. Koch, M. M. Vis, B. A. de Mol, J. J. Piek, and J. Baan, Jr. 2015. 'Impact of Aortic Valve Stenosis on Coronary Hemodynamics and the Instantaneous Effect of Transcatheter Aortic Valve Implantation', *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 8: e002443.

Wu, J., Y. Q. Zhou, Y. Zou, and M. Henkelman. 2013. 'Evaluation of bi-ventricular coronary flow patterns using high-frequency ultrasound in mice with transverse aortic constriction', *Ultrasound in Medicine and Biology*, 39: 2053-65.

Yeang, C., M. J. Wilkinson, and S. Tsimikas. 2016. 'Lipoprotein(a) and oxidized phospholipids in calcific aortic valve stenosis', *Curr Opin Cardiol*, 31: 440-50.

Zhang, S. H., R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, and N. Maeda. 1992. 'Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E', *Science*, 258: 468-71.

Zhao, Y., R. Nicoll, Y. H. He, and M. Y. Henein. 2016. 'The effect of statins therapy in aortic stenosis: Meta-analysis comparison data of RCTs and observationals', *Data Brief*, 7: 357-61.

Zheng, K. H., S. Tsimikas, T. Pawade, J. Kroon, W. S. A. Jenkins, M. K. Doris, A. C. White, Nklm Timmers, J. Hjortnaes, M. A. Rogers, E. Aikawa, B. J. Arsenault, J. L. Witztum, D. E. Newby, M. L. Koschinsky, Z. A. Fayad, E. S. G. Stroes, S. M. Boekholdt, and M. R. Dweck. 2019. 'Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis', *J Am Coll Cardiol*, 73: 2150-62.

Zhou, W., Y. P. Sun, S. Divakaran, N. S. Bajaj, A. Gupta, A. Chandra, V. Morgan, L. Barrett, L. Martell, C. F. Bibbo, J. Hainer, E. F. Lewis, V. R. Taqueti, S. Dorbala, R. Blankstein, P. Slomka, P. B. Shah, T. Kaneko, D. S. Adler, P. O'Gara, and M. F. Di Carli. 2022. 'Association of Myocardial Blood Flow Reserve With Adverse Left Ventricular Remodeling in Patients With Aortic Stenosis: The Microvascular Disease in Aortic Stenosis (MIDAS) Study', *JAMA Cardiol*, 7: 93-99.

Zhu, Y., X. Xian, Z. Wang, Y. Bi, Q. Chen, X. Han, D. Tang, and R. Chen. 2018. 'Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation', *Biomolecules*, 8.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich spezielle Dankesworte zum Einen an meine Betreuer Herrn PD Dr. Zeus sowie Herrn Prof. Dr. Albert für die Unterstützung des Promotionsvorhabens richten. Zum Anderen geht ein großes Dankeschön an Dr. Christine Quast, die neben der primären fachlichen Begleitung auch maßgeblich an der Themengebung der Arbeit beteiligt war.
Für die gute Einarbeitung im Labor geht ein Dank an Stefanie Becher sowie Susanne Pfeiler. Für die Operationen zur Stenoseinduktion an den Mäusen und somit die grundlegende Methode zur Ermöglichung der Versuche in dieser Arbeit möchte ich mich bei Dr. med. vet. Katrin Becker bedanken. Ein Dank für die Bereitstellung der Bilder zur Echokardiographie im murinen Modell geht an Dr. Isabella Gyamfi-Poku sowie Dr. Kerstin Piayda.

Zum Schluss möchte ich mich außerdem bei meiner Familie und meinen Freunden und hier im Speziellen bei Lea bedanken. Ohne eure andauernde Unterstützung sowie Ermutigung wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit zu schreiben.