

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Die Bedeutung von lokalen und systemischen
inflammatorischen Mediatoren in der Entstehung der
kalzifizierenden Aortenklappenstenose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jessica Knoppik**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Müller
2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Nordmeyer, Ph.D.

Tag der Disputation: 16.09.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	9
Abkürzungsverzeichnis.....	10
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Aortenklappenstenose	1
1.1.1 Diagnostik.....	2
1.1.2 Therapie	3
1.1.3 Prognose	4
1.1.4 Anatomie der Aortenklappe	5
1.1.5 Ätiologie und Pathogenese der CAVD	9
1.2 Cyclophilin A (CypA)	12
1.3 MMPs und Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)	15
1.4 Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)	18
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Patientenkohorte und Studienaufbau	21
2.1.1 Ethikvotum und Datenerhebung	21
2.1.2 Studiendesign.....	21
2.2 Material.....	24
2.2.1 Geräte	24
2.2.2 Verbrauchsmaterial	26

2.2.3	Chemikalien.....	28
2.2.4	Lösungen/ Puffer	30
2.2.5	Antikörper	31
2.2.6	Software-Programme	31
2.3	Methoden.....	32
2.3.1	Vorbereitung/ Paraffineinbettung der Klappen	32
2.3.2	Anfertigung von Paraffinschnitten	32
2.3.3	Färbungen.....	33
2.3.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
2.3.3.2	Immunhistochemische Färbungen.....	34
2.3.3.3	Etablierungen der Antikörper und des Staining-Kits.....	38
2.3.4	Mikroskopie	39
2.3.5	Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	39
2.4	Statistische Auswertung.....	42
3.	Ergebnisse.....	43
3.1	Charakteristiken der Patientenpopulation	43
3.2	Höherer Plasmaspiegel von LDL- und Gesamtcholesterin bei Patienten mit FP-AS.....	46
3.3	Immunhistochemie Ergebnisse	48
3.4	Signifikante Erhöhung der Expression von CypA bei der SP-AS im Vergleich zur FP-AS.....	51
3.5	Keine signifikante Erhöhung der Expression von RAGE im Vergleich der beiden Subgruppen.....	52
3.6	Keine signifikante Erhöhung der Expression von CD174 im Vergleich der beiden Subgruppen.....	53

3.7	Co-Lokalisation von CypA, RAGE und EMMPRIN	54
3.8	Kein signifikanter Unterschied der Zellzahl bei FP-AS und SP-AS.....	56
3.9	Zusammenhang von Blutfetten und CypA-Expression	59
3.10	Kein Nachweis weiterer Zusammenhänge zwischen Antikörper- Expression und klinischen Parametern oder der Zellzahl	60
4.	Diskussion	61
4.1	Erhöhte CypA-Expression bei SP-AS im Vergleich zur FP-AS.....	61
4.2	(Co-) lokalisation von CypA, EMMPRIN und RAGE	63
4.3	Höhere Blutserumspiegel von LDL und Gesamtcholesterin bei FP-AS	64
4.4	Negative Korrelation von CypA auf der Aortenklappe und LDL sowie Gesamtcholesterin im Blutplasma	65
4.5	Limitationen dieser Studie.....	67
5.	Zusammenfassung und Ausblick	68
6.	Literaturverzeichnis	69
7.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	87
8.	Danksagung.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Lage der Aortenklappe.....	5
Abbildung 2: Histologischer Aufbau der Aortenklappe.	6
Abbildung 3: Zellen des Herzklappeninterstitiums (VIC).	8
Abbildung 4: CypA-Wirkung auf Zellen.	14
Abbildung 5: Flowchart zum Studiendesign.	23
Abbildung 6: Erstellung von Paraffinschnitten.	33
Abbildung 7: Beispiel einer HE-Färbung.	34
Abbildung 8: Beispiel für die immunhistochemischen Färbungen.....	36
Abbildung 9: HSS-HRP System der Immunhistochemie.	37
Abbildung 10: ImageJ Colour Deconvolution.	40
Abbildung 11: Beispiel semiquantitative Bestimmung der IHC- positiven Fläche.	40
Abbildung 12: Beispiel der teilautomatisierten Bestimmungen der Zellzahl.....	41
Abbildung 13: Beispiel der teilautomatisierten Bestimmungen der Zellzahl.....	41
Abbildung 14: Vergleich des Gesamtcholesterins im Blut in mg/dL bei FP-AS und SP-AS.....	46
Abbildung 15: Vergleich von LDL im Blut in mg/dL bei FP-AS und SP-AS.	47

Abbildung 16: Beispiel einer immunhistologischen Färbung mit CypA.	49
Abbildung 17: Beispiel einer immunhistologischen Färbung mit CD147.....	49
Abbildung 18: Beispiel einer immunhistologischen Färbung mit RAGE.....	50
Abbildung 19: Vergleich der CypA-positiven Fläche in mm ² pro Gesamtklappenschnittfläche in mm ² bei FP-AS und SP-AS.....	51
Abbildung 20: Vergleich der RAGE-positiven Fläche in mm ² pro Gesamtklappenschnittfläche in mm ² bei FP-AS und SP-AS.....	52
Abbildung 21: Vergleich der CD147-positiven Fläche in mm ² pro Gesamtklappenschnittfläche in mm ² bei FP-AS und SP-AS.....	53
Abbildung 22: Beispiel Immunhistochemische Färbung von CypA.....	54
Abbildung 23: Beispiel Immunhistochemische Färbung von RAGE.	55
Abbildung 24: Beispiel Immunhistochemische Färbung von CD147.	55
Abbildung 25: Vergleich der Anzahl der Zellkerne pro mm ² Gesamtklappenschnittfläche bei FP-AS und SP-AS.....	56
Abbildung 26: Vergleich der gesamten Anzahl der Zellkerne auf der Gesamtklappenschnittfläche bei FP-AS und SP-AS.....	56
Abbildung 27: Vergleich der gesamten Schnittfläche der Aortenklappen in mm ² bei FP-AS und SP-AS.....	57
Abbildung 28: Korrelation von dem Gesamtcholesterin im Blut mit der CypA-Expression auf der Aortenklappe in den immunhistochemischen Färbungen.....	59

Abbildung 29: Korrelation von LDL im Blut mit der CypA-Expression
auf der Aortenklappe in den immunhistochemischen
Färbungen.....59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper-Verdünnungen für die IHC	36
Tabelle 2: Charakteristiken der Patientenpopulation	43
Tabelle 3: Statistik-Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen.	48

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGE	Advanced Glycation End products
AKE	Aortenklappenersatz
AS	Aortenklappenstenose
ASS	Acetylsalicylsäure
AVA	Aortic valve area
AV-Klappe	Atrioventrikuläre Klappe
BMI	Body Mass Index
BPM	Beats per minute
CAVD	Calcific Aortic Valve Disease
CKD	Chronic kidney disease
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CypA	Cyclophilin A
DAB	3,3' Diaminobenzidin
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer
EndMT	Endothel-zu-Mesenchym-Transformation
EuroSCORE	European System for Cardiac Operative Risk Evaluation
EZM	Extrazelluläre Matrix
FP-AS	Fast progressive aortic valve stenosis
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	Heat induced epitope retrieval
HSS	High sensitivity streptavidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase, engl. Horseradish Peroxidase

KHK	Koronare Herzkrankheit
KÖF	Klappenöffnungsfläche
LV	Linksventrikulär
MDRD	Modification of diet in renal disease
NYHA	New York Heart Association-Klassifikation
OT	Objektträger
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End products
SAVR	Surgical aortic valve replacement
SMC	Smooth muscular cells
SP-AS	Slow progressive aortic valve stenosis
STS	Society of thoracic surgeons
TAVI	Transkatheter-Aortenklappenimplantation
TEE	Transösophageale Echokardiografie
TTE	Transthorakale Echokardiografie
VEC	Valvuläre endotheliale Zellen
VECM	Valvuläre extrazelluläre Matrix
VSMC	Vascular smooth muscle cells
VHF	Vorhofflimmern
VIC	Valvuläre interstitielle Zellen

1. Einleitung

1.1 Die Aortenklappenstenose

Die Aortenklappenstenose (AS) ist eine fortschreitende Herzklappenerkrankung mit linksventrikulärer Ausflussostruktion durch eine Engstelle der Aortenklappe. Die Pathomechanismen sind noch nicht vollständig verstanden, jedoch ändert sich die Vorstellung eines passiven degenerativen Prozesses immer mehr in Richtung eines aktiven Geschehens (Shah et al., 2023). Die AS ist die häufigste Herzklappenerkrankung in den USA und Europa (Iung et al., 2003, Nkomo et al., 2006) und hat eine Prävalenz von ca. 2,8 % bei Erwachsenen über 75 Jahren (Osnabrugge et al., 2013). Eingeteilt wird die AS in kongenitale und erworbene Formen. Die kongenitale Aortenklappenstenose ist bei jungen Patienten vorherrschend und wird unterteilt in die unikuspide und die bikuspidale AS (van der Linde et al., 2013). Weltweit ist die bikuspidale Aortenklappenerkrankung die häufigste kongenitale Herzerkrankung (Bernard et al., 2022). Zu den erworbenen Formen gehört die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (CAVD, engl. Calcific aortic valve disease). Sie ist die häufigste Form der AS bei älteren Patienten (Bhatia et al., 2016) und ihre Prävalenz nimmt aufgrund der zunehmenden Alterung der Bevölkerung zu (Yi et al., 2021). Die CAVD beruht vor allem auf entzündlichen und kalzifizierenden Prozessen, welche teilweise der Atherosklerose ähneln (Mohler, 2004). Weitere Formen der erworbenen AS beruhen auf einer Endokarditis, rheumatischem Fieber, aber auch systemischem Lupus erythematoses (Kiani et al., 2006), Bestrahlung (Lee and Hahn, 2023) oder Stoffwechselerkrankungen wie Morbus Fabry (Senechal and Germain, 2003). Zwischen Industrie- und Entwicklungsländern gibt es große Unterschiede bezüglich der Prävalenz der unterschiedlichen Formen der AS (Coffey et al., 2016). Während das Vorkommen der CAVD in den Industrieländern am Höchsten ist, ist das Vorkommen der durch Rheuma oder Endokarditis verursachten AS vor allem in den Entwicklungsländern am Höchsten (Coffey et al., 2016).

Alle Formen der AS resultieren in einer Überbelastung des linken Ventrikels mit Linksherzhypertrophie, ohne Therapie im langfristigen Verlauf in einer Dilatation des linken Ventrikels und schließlich in einer Herzinsuffizienz.

Bei der asymptomatischen AS ist die Mortalität nicht erhöht, die symptomatische AS dagegen hat trotz operativen und interventionellen Behandlungsmöglichkeiten weiterhin eine hohe Mortalität und Morbidität (Goody et al., 2020). Bisher gibt es keine medikamentöse Therapie, welche ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert.

1.1.1 Diagnostik

Klinisch fällt die AS durch Kurzatmigkeit, Engegefühl in der Brust, Schwindel, Synkopen und Leistungsminderung auf. Meistens geschieht dies zunächst bei körperlicher Anstrengung, bei einem Fortschreiten der Erkrankung auch im Ruhezustand. Auskultatorisch ist die AS gekennzeichnet durch ein charakteristisches spindelförmiges Systolikum mit Punktum maximum rechts parasternal im 2. Intercostalraum und wird fortgeleitet in die Carotiden. Palpatorisch kann ein sogenannter Pulsus parvus et tardus auftreten, also ein schwacher Puls mit einer geringen Blutdruckamplitude, aufgrund eines verzögerten und geringeren linksventrikulären Schlagvolumens. Im Elektrokardiogramm (EKG) können Zeichen einer Linksherzhypertrophie vorliegen, die jedoch nicht spezifisch für eine AS sind. Im Röntgenthorax können eine Verkalkung der Aortenklappen, Zeichen einer Linksherzhypertrophie oder eine poststenotische Dilatation der Aorta ascendens auffallen. Die transthorakale Echokardiografie (TTE) ist Methode der Wahl, um eine AS und deren Schweregrad zu diagnostizieren. Es können unter anderem der Grad der Klappenverkalkung sowie Wanddicke, Größe und Funktion des linken Ventrikels beurteilt werden. Mittels Doppler-Echokardiografie können flussabhängige Parameter bestimmt werden, wie z.B. der mittlere transvalvuläre Druckgradient (ΔP_{mean} in mmHg) oder die maximale transvalvuläre Flussrate (v_{max} in m/s).

In der transösophagealen Echokardiografie (TEE) kann insbesondere vor einer geplanten Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI) die Anulusgröße bestimmt, aber auch die Anatomie der Aortenwurzel inklusive des Ausflusstraktes beurteilt werden. Die Klappenöffnungsfläche (KÖF) kann aus den Parametern der TTE errechnet oder transösophageal ausgemessen werden. Bei unklarem Schweregrad kann eine Stress-Bildgebung oder koronare Computertomographie (CT) durchgeführt werden.

In den aktuellen internationalen Empfehlungen (2021) wird die AS anhand echokardiografischer Kriterien in vier große Kategorien eingeteilt:

1. „AS mit hohem Gradienten (mittlerer Gradient ≥ 40 mmHg, Spitzengeschwindigkeit $\geq 4,0$ m/s, KÖF ≤ 1 cm² [oder $\leq 0,6$ cm²/m²])
2. AS mit geringem Fluss und niedrigem Gradienten und reduzierter Ejektionsfraktion (mittlerer Gradient < 40 mmHg, KÖF ≤ 1 cm², LVEF $< 50\%$, SVi ≤ 35 ml/m²)
3. AS mit geringem Fluss und niedrigem Gradienten bei erhaltener Ejektionsfraktion (mittlerer Gradient < 40 mmHg, KÖF ≤ 1 cm², LVEF $\geq 50\%$, SVi ≤ 35 ml/m²)
4. AS mit normalem Fluss und niedrigem Gradienten bei erhaltener Ejektionsfraktion (mittlerer Gradient < 40 mmHg, KÖF ≤ 1 cm², LVEF $\geq 50\%$, SVi > 35 ml/m²)“

(Nettersheim and Baldus)

1.1.2 Therapie

Generell wird eine gesunde Lebensführung mit Verringerung der Risikofaktoren, wie zum Beispiel Rauchen, empfohlen. Eine bestehende arterielle Hypertonie sollte nach Empfehlung der European Society of Cardiology medikamentös kontrolliert behandelt werden. Bisher gibt es keine medikamentöse Therapie der AS, welche ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert. Die Indikation einer invasiven Therapie erfolgt nach den aktuellen ESC/EACTS-Leitlinien (Nettersheim and Baldus). Es gibt operative und interventionelle Therapieoptionen. Bei der

erworbenen AS wird die Klappe vor allem operativ mittels chirurgischem Aortenklappenersatz (SAVR, engl. surgical aortic valve replacement) oder interventionell mittels Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI) ersetzt. Bei der SAVR wird eine mechanische oder eine biologische Herzklappe, bei der TAVI eine biologische Herzklappe verwendet. Führend bei der angeborenen AS sind die Ballondilatation und bei jungen Patienten die Ross-Operation, also ein Ersatz der Aortenklappe durch die körpereigene Pulmonalklappe, die wiederum durch eine fremde menschliche Klappe ersetzt wird.

1.1.3 Prognose

Die unbehandelte symptomatische Aortenklappenstenose hat eine schlechte Prognose. Das mittlere Überleben nach zwei Jahren beträgt ca. 50% und nach fünf Jahren ca. 20% (Ross and Braunwald, 1968). Alter, Geschlecht und Begleiterkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus, beeinflussen die Mortalität erheblich (Thogata et al., 2023). Unterschiedliche Studien zeigen variierende Überlebensraten, abhängig vom Risikoprofil der Patienten. In der Studie von Beyersdorf et al. (2021) lag die Überlebensrate nach 5 Jahren nach SAVR bei ca. 70% und nach TAVI bei ca. 58%, wobei die TAVI Patienten im Schnitt deutlich älter waren und ein höheres Risikoprofil hatten. In einer anderen Studie (Søndergaard et al., 2016) zeigte sich kein signifikanter Unterschied des 2-Jahres-Überlebens zwischen SAVR- und TAVI-Patienten.

1.1.4 Anatomie der Aortenklappe

Das Herz hat vier Klappen, zwei Segelklappen bzw. Atrioventrikularklappen (AV-Klappen) zwischen Vorhof und Kammer und zwei Taschenklappen bzw. Gefäßklappen zwischen Kammer und Gefäß. Die Taschenklappen ragen in das Lumen der jeweiligen Ausstrombahn und bestehen aus drei halbmondförmigen Taschen, die aufgrund ihrer Form auch Valvulae semilunares bzw. Semilunarklappen genannt werden. Die Aortenklappe ist eine Taschenklappe, die dem Ostium aortae entspringt. Die Klappenringe aller Klappen sind durch Bindegewebe verstärkt und miteinander verbunden als Teile des sogenannten Herzskeletts. (Michael Schünke, 2012)

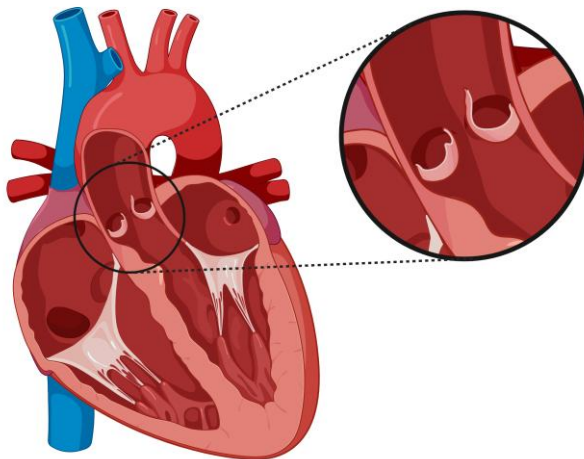


Abbildung 1: Anatomische Lage der Aortenklappe.

Erstellt mit BioRender.com.

Die vier Herzklappen haben einen ähnlichen histologischen Aufbau. Sie gehören zum Endokard und sind beidseitig überzogen mit Klappenendothelzellen (VEC, engl. valvular endothelial cells). Zwischen den beiden Endothelschichten gibt es die extrazelluläre Klappenmatrix (EZM oder VECM, engl. valvular extracellular matrix) mit verschiedenen Zellen, die in drei Schichten eingeteilt wird. Im Falle

der Aortenklappe grenzt auf der ventrikulären Seite die elastinreiche Lamina ventricularis an das Endothel an und auf der aortalen Seite die Lamina fibrosa. Mittig zwischen Ventricularis und Fibrosa befindet sich die Lamina spongiosa. Die Spongiosa besteht aus lockerem Bindegewebe und enthält Fibroblasten, Histiozyten, Hyaluronan und Proteoglykane. Die Fibrosa dagegen besteht aus straffem kollagenem Bindegewebe mit reichlich Kollagen Typ I, welches mit dem Herzskelett verbunden ist. (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015, Rajamannan et al., 2011, Goody et al., 2020, Liu et al., 2007). Die drei Schichten der Herzklappe unterhalb des Endothels enthalten verschiedene Zelltypen: interstitielle Klappenzenellen (VIC, engl. valvular interstitial cells), kardiale Muskelzellen sowie glatte Muskelzellen (SMC, engl. smooth muscle cells) (Durbin and Gotlieb, 2002).

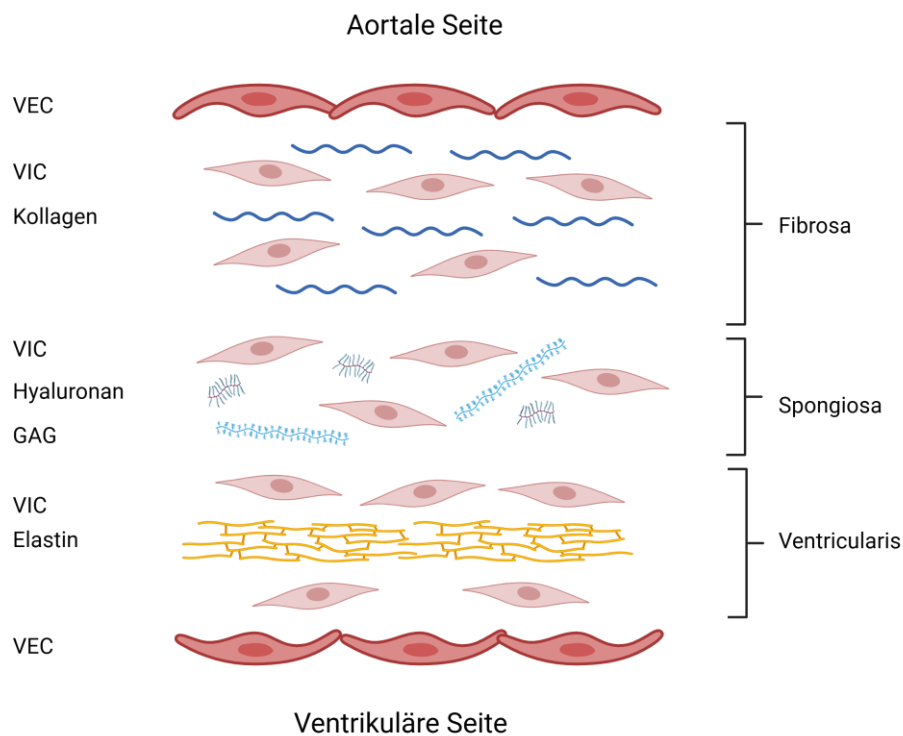


Abbildung 2: Histologischer Aufbau der Aortenklappe.

Erstellt mit BioRender.com. Modifiziert nach Lerman et al. (2015).

VIC = Valvular interstitial cells, VEC = Valvular endothelial cells, GAG = Glucosaminoglykane

Die VIC sind der vorherrschende Zelltyp der Klappe und kommen in allen drei Schichten vor (Liu et al., 2007). Sie sind eine heterogene Gruppe spezifischer Zelltypen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen, beispielsweise Zell-Zell-Kommunikation, Kontraktilität, Wundreparatur, Synthese von VECM, Remodeling, Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Matrix-abbauenden Enzymen, wie Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sowie deren Inhibitoren. (Rajamannan et al., 2011, Mulholland and Gotlieb, 1996, Aikawa and Libby, 2017, Liu et al., 2007). Liu et al. beschreiben fünf identifizierbare Phänotypen der VIC, welche sich jedoch in die jeweils anderen Phänotypen umwandeln können (Abbildung 3). Ruhende VIC (qVIC, engl. quiet VIC) ähneln ruhenden Fibroblasten, erhalten die normale Physiologie der erwachsenen Herzklappe und können z.B. über Verletzungen der Herzklappe aktiviert werden (Liu et al., 2007, Aikawa and Libby, 2017). Aktivierte VIC (aVIC, engl. activated VIC) enthalten α -SMA (smooth muscle actin) und sind regulatorisch an den Verletzungs- und Krankheitsprozessen im Sinne von Umbau und Reparaturen beteiligt. Osteoblastische VIC (obVIC) haben regulierende Funktionen bei der Osteo- und Chondrogenese und sekretieren beispielsweise Osteopontin, Osteocalcin und alkalische Phosphatase. Vorläufer-VIC (pVIC) sind eine heterogene Gruppe von residenten und zirkulierenden Herzklappen-Vorläuferzellen, welche bei Erwachsenen zusammen mit den Knochenmarkszellen als Quelle für aVIC dienen. Embryonale Vorläufer-Endothel-/ Mesenchymzellen leiten die Klappenbildung im Embryo ein, indem aus ihnen über eine EndMT die qVIC und aVIC entstehen. (Liu et al., 2007) Die VEC unterscheiden sich von den restlichen Endothelzellen des Körpers, aber es gibt auch Unterschiede zwischen den VEC der aortalen und ventrikulären Seite der Klappe, was mit einer seitenspezifischen Anfälligkeit für Verkalkungen korrelieren könnte. (Simmons et al., 2005) VEC können unter anderem die mechanischen Eigenschaften der Herzklappen modulieren, die zelluläre Adhäsion sowie die VECM regulieren und eine Differenzierung der VIC in pathologische Zelltypen verhindern. (Rajamannan et al., 2011, Mongkoldhumrongkul et al., 2016, Hjortnaes et al., 2015). Im Rahmen von Inflammationen können VEC allerdings selbst eine EndMT durchlaufen und zur Osteogenese beitragen (Farrar et al., 2015, Farrar and Butcher, 2014). VIC scheinen die EndMT der VEC inhibieren

zu können (Hjortnaes et al., 2015). Eine Störung der VEC ist häufig mit einer Fehlfunktion sowie pathologischer Prozesse der Klappe verbunden, beispielsweise der Klappensklerose (Tao et al., 2012). Die Sichtweise auf die Herzklappen wandelt sich immer mehr von der einer passiven Struktur in Richtung eines aktiven Organs, welches an der eigenen Funktions- und Integritätserhaltung beteiligt ist, um der gegebenen hämodynamischen Umgebung zu trotzen (Chester et al., 2014).

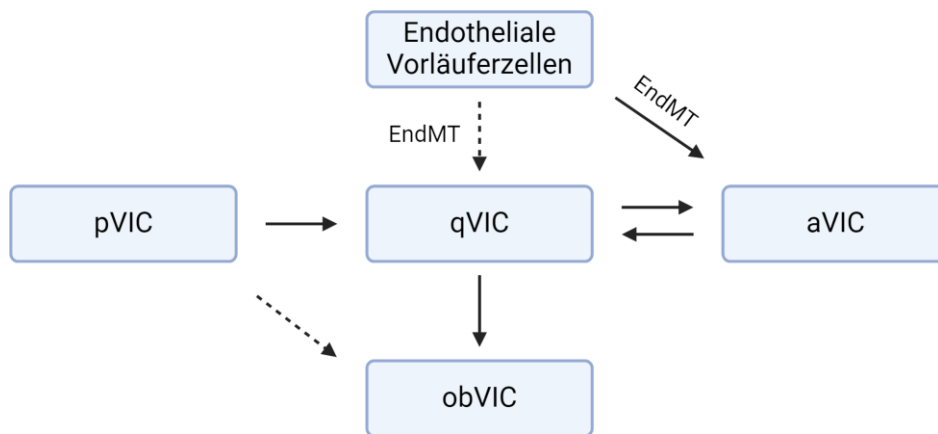


Abbildung 3: Zellen des Herzklappeninterstitiums (VIC).

Erstellt mit BioRender.com. Modifiziert nach Liu et al. (2007).

VIC = Valvular interstitial cells, pVIC = precursor VIC, qVIC = quiet VIC, aVIC = activated VIC, obVIC = osteoblastische VIC, EndMT = Endotheliale mesenchymale Transformation.

1.1.5 Ätiologie und Pathogenese der CAVD

Die zugrundeliegenden Pathomechanismen der CAVD sind komplex und unterliegen einer multifaktoriellen Genese (Aikawa and Libby, 2017). Sie ähneln gewissermaßen der Atherosklerose und sind bis heute nicht vollständig verstanden (Mohler, 2004, Otto et al., 1994). Beschrieben wurden von (New and Aikawa, 2011) drei Phasen der Pathogenese der CAVD: Die sogenannte Initiationsphase, die geprägt ist durch eine Erhöhung von Immunzellen und pro-osteogenen Zytokinen im Rahmen einer Inflammation, noch ohne Vorliegen von Verkalkungen. Die reversible Ausbreitungsphase, die sowohl von einer Inflammation, als auch von einer Entstehung von Mikroverkalkungen und osteogener Aktivität geprägt ist. Wahrscheinlich parallel mit der Ausbreitungsphase beginnt die mutmaßlich irreversible Phase der Makrokalzifikationen des Endstadiums.

Die Initiationsphase wird ausgelöst durch eine Endotheldysfunktion aufgrund einer Schädigung der VECs durch insbesondere hämodynamische oder biochemische Faktoren (Peeters et al., 2018). Es liegt also nahe, dass diese Phase von Risikofaktoren, wie z.B. einer Hypertonie oder Hyperlipidämie, begünstigt wird (Gimbrone and García-Cardeña, 2016). Es entsteht oxidativer Stress mit einer Dysregulation des eNOS (endothelial nitric oxide synthase)-Signalweges, welche zu einer Verminderung des Stickstoffmonoxids (NO) und seinen protektiven Funktionen führt, sowie zu einer Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und von NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) (Rajamannan et al., 2011, Goody et al., 2020). Es kommt zu einer Lipidinvasion, vor allem von LDL und Lipoprotein A und einer Oxidation zu oxidized LDL (ox-LDL) und oxidized phospholipid (OxPL)-Lipoprotein A. (Perrucci et al., 2020, Yu et al., 2017). Die gestörte endotheliale Barriere führt außerdem zu einer Immunzellinfiltration und Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen. OxLDL fördert eine Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (vascular cell adhesion protein 1) und damit eine weitere Adhäsion und Infiltration von Immunzellen (Goody et al., 2020). Im Klappengewebe werden Makrophagen zu Schaumzellen, indem sie OxLDL aufnehmen und es in Form von Lipidtropfen in ihrem

Zytoplasma speichern, welche bei einer späteren Apoptose wieder freigesetzt werden und die Entzündung weiter fördern (Shah et al., 2023, Ross, Gui et al., 2022). Dieser Prozess scheint jedoch im Vergleich zur Arteriosklerose bei der CAVD keine zentrale Bedeutung außerhalb der Initiierung zu haben, da sich die Schaumzellen eher auf die Ein- oder Ausflussfläche beschränken (Kostyunin et al., 2020). Die infiltrierten Immunzellen haben allerdings großen Einfluss auf die Zelldifferenzierung, z.B. von VIC und damit auf den EZM-Umbau, indem sie pro-osteogene Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 und Wachstumsfaktoren wie TNF- α (Tumornekrosefaktor α), TGF- β (Transforming growth factor β) und IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) exprimieren (Zheng et al., 2020, Nsaibia et al., 2017). Exprimiert werden außerdem proteolytische Enzyme wie Cystein-Endoproteasen und Matrix-Metalloproteasen, z.B. MMP-1, MMP-2, MMP-13 und MMP-9 (Leopold, 2012), die ebenfalls am EZM-Umbau beteiligt sind, sowie RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B), der zu einer osteoblastischen und myofibroblastischen Differenzierung der VIC beiträgt (Kaden et al., 2004).

Die Ausbreitungsphase ist gekennzeichnet durch einen Krankheitsprogress mit Fibrosierungen und Verkalkungen der Klappe (Peeters et al., 2018).

Zum fibrotischen Remodeling der EZM tragen multiple Faktoren bei, wie z.B. die bereits genannten Matrix-Metalloproteinasen (Edep et al., 2000, Fondard et al., 2005) und das Renin-Angiotensin-System (RAS) (Peeters et al., 2018).

Die Entstehung von Mikroverkalkungen wird im Rahmen der Inflammation sowohl durch eine Produktion von Mikrovesikeln durch Zellen wie z.B. VIC und Makrophagen angetrieben (Li et al., 2022), als auch durch eine anschließende Apoptose dieser Zellen mit Freiwerden von Apoptosekörpern (Kostyunin et al., 2019, Mohler et al., 2001, Goody et al., 2020). Diese Mikroverkalkungen können Ursprung von Plaquerupturen und anderen akuten vaskulären Geschehnissen sein (Vengrenyuk et al., 2006). MMPs können zu einer Instabilität von Plaques beitragen (Newby, 2007).

Zur Makrokalzifikation und damit zum Endstadium der Kalzifikation kommt es durch unterschiedliche Prozesse. Einerseits steigert die Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen die Ablagerung von Kalziumkristallen im Klappengewebe, sodass sich noch mehr Kalzium ablagern kann und inflammatorische Prozesse weiter

gefördert werden (Donato et al., Peeters et al., 2018) und andererseits entstehen, wie bei der Skelettknochenbildung, osteoblastische Zellen, in diesem Fall durch eine Differenzierung der VIC in obVIC. In Zusammenhang hiermit stehen osteogene Mediatoren wie z.B. NOTCH1, Osteopontin, Osteocalcin, RUNX2 (Runt-related transcription factor) oder BMP (bone morphogenetic protein) und TGF- β (transforming growth factor β), welche unter anderem den Wnt/ β -Catenin Signalweg aktivieren (Mazur et al., 2021, Liu et al., 2007, O'Brien, 2006, Zheng et al., 2020, Donato et al.). Außerdem können VEC im Rahmen von Entzündungen eine EndMT durchlaufen und als aktivierte Form die Klappenverkalkung steigern (Farrar et al., 2015, Farrar and Butcher, 2014).

Die beschriebenen Prozesse sind ein Circulus vitiosus und führen zu einer immer weiter zunehmenden Versteifung und Verdickung der Klappe und somit zu einer Beeinträchtigung ihrer Bewegung (Aikawa and Libby, 2017, Ma et al., 2020).

Eine besondere Rolle nimmt die kalzifizierende bikuspidale Aortenklappenerkrankung ein, da es aufgrund der hämodynamischen Besonderheiten zu einem schnellen Krankheitsprogress kommt (Sun et al., 2012). Es wurde außerdem ein Zusammenhang zwischen bikuspidaler Aortenklappe und genetischen Mutationen in NOTCH1 und Zinkfingerproteinen der GATA-Familie festgestellt, welche zu einer Fehlregulation der MMPs führt und damit Veränderungen der EZM und Verkalkungen fördern (Goody et al., 2020, Wang et al., 2021, Alonso-Montes et al., 2018, Li et al., 2018).

Ein weiterer ätiologischer Faktor, der mit einer Atherosklerose sowie einer Aortenklappenstenose in Zusammenhang gebracht wurde, ist eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* (Nyström-Rosander et al., 1997, Juvonen et al., 1997). Hierbei werden MMPs wahrscheinlich über eine Hochregulierung vom sogenannten extrazellulären Matrix-Metalloproteinase-Induktionssystem MT1-MMP (EMMPRIN)/ Membran-Typ-1-Matrix-Metalloproteinase-System hochreguliert (Choi et al., 2002).

1.2 Cyclophilin A (CypA)

Das Protein Cyclophilin A (CypA) gehört zur Familie der Immunophiline und hat eine Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität (PPIase) (Nigro et al., 2013). Cyclophiline kommen in allen Zellen vor (Wang and Heitman, 2005). CypA ist wichtig für Zellsignalisierung, Proteinfaltung, Proteintransport und T-Zell-Aktivierung. Es ist außerdem primäres Bindungsprotein für Cyclosporin A (CsA), einem Immunsuppressivum.

Intrazelluläres CypA kann durch Zelluntergang nach extrazellulär gelangen oder von VSMC, Endothelzellen und Makrophagen bei Reizen wie beispielsweise Entzündungen und oxidativem Stress nach extrazellulär sezerniert werden (Jin et al., 2000, Xue et al., 2018, Suzuki et al., 2006). Die CypA-Sekretion der VSMC geschieht über einen vesikulären Transportmechanismus über Plasmamembranproteine, sogenannte vesikel-assoziierte Membranproteine (VAMP), dessen Anzahl mit der Menge der CypA Sekretion korreliert (Suzuki et al., 2006). Die Vesikel-Sekretion von CypA aus den VSMC ist unter anderem abhängig von Aktin-Remodeling und Myosin-II-Aktivierung über Cdc42-, RhoA-, und Rho-Kinase-abhängige Signalwege (Suzuki et al., 2006). CypA ist ein sezernierter oxidativer Stress-induzierter Faktor (SOXF) und kann Entzündungen, Apoptose von Endothelzellen und ein Wachstum der VSMC fördern (Suzuki et al., 2006). Immunophiline sind bei unterschiedlichsten Zellen an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt und CypA wurde als leistungsstarker Ca^{2+} -Regulator in Thrombozyten identifiziert. Die Thrombozytenaktivierung hängt von einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Aktivität ab (Elvers et al., 2012, Seizer et al., 2015). Somit spielt CypA durch Bindung an den Rezeptor CD147 eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaktivierung und damit bei der Blutgerinnung und der Entstehung von Thromben (Seizer et al., 2015).

Cyclophiline gelten als natürliche Liganden für CD147 (Yurchenko et al., 2002). Eine Aktivierung des CD147-Zelloberflächenrezeptors durch CypA trägt außerdem zu einer chemotaktischen Wirkung bei, sodass Lymphozyten, Monozyten und Leukozyten angelockt werden (Sherry et al., 1992, Xu et al., 1992,

Yurchenko et al., 2002). CypA ist ebenso an der Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs), insbesondere MMP-1 and MMP-9, beteiligt (Kim et al., 2005, Zhu et al., 2005), so zeigten auch Seizer et al. (2010) eine Verstärkung der MMP-9 Sekretion von reifen Schaumzellen durch ein Vorliegen von CypA (Seizer et al., 2010b). Es gibt Zusammenhänge zwischen einer Akkumulation von CypA in atherosklerotischen Läsionen und einem Progress der Atherosklerose (Su et al., 2016). Nigro et al. (2011) definierten fünf Mechanismen der Förderung einer Atherosklerose durch CypA: Zusätzlich zu der bereits genannten Rekrutierung von Entzündungszellen in atherosklerotischen Läsionen, erhöht CypA die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin und VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) und damit die Endothelzell-Aktivierung mit einhergehenden Entzündungsreaktionen. Die Entzündung der Endothelzellen wird weiter gesteigert, indem CypA die Expression von eNOS verringert. Außerdem reguliert intra- und extrazelluläres CypA die Expression von Scavenger-Rezeptoren an der Gefäßwand und damit die LDL-Aufnahme. CypA spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle in der durch TNF- α induzierten Apoptose der Endothelzellen. (Nigro et al., 2011, Satoh et al., 2008)

CypA steht in Zusammenhang mit diversen unterschiedlichen Erkrankungen, wie z.B. Tumoren, Infektionen, Asthma, Rheuma und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. (Nigro et al., 2013). In anderen Studien konnte bereits das Potenzial von CypA als therapeutisches Ziel bei der Aortenklappensklerose gezeigt werden, indem eine Hemmung von CypA mit spezifischen Inhibitoren wie MM284 eine CypA-induzierte Kalzifikation signifikant reduzieren konnte (Heinzmann et al., 2015).

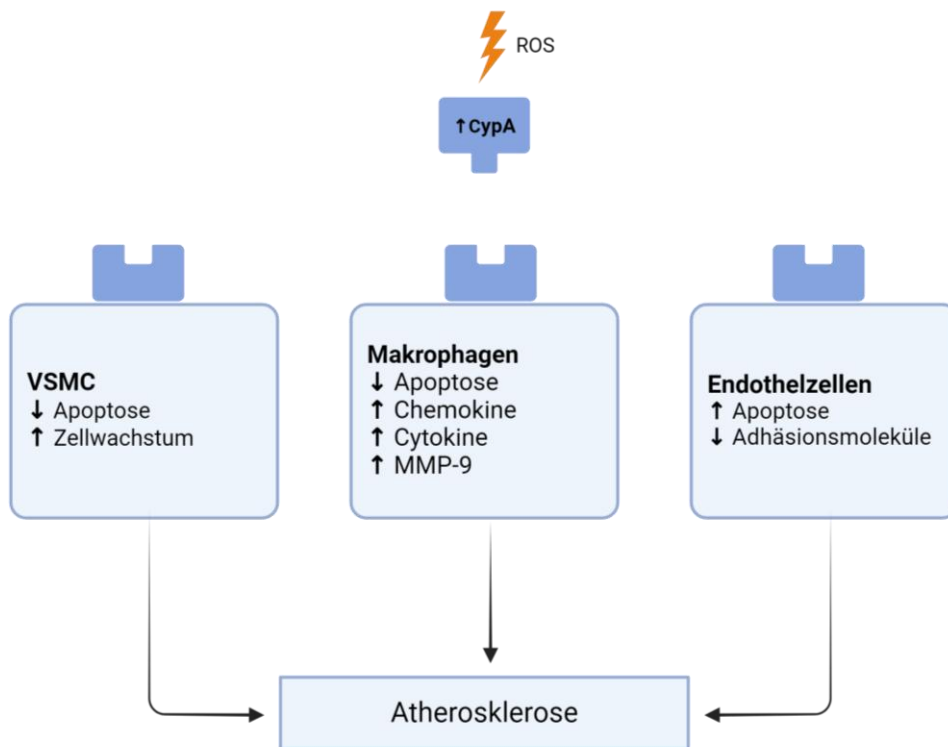


Abbildung 4: CypA-Wirkung auf Zellen.

Erstellt mit Biorender.com.

VSMC = Vaskuläre glatte Muskelzellen, ROS = reaktive Sauerstoffspezies.

CypA wird als Antwort auf ROS freigesetzt und übt unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene Zelltypen im Gefäßsystem aus. In VSMC fördert extrazelluläres CyPA die DNA-Synthese und hemmt die Apoptose. Bei Endothelzellen hingegen verstärkt CypA die Apoptose und erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin und VCAM-1. In Makrophagen hemmt CypA die Apoptose, erhöht jedoch die Produktion von MMP-9, Chemokinen und Zytokinen, sodass es zu einem proinflammatorischen Zustand kommt. Insgesamt trägt CypA dadurch zu Endothelzell-Dysfunktionen, Neointima-Bildung und Entzündungen bei, sodass ein Gefäßumbau sowie die Atherosklerose-Entwicklung beschleunigt werden. (Nigro et al., 2013)

1.3 MMPs und Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bilden eine Familie von Multidomänen-Zink-Endopeptidasen, die im extrazellulären Raum sowohl Matrix- als auch Nicht-Matrixproteine abbauen (Nagase et al., 2006, Bode and Maskos, 2003). Die meisten MMPs werden als inaktive Proenzyme (proMMPs) sezerniert (Piskór et al., 2020), jedoch gibt es auch membranständige MMPs (Newby, 2007). MMPs unterscheiden sich in ihrer Gewebe- und Zelllokalisierung, Membranbindung, Regulation und Substratspezifität. Unterteilen kann man sie in mehrere Gruppen: Gelatinasen (MMP-2 und -9), Kollagenasen (MMP-1,-8,-13 und -18), Stromelysine (MMP-3, -10 und -11), Matrylsine (MMP-7 und -26), membranassoziierte MMPs (MT-MMP 1-6 bzw. Transmembran MMP-14, -15, -16, -24 sowie GPI-Anker MMP-17 und -25) und andere MMPs (MMP-12 bzw. Makrophagenelastase sowie MMP-19, -20, -21, -23, -27 und -28) (Piskór et al., 2020, Itoh, 2015, Visse and Nagase, 2003). Reguliert werden sie über Transkription, z.B. durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, über eine Aktivierung ruhender Proenzyme (pro-MMPs) und eine Hemmung der proteolytischen Aktivität durch Gewebeinhibitoren (TIMPs) (Zhang et al., 2007, Denhardt et al., 1993). Wichtige Induktoren einer Expression von MMPs und TIMPs sind unter anderem ROS und Cholesterol. (Major et al., 2002).

CD147, M6 oder Basigin, auch bezeichnet als EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), ist ein Transmembran-Glykoprotein, das auf Thrombozyten, Endothelzellen und Leukozyten exprimiert wird (Zhu et al., 2014) und als vorgeschalteter Regulator von MMPs gilt (Kaushik et al., 2015). Die EMMPRIN-Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten wird durch eine Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten wie Thrombin und Adenosindiphosphat (ADP) gesteigert und wirkt dann als Adhäsionsrezeptor (Seizer et al., 2009, Schmidt et al., 2008) für eine Induktion einer MMP-Expression umgebender Zellen (Egawa et al., 2006). Auf Monozyten erfolgt die Förderung der EMMPRIN-Expression während der Differenzierung zu Makrophagen durch GM-CSF (Major et al., 2002). Zusätzlich zu dem EMMPRIN, welches als membrangebundener

Zelloberflächenrezeptor vorliegt, finden sich auch lösliche Formen, die entweder proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten oder vesikulär zur Zellmembran transportiert und nach extrazellulär sezerniert werden. (von Ungern-Sternberg et al., 2018, Sidhu et al., 2004, Egawa et al., 2006).

MMPs, TIMPs und EMMPRIN sind an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt, beispielsweise Tumoren, Entzündungen, Wundheilung, Atherosklerose (Nagase et al., 2006, Bode and Maskos, 2003) und der kalzifizierenden Aortenklappenstenose (Kaden et al., 2005). In atherosklerotischen Plaques wurden erhöhte Mengen von MMPs wie MMP-2, -3, -7 und -9 sowie EMMPRIN festgestellt, besonders in den vulnerableren Bereichen mit einem erhöhten Vorkommen von Makrophagen und Schaumzellen (Major et al., 2002, Li et al., 2020). MMP-9 ist hierbei die häufigste Form und wird von aktivierten Makrophagen sekretiert (Zhang et al., 2007), die sowohl dadurch als auch durch Phagozytose EZM abbauen können (Mamilos et al., 2023). Mit einem vermehrten EZM-Abbau und damit einhergehend Abbau von Elastin und Kollagen bei einer Hochregulierung von MMPs (Li et al., 2018) korreliert unter anderem eine Dysfunktion erkrankter Klappen, aber auch die Rupturgefahr atherosklerotischer Plaques, welche sich durch eine abgeschwächte fibröse Kappe, einen großen Lipidkern und dichtes entzündliches Infiltrat aus Schaumzellen sowie T-Lymphozyten auszeichnen (Dollery et al., 1995). Die verschiedenen Herzklappen unterscheiden sich in ihrem spezifischen Expressionsmuster von MMPs und TIMPs. Während beispielsweise MMP-1 in allen Herzklappen vorkommt, beschränkt sich das Vorkommen von MMP-2 auf die Taschenklappen. In VIC scheint in der Regel MMP-2 das häufigste EZM-abbauende Enzym zu sein. MMP-9 und MMP-3 werden nicht in gesunden Herzklappen exprimiert. In bikuspiden Aortenklappen konnte MMP-9 nachgewiesen werden. In stenotischen Aortenklappen konnte eine Erhöhung von MMP-9, aber auch von MMP-3 und TIMP-1 festgestellt werden, welche wahrscheinlich von aVIC sezerniert werden. (Liu et al., 2007) MMP-10 scheint ebenfalls eine Rolle in der CAVD-Progression zu spielen (Matilla et al., 2020).

EMMPRIN kann außerdem mit diversen weiteren Partnern interagieren, wie z.B. Integrinen, Caveolin 1 und Cyclophilinen (Zhu et al., 2014, Yurchenko et al.,

2010, Yurchenko et al., 2006). Einer der wichtigsten pro-inflammatorischen Signalwege in Monozyten scheint hierbei die Interaktion von EMMPRIN und CypA zu sein. Zum Beispiel konnte eine durch CypA induzierte Monozytenmigration sowie Expression von TNF- α , IL-6 und MMP-9 und Aktivierung von NF-kappaB über den ERK1/2-Signalweg durch eine Blockierung von EMMPRIN in Monozyten gehemmt werden. (Yuan et al., 2010)

1.4 Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)

Der Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) gehört zu der Superfamilie der Immunglobuline. Ursprünglich wurde er als ein AGE-Bindungsprotein identifiziert (Schmidt et al., 1992), jedoch stellte sich später heraus, dass er als Multiligandenrezeptor fungiert (Ramasamy et al., 2005). Der Mechanismus der Interaktion von RAGE und seinen Liganden ist unbekannt. Es scheinen viele RAGE-Liganden mit Domänen des extrazellulären Anteils zu interagieren und dadurch eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Effekte auszulösen. (Leclerc et al., 2009) Die Interaktion von RAGE und seinen Liganden spielt eine wichtige Rolle in Entzündungsreaktionen (Ramasamy et al., 2008). Eine Hochregulierung von RAGE geschieht sowohl als Folge einer NF- κ B-Aktivierung (Li and Schmidt, 1997), als auch durch eine Ansammlung seiner Liganden (Stern et al., 2002). Zu den RAGE-Liganden gehören neben den AGEs unter anderem auch Amphoterin/HMGB1 (Hori et al., 1995), Mac-1 (Chavakis et al., 2003) sowie das proinflammatorische S100/ Calgranulin (Hofmann et al., 1999). Außerdem scheint Cyclophilin A ebenfalls ein RAGE-Ligand zu sein, der eine Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung vermittelt (Seizer et al., 2024), sowie in Zusammenhang mit der intrazellulären Kalzium-Homöostase und einer Aktivierung von NF- κ B und von der Adhäsion von Blutplättchen steht (Seizer et al., 2024). RAGE und seine Liganden, insbesondere AGE, spielen eine Rolle bei der Produktion von ROS und der Hochregulierung von Entzündungswegen. (Ramasamy et al., 2005, Yan et al., 1994). ROS aktiviert in der Zelle den Transkriptionsfaktors Nuclear Factor (NF)- κ B (Yan et al., 1994), welcher intrazellulär multiple pro-/ anti-apoptotische sowie inflammatorische Signale transduziert. (Li and Schmidt, 1997). Die AGE-RAGE Interaktion trägt zu einer chronischen zellulären Aktivierung und Gewebeschädigung bei (Schmidt et al., 1999) und steht somit auch in Zusammenhang mit der Verkalkung der Aortenklappe (Deng et al., 2020). Die AGE-RAGE-Achse ist unter Anderem beteiligt an der Expression von prothrombotischen und proinflammatorischen Molekülen in mononukleären Phagozyten sowie in Endothelzellen, an der Chemotaxis und Haptotaxis in mononukleären Phagozyten, der

Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 in Endothelzellen, der Expression und Proliferation sowie Migration von matrixmodifizierenden Molekülen in SMC, der Proliferation und Bildung von Interleukin-2 in Lymphozyten, der Kollagen-Produktion in Fibroblasten und der EndMT (Schmidt et al., 1993, Miyata et al., 1996, Owen et al., 1998, Ramasamy et al., 2005, Sakaguchi et al., 2003, Deng et al., 2020). Es sind auch andere Isoformen von RAGE bekannt, beispielsweise lösliches RAGE (sRAGE), das nur aus der extrazellulären Domäne besteht und durch alternatives Splicing des RAGE-Gens oder durch Abspaltung der membrangebundenen RAGE-Domäne entsteht (Yonekura et al., 2003). sRAGE kann auch AGEs binden und wirkt daher als kompetitiver Inhibitor bei der Ligand-RAGE-Wechselwirkung. Eine Verringerung atherosklerotischer Veränderungen konnte durch die Verabreichung von sRAGE an diabetischen Apo-E-Mäuse beobachtet werden. (Bucciarelli et al., 2002, Grauen Larsen et al., 2019, Schmidt et al., 1999).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Bereits in anderen Studien wurden Zusammenhänge von CypA, RAGE, EMM-PRIN, sowie erhöhten laborchemischen Risikofaktoren mit entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Atherosklerose, hergestellt. Für eine Erweiterung des Verständnisses der Pathogenese der Aortenklappenstenose wurde in dieser Arbeit erstmalig der Einfluss von lokal auf der Aortenklappe vorliegendem CypA, RAGE und EMMPRIN auf ein schnelleres Fortschreiten der Aortenklappenstenose untersucht. Ein weiteres Augenmerk in diesem Zusammenhang, legten wir einerseits auf bekannte laborchemische Risikofaktoren im Blutplasma, wie Blutfette, als auch die Anzahl inflammatorischer Zellen im Gewebe stenotischer Aortenklappen. Da es bisher keine medikamentöse Therapie gibt, die das Fortschreiten der Aortenklappenstenose verhindert, war es Ziel dieser Arbeit, mögliche therapeutische Ziele zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkohorte und Studienaufbau

2.1.1 Ethikvotum und Datenerhebung

Die Studie wurde unter der Projektnummer 240/2018B02 durch die Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen genehmigt und nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (aus dem Jahre 1946) durchgeführt. Bei der Datenerfassung und Datenaufarbeitung wurde sowohl die ärztliche Schweigepflicht als auch der Datenschutz beachtet. Die Patientendaten wurden pseudonymisiert. Es liegen schriftliche Einverständniserklärungen aller Probanden vor.

2.1.2 Studiendesign

In die prospektive Studie wurden von Dezember 2014 bis März 2021 insgesamt 475 Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose eingeschlossen, welche sich in diesem Zeitraum in der Abteilung für Thorax-Herz-Gefäßchirurgie am Uniklinikum Tübingen vorstellten und als Kandidaten für eine Aortenklappenersatz-Operation infrage kamen. Es erfolgte eine Einteilung in die zwei Subgruppen FP-AS und SP-AS anhand von wiederholten thorakalen echokardiographischen Untersuchungen sowie der Dauer der Symptomatik. Hierbei wurden als Cut-Offs eine mittlere Symptombdauer von 14,4 Monaten (Bereich 1 bis 98 Monate) und eine annualisierte Änderung der maximalen transvalvulären Geschwindigkeit über die AV (ΔV_{\max}) von $\geq 0,45$ m/s/Jahr gewählt. Von den 475 Patienten wurden 211 (44,4 %) als FP-AS und 264 (55,6 %) als SP-AS eingestuft. In dieser Arbeit wurden 88 der rekrutierten Probanden betrachtet, hiervon wurden 57 (64,8%) Patienten als SP-AS und 31 (35,2 %) Patienten als FP-AS kategorisiert. Die explantierten Aortenklappen dienten sowohl als (immun-) histologische Präparate als auch für eine Analyse der Genexpression. Zur Bestimmung der Laborwerte für

die weiteren Untersuchungen wurde den Patienten prä- und postoperativ wiederholt Blut abgenommen und die erhobenen Werte in eine Excel Tabelle übertragen. Hierbei wurden diverse Blutwerte, wie z.B. Blutfette bestimmt, es wurden aber auch die Thrombozyten und Monozyten analysiert. Die erfassten Werte sind zur Übersicht in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt. Mithilfe des Krankenhausinformationssystems i.s.h.med (Oracle Cerner) der medizinischen Klinik Tübingen konnte auf die Patientendaten der Probanden zugegriffen und die studienrelevanten Daten ebenfalls der Excel Tabelle zugeführt werden, beispielsweise Risikofaktoren und Medikamenteneinnahmen. Die für diese Arbeit relevanten Daten sind ebenfalls in Tabelle 2 miterfasst.

Einschlusskriterien

1. Echographisch gesicherte, schwere, symptomatische (NYHA ≥ 2) Aortenklappenstenose mit OP-Indikation
2. Volljährigkeit

Ausschlusskriterien

1. Verdacht auf oder gesicherte systemische Infektion oder bakterielle Endokarditis innerhalb der letzten 180 Tage
2. Schwere Leberzirrhose oder aktive Lebererkrankung
3. Voraussichtliche Lebenserwartung < 1 Jahr

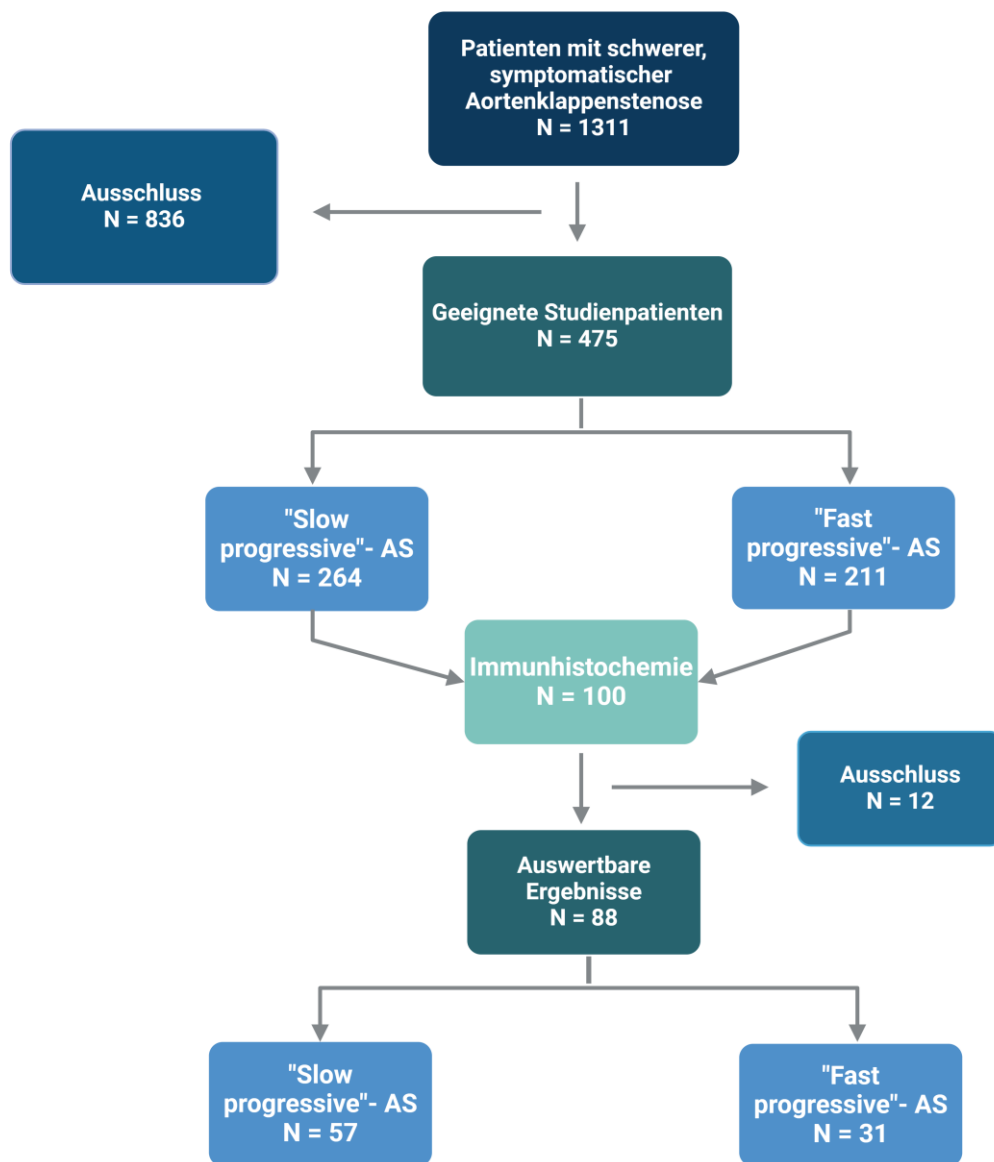


Abbildung 5: Flowchart zum Studiendesign.

Erstellt mit BioRender.com.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

CO ₂ Inkubator MCO-18AIC	SANYO, Gunma-Ken/Japan
Eppendorf-Cup-Ständer	Brand, Wertheim
Falconständer	Brand, Wertheim
IKAMAG RCT basic Magnetrührer	IKA Werke, Staufen
Kühlplatte 70045	MEDAX Nagel, Kiel
Lichtmikroskop Nikon Eclipse NI	NIKON Deutschland, Düsseldorf
Magnetrührstäbchen	Brand, Wertheim
Mikroskop-Kamera Nikon DS-Ri2	Nikon Europe B.V.
Mikrotom Jung Multicut 2045	Leica Instruments, Nussloch
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen
Paraffinspender Modell 71010	MEDAX Nagel, Kiel
Paraffinstreckbad Modell WB24	MEDAX Nagel, Kiel
pH-Meter (pH 90)	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland

Pipette Eppendorf research	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Accu Jet Pro	Brand, Wertheim
Sterilbank HERAsafe	Hereaus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Streckbad	Paraffinstreckbad (Medax Nagel, Kiel)
Tischzentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Trockenschrank Heraeus 6030	Heraeus, Hanau
Vortexer (MS3 digital)	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen,
Waage	Kern CM 150-IN Pocket Balance, KERN & Sohn GmbH, Balingen

2.2.2 Verbrauchsmaterial

Deckgläser (24 x 50 mm)	Langenbrinck, Emmendingen
Einbettkassetten Macrosette™	Roth, Karlsruhe
Einbettring	Zimpert, Québec/Kanada
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Faltenfilter ROTILABO®	Roth, Karlsruhe
Färbekammer StainTray™	Roth, Karlsruhe
Färbekasten aus Glas	Roth, Karlsruhe
Färbekasten ROTILABO®	Roth, Karlsruhe
Super PAP Pen Liquid Blocker	Science Services, München
Glas-Einsatz für Färbekasten mit Drahtbügel	Roth, Karlsruhe
Glaspasteurpipetten	Brand, Wertheim
Gussformen aus Metall für Einbettungskassetten	Roth, Karlsruhe
Metall-Einsatz für Färbekasten	Roth, Karlsruhe

Mikrotomklingen S35	PFM medical AG, Nonnweiler
Objektträger (25 x 75 x 1 mm), Super Frost® plus	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträgerhalter ROTILABO®	Roth, Karlsruhe
Pipetten	Costar, Bodenheim
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Schwämme für Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Transferpipetten	Becton Dickinson, Heidelberg

2.2.3 Chemikalien

Cell and Tissue Staining Kit Anti-Goat (HRP-DAB-System) CTS008 mit Peroxidase Blocking Reagent, Serum Blocking Reagent, Avidin Blocking Reagent, Biotin Blocking Reagent, Biotinylated Secondary Antibody, HSS-HRP, DAB Chromogen	R&D Systems, USA
Citronensäure	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin G	Roth, Karlsruhe
Ethanol >99 %	SAV, Flintsbach
Formaldehyd-Lösung 4 %, gepuffert	Fischar, Saarbrücken
Mayers Hämalunlösung	Merck, Darmstadt
Paraffin Pastillen Paraplast Plus®	Roth, Karlsruhe

PBS-Tabletten	Thermo Fisher, Waltham/USA
Roti®Histokitt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti®Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Solidofix®-Kältespray	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	AppliChem gmbH, Darmstadt
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA

2.2.4 Lösungen/ Puffer

Citratpuffer pH 6	<p>41 ml Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,1 M (2,94 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 100 ml Aqua dest.)</p> <p>9 ml Citronensäure 0,1 M (1,92 g Citronensäure in 100 ml Aqua dest.)</p> <p>450 ml Aqua dest.</p> <p>ggf. Zugabe von Salzsäure oder Nat- riumhydroxid, je nach pH-Wert</p>
Eosin 1%-Lösung	<p>2 g Eosin G</p> <p>200 ml Aqua dest.</p> <p>2 Tropfen Eisessig</p>
Hämalaunlösung	<p>50 ml Mayers Hämalaunlösung</p> <p>250 ml Aqua dest.,</p> <p>Filtern mit Faltenfilter</p>
PBS	<p>2 PBS-Tabletten</p> <p>1 Liter destilliertes Wasser</p>
PBS-Tween	<p>1 Liter PBS</p> <p>500 µl 0,05% Tween20</p>

2.2.5 Antikörper

Human Cyclophilin A Antibody: AF3589	R&D Systems, USA
Human RAGE Antibody: AF1179	R&D Systems, USA
Human EMMPRIN Antibody: AF972	R&D Systems, USA
Normal Goat IgG Control: AB-108-C	R&D Systems, USA

2.2.6 Software-Programme

BioRender	BD Biosciences, USA
Endnote 20	Clarivate Analytics, USA
Excel	Microsoft Corporation, USA
Fiji Image J	Open Source
GraphPad Prism 10 (Version 10.0.2)	GraphPad Software Inc., USA
NIS-Elements AR 5.21.00. 64 bits	NIKON Deutschland, Düsseldorf
Powerpoint	Microsoft Corporation, USA
IBM SPSS Statistics 29.0	SPSS Inc., USA

2.3 Methoden

2.3.1 Vorbereitung/ Paraffineinbettung der Klappen

Die explantierten Aortenklappen wurden zunächst ca. 30 Minuten in eiskalter Kochsalzlösung und dann bis zur Paraffineinbettung in 4 % Paraformaldehydlösung gelagert. Für die Paraffineinbettung wurden die Aortenklappentaschen in Einbettkassetten mit Schwämmchen eingebracht und in einer aufsteigenden Alkoholreihe über mehrere Stunden entwässert: jeweils eine Stunde in 70 %, 80 % und 95% Ethanol sowie zwei Stunden in 100% Ethanol und 2 Stunden in Roti-Histol. Im Ofen wurde Paraffin geschmolzen und die Einbettkassetten in das ca. 60°C heiße Paraffin eingelegt. In die Gussformen aus Metall wurden die Einbettringe aus Plastik eingelegt und eine dünne Schicht Paraffin gegeben, um die Aortenklappentasche in Position zu bringen. Anschließend wurden die Förmchen mit Paraffin aufgefüllt und auf einer Eisplatte bis zum Aushärten gekühlt.

2.3.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zunächst wurden die eingebetteten Aortenklappen bzw. Paraffinblöckchen für mindestens 20 Minuten auf eine Kühlplatte gelegt, um ein besseres Ergebnis beim Schneiden zu erzielen. Dann wurde jeweils ein Paraffinblöckchen am Rotationsmikrotom eingespannt, parallel zu der Klinge ausgerichtet und eine Schnittdicke von 8 µm eingestellt. Bei Bedarf wurde die Oberfläche des Paraffinblöckchens mit einem Eis-Spray besprüht. Anschließend wurden Serienschritte erstellt und vorsichtig mit dem Pinsel abgehoben und in ein Kaltwasserbad (ca. 20°C) überführt. Auf die Objektträger wurden dann jeweils drei Schnitte, welche in Serie erstellt wurden, aufgeladen und in einem kalkarmen Heißwasserbad (ca. 45°C) gestreckt. Die Objektträger wurden auf den warmen Rand des Heißwasserbads gelegt, mit der jeweiligen K-Nummer beschriftet und anschließend senkrecht zum Trocknen der Schnitte für mindestens 2 Tage in einen

Inkubationsschrank bei ca. 37°C gelagert. Für die späteren Positivkontrollen diente Thrombusmaterial, welches ebenfalls wie das Klappenmaterial bearbeitet wurde.

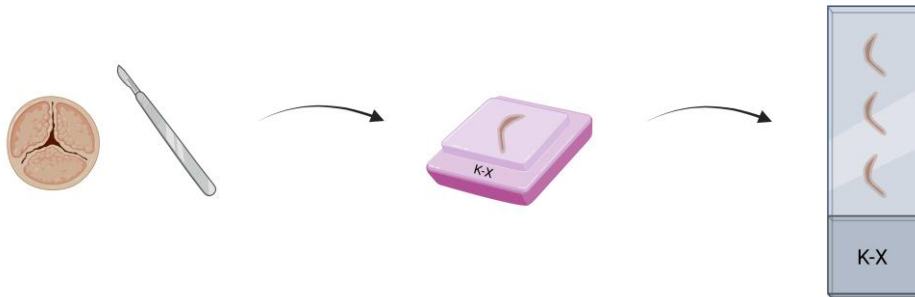


Abbildung 6: Erstellung von Paraffinschnitten.

Erstellt mit BioRender.com.

2.3.3 Färbungen

2.3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als Übersichtsfärbung zur Unterscheidung unterschiedlicher Gewebestrukturen wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) eines Aortenklappenschnittes aller Patienten angefertigt. Hämatoxylin wird als „Hämalaun“ in der Histologie angewendet und färbt als basisches Reagenz alle basophilen/ sauren Strukturen blau, z.B. Zellkerne. Eosin färbt als saures Reagenz alle azidophilen/ basischen/ eosinophilen Strukturen rot, z.B. Kollagen. Zunächst mussten die Gewebeschnitte entparaffiniert werden. Hierzu wurden die OT 20 Minuten in Roti-Histol® gelagert und mussten anschließend die absteigende Alkoholreihe durchlaufen: 10 Minuten in 100 % Ethanol und jeweils 5 Minuten in 90%, 80% und 70% Ethanol. Dann Überführung in destilliertes Wasser für ca. 5 Minuten und wiederum 5 Minuten in der Hämalaun-Lösung. Es folgte das sogenannte Bläuen unter fließendem, lauwarmem Leitungswasser für 15 Minuten. Die pH-Erhöhung führte zu einem Farbumschlag der vorher rötlich-braunen Zellkerne in ein Blauviolett.

Bei der Gegenfärbung erfolgte eine dreiminütige Inkubation in der 1% Eosin-Lösung und ein kurzes Auswaschen mit destilliertem Wasser. Zur Entwässerung durchliefen die OT eine aufsteigende Alkoholreihe: jeweils 10 Sekunden in 70%, 80% und 95% Ethanol, dann 2 x 5 Minuten in 100% Ethanol. Dann inkubierten sie 5 Minuten in Roti-Histol® und schließlich wurden sie mit Roti-Histokitt unter dem Abzug eingedeckt und hier mindestens 2 Tage waagrecht trocknen gelassen.

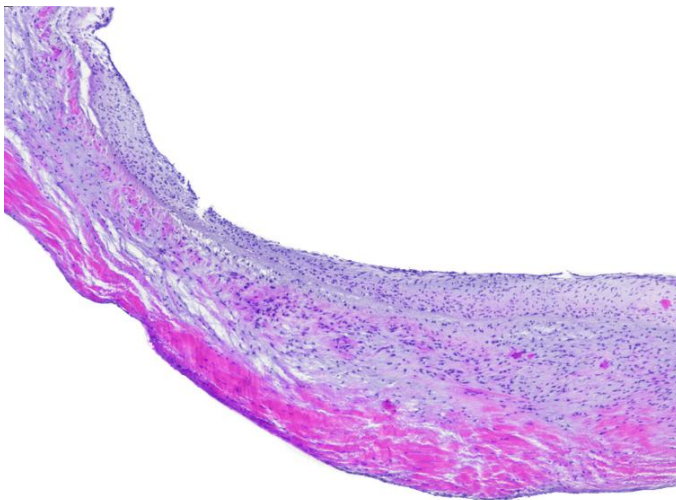


Abbildung 7: Beispiel einer HE-Färbung.

Ausschnitt eines Mikroskopiebildes der Aortenklappe K188.

2.3.3.2 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Färbung dient der Detektion von Antigenen. In dieser Arbeit wurde das Protokoll der HRP-DAB-Staining Kits von R&D verwendet und gering modifiziert. Zu Beginn mussten die Klappen-Schnitte auf den Objektträgern (OT) mithilfe des Xylol-Ersatzes Roti-Histol® entparaffiniert werden. Die OT wurden dazu zweimalig jeweils 10 Minuten in Roti-Histol® gebadet. Anschließend erfolgte eine Rehydratisierung der Gewebeschnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe und ein kurzes Spülen mit destilliertem Wasser. In der absteigenden Alkoholreihe wurden die OT zunächst zweimalig 5 Minuten in 100% Ethanol

gebadet, gefolgt von 5 Minuten in 90%, 5 Minuten in 80% und 5 Minuten in 70% Ethanol. Es folgte eine Antigen-Demaskierung mittels HIER (heat induced epitope retrieval), bei der die OT bei ca. 365 W in einem Bad aus Citratpuffer bei pH6 in der Mikrowelle zuerst zum Kochen gebracht und dann 15 Minuten lang unter wiederholtem Nachgießen von Citratpuffer inkubiert wurden. Anschließend Auskühlen für mindestens 15 Minuten. Dann wurden die OT dreimalig jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Klappenschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, um ein Auslaufen der Reagenzien der folgenden Schritte möglichst zu vermeiden. Die OT wurden beschriftet mit den aufzutragenden Reagenzien (Abbildung 8): ein Klappenschnitt für die tatsächliche Färbung, ein Klappenschnitt für die Negativkontrolle mit dem jeweiligen IgG und eine für die Negativkontrolle mit PBS. Außerdem wurde bei jeder Färbung ein Objektträger mit humanem Thrombusmaterial als Positivkontrolle mitgefärbt, auf dem sowohl der jeweilige Primärantikörper als auch Negativkontrollen aufgetragen wurden. Da die später eingesetzten Färbereagenzien auf Peroxidase-Reaktionen basieren, wurde je nach Größe des Klappenschnittes ca. 45 µl Peroxidase Blocking Reagent auf die Schnitte getropft und fünf Minuten inkubiert, um die endogene Peroxidase im Gewebe zu hemmen und sogenannte Hintergrundfärbungen zu vermeiden. Die Schnitte wurden dann erneut fünf Minuten in PBS gewaschen. Dann wurden für 15 Minuten ca. 45 µl des Serum Blocking Reagents aufgetragen und anschließend abgetropft. Ohne zwischenzeitliches Waschen wurden ca. 45 µl Avidin Blocking Reagent aufgetragen und anschließend wenige Sekunden in PBS gewaschen. Nun wurde für weitere 15 Minuten ca. 45 µl Biotin Blocking Reagent aufgetragen und dann wenige Sekunden in PBS gewaschen. Die beschriebenen Blocking Schritte wurden durchgeführt, um später unspezifische Bindungen der Färbereagenzien zu vermeiden. Die Primärantikörper sowie die IgG-Negativkontrollen wurden verdünnt wie in Tabelle 1 und auf die jeweiligen Klappenschnitte aufgetragen, je nach Schnittgröße ca. 45 µl. Als weitere Negativkontrolle diente PBS, welches ebenfalls auf einen Klappenschnitt jedes Patienten pro Antikörperfärbung aufgetragen wurde. Es folgte die Inkubation über Nacht im Kühlraum oder Kühlschrank bei 4°C.

Tabelle 1: Antikörper-Verdünnungen für die IHC

Cyclophilin A (500 µg/ml)	10 µg/ml x 0,1 ml -> 2 µl AK + 98 µl PBS
RAGE (200 µg/ml)	15 µg/ml x 0,1 ml -> 7,5 µl AK + 92,5 µl PBS
CD147 (200 µg/ml)	10 µg/ml x 0,1 ml -> 5 µl AK + 95 µl PBS
gIgG (1000 µg/ml)	10 µg/ml x 0,1 ml -> 1 µl AK + 99 µl PBS
gIgG (1000 µg/ml)	15 µg/ml x 0,1 ml -> 1,5 µl AK + 98,5 µl PBS

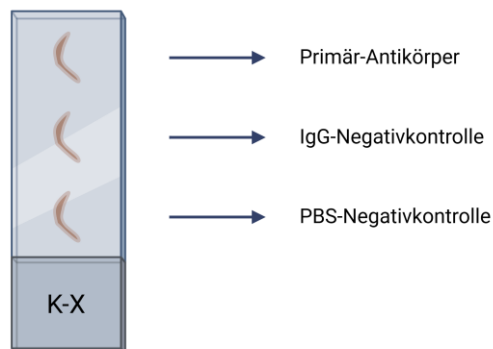


Abbildung 8: Beispiel für die immunhistochemischen Färbungen.

Erstellt mit BioRender.com.

Dargestellt ist ein Objektträger mit drei Aortenklappenschnitten. Auf jeweils einen Schnitt werden in der IHC jeweils ein Primär-Antikörper sowie eine IgG-Negativkontrolle und eine PBS-Negativkontrolle getropft.

Am nächsten Tag wurden die OT 3 x 5 Minuten in PBS-Tween gewaschen. Für 60 Minuten wurde der Biotinylated secondary antibody aufgetragen, welcher zur Signalverstärkung diente. Es entstand ein Avidin-Biotin-Komplex (ABC) mit dem

primären Antikörper, welcher wiederum mit Gewebe-Antigenen reagierte. Dann wurde wiederum 3 x 5 Minuten in PBS-Tween gewaschen. Es folgte die Inkubation mit HSS-HRP (High Sensitivity Streptavidin-Horseradish Peroxidase) für 30 Minuten und dann ein Waschen von 3 x 2 Minuten in PBS-Tween. Durch das HSS sollte eine unspezifische Bindung an Nukleinsäuren, Phospholipide und kohlenhydratbindende Proteine verhindert werden. Für die Visualisierung wurde ein Tropfen des Chromogen-Substrats DAB (3,3'Diaminobenzidin) und 1 ml DAB Chromogen Puffer gemischt und aufgetragen. Die Dauer der Inkubation hierbei variierte je nach Primär-Antikörper (Kapitel 2.3.3.3). Das durch die HRP enzymatisch umgewandelte DAB zeigt sich als brauner Niederschlag an den Antigen-Lokalisationen (Abbildung 9). Anschließend wurde kurz in destilliertem Wasser gespült und 5 Minuten in einem weiteren Bad aus destilliertem Wasser gewaschen. Gegengefärbt wurde mit Hämalaun für 3 Minuten und folgend 15 Minuten gebläut. Danach folgte eine aufsteigende Alkoholreihe beginnend mit 70% auf schlussendlich 100% Ethanol. Anschließend wurden die OT zweimalig in Roti-Histol[®] für jeweils 5 Minuten gebadet. Unter dem Abzug wurden die Schnitte auf den Objektträgern nun mit Roti-Histokitt eingedeckt und mindestens 2 Tage waagrecht trocknen gelassen.

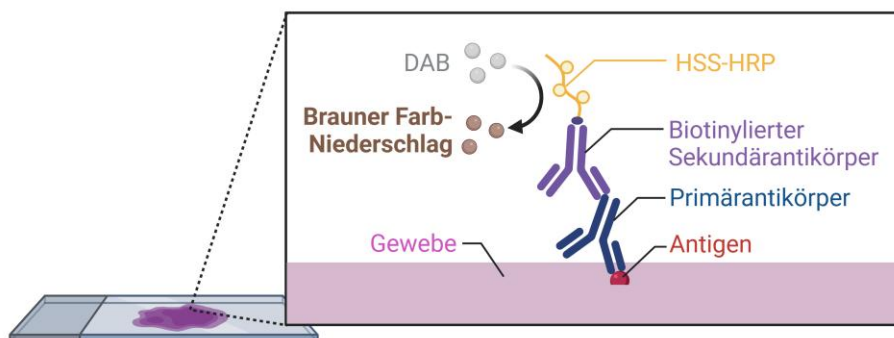


Abbildung 9: HSS-HRP System der Immunhistochemie.

Erstellt mit BioRender.com.

2.3.3.3 Etablierungen der Antikörper und des Staining-Kits

Auf drei Objektträgern mit jeweils drei Klappenschnitten wurde bei der in 2.3.3.2 beschriebenen immunhistochemischen Färbung jeweils ein Klappenschnitt mit unterschiedlich verdünntem Antikörper und ein Schnitt mit einer IgG-Isotypkontrolle in gleicher Konzentration wie der Primärantikörper sowie ein Schnitt mit PBS bedeckt (Abbildung 8). Auf dem ersten OT wurde eine Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$, auf dem zweiten OT von 10 $\mu\text{g/ml}$ und auf dem dritten OT von 15 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. PBS und IgG dienten jeweils als Negativkontrolle. Außerdem wurden als Positivkontrollen zwei Objektträger mit jeweils vier Schnitten eines Thrombus verwendet und wiederum zwei Schnitte mit dem Primärantikörper unterschiedlicher Konzentration und zwei Schnitte mit den IgG-Isotypkontrollen gleicher Konzentration als Negativkontrollen benetzt. Unter dem Mikroskop wurden digitale Bilder der gefärbten Schnitte gemacht und anhand dieser entschieden mit welcher Konzentration die folgenden Färbungen gemacht werden sollten. Die Etablierung einzelner Schritte des Staining-Kits erfolgte während der ersten Färbung. Hier wurde bei der Inkubation mit der DAB-Lösung direkt die Braun-Färbung beobachtet, die Lösung dann abgegossen und die Zeit gestoppt. Die gemessene Zeit wurde für die weiteren Färbungen beibehalten, diese variierte je nach Primärantikörper. Für RAGE wurde eine DAB-Einwirkzeit von 4 Minuten, für CypA von 2 Minuten und CD147 von 10 Minuten festgelegt. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass während dieser Zeit keine relevanten unspezifischen Färbungen durch zu langes Einwirken entstehen, indem die Negativkontrollen ebenfalls beobachtet wurden. Hierbei sollten die Aortenklappenschnitte, welche mit dem als Negativkontrolle dienendem IgG Antikörper benetzt wurden, keine relevanten Färbungen aufweisen. Die Einwirkzeit des HSS-HRP wurde auf 60 Minuten getestet und beibehalten.

2.3.4 Mikroskopie

Bei der Mikroskopie wurde auf eine immer gleiche Raumbelichtung geachtet. Die Lichtstufe des Mikroskops wurde auf 4-5 eingestellt. In dem Programm NIS Elements D 3.2 wurden Fast Focus 3 x 8 bit sowie Quality (Capture) auf 4908 x 3264 eingestellt. Die Funktion „Disable LUTs“ wurde aktiviert. Vor jeder neuen Aufnahme wurde der OT K211 mit der CypA Färbung aufgelegt und „Reuse camera settings“ ausgewählt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen. Am Mikroskop wurden alle Bilder in 10-facher Vergrößerung aufgenommen und dies im Mikroskopie-Programm ebenfalls ausgewählt, um später die korrekte Anzahl an Pixeln angezeigt zu bekommen und die Bilder korrekt auswerten zu können. Mittels der Funktion „Manual large image“ wurden dann abschnittsweise Bilder gemacht, welche in dem Programm fortlaufend zusammengefügt wurden, sodass jeweils ein Übersichtsbild des gesamten Klappenschnittes in 10-facher Vergrößerung entstand.

2.3.5 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die semiquantitative Bestimmung der Antikörper-positiven Flächen der einzelnen digitalisierten Aortenklappenschnitte erfolgte teil-automatisiert mittels des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ und vorgefertigten Makros, um genauere und untersucherunabhängigere Ergebnisse zu erzielen. Die Bilder der immunhistochemisch gefärbten Aortenklappenschnitte konnten mittels eines „Colour Deconvolution Plugin“ in drei Farbwerte segmentiert werden (Abbildung 10), wovon ein Farbton (Colour 1) der bräunlichen Antikörperfärbung und das zugehörige heraussegmentierte Bild also jeweils nur den positiv angefärbten Regionen entsprach. Schließlich konnte diese positive Area in Pixel*Pixel angezeigt und in Quadratmillimeter umgerechnet werden (Abbildung 11).

Die semiquantitative Bestimmung der gesamten Anzahl der Zellkerne im Sinne inflammatorischer Zellen auf dem jeweiligen Aortenklappenschnitt erfolgte ebenfalls teil-automatisiert mittels des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ und vorgefertigten Makros. Hierbei wurde die lila/bläuliche Segmentierung ausgewählt, da dies am Ehesten der Färbung der Zellkerne durch die Gegenfärbung entsprach. Es entstand ein Bild, auf dem die Zellkerne schwarz markiert waren (Abbildung 12 – 13). Die Zellkerne konnten anschließend automatisiert anhand der erwarteten Größe (20-400 Pixel²) und Zirkularität (0,2-1,00) ausgezählt werden.

```
Colour deconvolution: AB_Staining  
Colour_1 R:0.44119367, G:0.5481938, B:0.7105151  
Colour_2 R:0.56570244, G:0.6405042, B:0.51936036  
Colour_3 R:0.57528955, G:0.5706546, B:0.58599937
```

Abbildung 10: ImageJ Colour Deconvolution.



Abbildung 11: Beispiel semiquantitative Bestimmung der IHC-positiven Fläche.



Abbildung 12: Beispiel der teilautomatisierten Bestimmungen der Zellzahl.



Abbildung 13: Beispiel der teilautomatisierten Bestimmungen der Zellzahl.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des Programms IBM SPSS Statistics 29.0. Es wurden mehrere statistische Tests angewendet. Unter der Annahme, dass die Patientendaten nicht normalverteilt sind, wurde ein Mann-Whitney-U-Test für die kontinuierlichen Variablen verwendet. Hierbei wurden die Gruppen FP-AS und SP-AS verglichen. In der Tabelle 2 wurden der Median und Interquartilabstand der Ergebnisse angegeben. Die kategorischen Variablen wurden mithilfe des Chi-Quadrat-Tests ausgewertet und als absolute Zahlen und Prozentzahlen angegeben. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ gewertet. Außerdem wurden Spearman-Korrelationen durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen Variablen zu untersuchen. Die Grafiken der Ergebnisse wurden mit dem Programm GraphPad Prism 10 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristiken der Patientenpopulation

Tabelle 2: Charakteristiken der Patientenpopulation

Dargestellt ist eine Zusammenfassung der mit SPSS analysierten charakteristischen Werte der Gesamtheit sowie der beiden Subgruppen FP-AS und SP-AS der in dieser Arbeit untersuchten Patienten. Die kategorialen Variablen werden als Anzahl der Einzelwerte (N) und eingeklammert als Prozentzahl (%), die kontinuierlichen Variablen als Median und Interquartilabstand IQR angegeben. Der p-Wert der kategorialen Variablen wurde dem Chi-Quadrat-Test (asymptotische Signifikanz zweiseitig) und der p-Wert der kontinuierlichen Variablen dem Mann-Whitney-U-Test entnommen.

AS – Aortenklappenstenose, ASS – Acetylsalicylsäure, AK – Aortenklappe, AVA – aortic valve area, BMI – body mass index, BPM – beats per minute, CRP – C-reactive protein, EuroSCORE – European System for Cardiac Operative Risk Evaluation, GFR – glomerular filtration rate, Hb – Hämoglobin, HDL – high density lipoprotein, KÖF- Klappenöffnungsfläche, LDL – low density lipoprotein, LV - Linksventrikulär, MDRD – Modification of diet in renal disease, NYHA – New York Heart Association, STS - Society of Thoracic Surgeons. In die Werte der biskupiden Aortenklappe sind sowohl die echte als auch die funktionelle Aortenklappe miteinbezogen.

Parameter	Alle Patienten, N=88	Slow AS, N= 57	Fast AS, N= 31	p- Wert
Klinische Parameter				
Alter in Jahren, N=88	66,85 (58,25-75,75)	67,95 (60,5-76)	64,84 (56-75)	0,221
Geschlecht				0,094
- Männlich	66 (75)	46 (52,3)	20 (22,7)	
- Weiblich	22 (25)	11 (12,5)	11 (12,5)	
BMI (kg/m ²), N=86	27,4 (24,6-30,1)	27,2 (24,5-29,5)	28 (24,5-31,2)	0,263
Systolischer Blutdruck (mmHg), N=86	130,5 (120-140)	130,4 (120-140)	130,7 (119- 140)	0,759
NYHA Klassifikation > 2, N=87	28 (32,2)	18 (20,7)	10 (11,5)	0,763
Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Co-Morbiditäten				
Koronare Herzkrankheit, N=87				0,108
- 1-Gefäß	11 (12,6)	4 (4,6)	7 (8,0)	
- 2-Gefäße	16 (18,4)	13 (14,9)	3 (3,4)	

Ergebnisse

- 3-Gefäße	23 (26,4)	16 (18,4)	7 (8,0)	
Myokardinfarkt, N=87	4 (4,6)	2 (2,3)	2 (2,3)	0,504
Rauchen, N=87	28 (32,2)	21 (24,1)	7 (8,0)	0,203
Hyperlipidämie, N=88	32 (36,4)	23 (26,1)	9 (10,2)	0,292
Positive Familienanamnese, N=87	17 (19,5)	12 (13,8)	5 (5,7)	0,624
Diabetes mellitus, N=88	24 (27,3)	18 (20,5)	6 (6,8)	0,219
Metabolisches Syndrom, N=87	44 (50,6)	30 (34,5)	14(16,1)	0,597
Hypertension, N=87	65 (74,7)	43 (49,4)	22 (25,3)	0,830
Vorhofflimmern, N=87	18 (20,7)	11 (12,6)	7 (8,0)	0,659
Pulmonale Hypertension, N=71	28 (39,4)	19 (26,8)	9 (12,7)	0,310
Echte + Funktionelle bikuspidale AK,	30 (34,5)	19 (21,8)	11 (12,6)	0,700
Euro-Score I, N=86	8,57 (3,2-10,5)	9,8 (3,5-11,3)	6,3 (2,5-8,3)	0,128
Euro-Score II, N=87	2,99 (1,2-3,5)	3,2 (1,2-3,6)	2,6 (1,2-3,4)	0,848
STS-Score, N=87	1,86 (0,94-2,3)	1,95 (1,06-2,36)	1,68 (0,89-2,39)	0,509
Echokardiografische and Elektrokardiografische Parameter				
AS: KÖF (cm ²) nach KG, N=47	0,85 (0,7-1,0)	0,84 (0,7-1,0)	0,87 (0,74-1,0)	0,746
Min. Druckgradient Pmean (mmHg), N=58	39,4 (29-47,3)	40,1 (33-48,8)	38,2 (26,8-45)	0,391
Max. Druckgradient Pmax (mmHg), N=57	66,5 (53-78,5)	67,3 (58-84,5)	65,1 (49,5-78)	0,363
Herzfrequenz (bpm), N=86	77,5 (67,8-83,0)	75,8 (66,3-80)	80,7 (69,5-84)	0,232
Medikation				
Prä-ASS, N=87	44 (50,6)	29 (33,3)	15 (17,2)	0,938
Post-ASS, N=82	74 (90,2)	48 (58,5)	26 (31,7)	0,894
Prä-Antihypertensive Therapie, N=87	69 (79,3)	44 (50,6)	25 (28,7)	0,502

Ergebnisse

Post-Antihypertensive Therapie, N=82	79 (96,3)	50 (61)	29 (35,4)	0,192
Prä-Aldosteron Inhibition, N=87	9 (10,3)	3 (3,4)	6 (6,9)	0,032
Post-Aldosteron Inhibition, N=82	12 (14,6)	8 (9,8)	4 (4,9)	0,873
Prä-Diuretika, N=87	27 (31,0)	16 (18,4)	11 (12,6)	0,410
Post-Diuretika, N=82	65 (79,3)	41 (50)	24 (29,3)	0,564
Prä-Beta-Blocker, N=87	39 (44,8)	25 (28,7)	14 (16,1)	0,802
Post-Beta-Blocker, N=82	70 (85,4)	43 (52,4)	27 (32,9)	0,143
Prä-Statine, N=87	50 (57,5)	35 (40,2)	15 (17,2)	0,306
Post-Statine, N=82	61 (74,4)	41 (50)	20 (24,4)	0,405
Laborparameter and Biomarker				
Hb (g/dL), N=87	13,5 (12,2-14,7)	13,7 (12,6-14,8)	13,1 (11,5-14,6)	0,188
Leukozyten (1000/ μ L), N=87	7791 (5560-8700)	7218 (5690-8705)	8879 (5468-8850)	0,685
Thrombozyten ($10^3/\mu$ L), N=87	210 (176-241)	208 (166-242)	215 (181-241)	0,589
GFR-MDRD (ml/m ²), N=87	80,3 (64,9-97,0)	82,5 (61,7-99,2)	76,0 (66,9-83,2)	0,127
CRP (mg/dL), N=86	0,57 (0,04-0,55)	0,51 (0,04-0,65)	0,69 (0,04-0,39)	0,667
Serum Kreatinin (mg/dL), N=87	1,06 (0,8-1,1)	1,1 (0,7-1,1)	0,94 (0,8-1,0)	0,535
Triglyceride (mg/dL), N=60	165 (83-235)	170,2 (84-241)	156,6 (79-228)	0,638
Gesamtcholesterin (mg/dL), N=61	202 (160-231)	193 (158-214)	221 (166-243)	0,012
LDL (mg/dL), N=57	129 (91-159)	121 (84-136)	145 (107-177)	0,009
HDL (mg/dL), N=61	54 (39-65)	51 (39-58)	59 (41-76)	0,207

Patienten mit einer FP-AS waren tendenziell, jedoch nicht signifikant, jünger [FP-AS Median 64,84 IQR (56-75) zu SP-AS Median 67,95, IQR (60,5-76), $p = 0,221$]. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben sich bei dem Vergleich der Blutwerte des Gesamtcholesterins und des LDL, wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Darüber hinaus ließen sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Laborparameter, der Medikation, der klinischen und echokardiografischen Parameter sowie der Risikofaktoren und Komorbiditäten zeigen.

3.2 Höherer Plasmaspiegel von LDL- und Gesamtcholesterin bei Patienten mit FP-AS

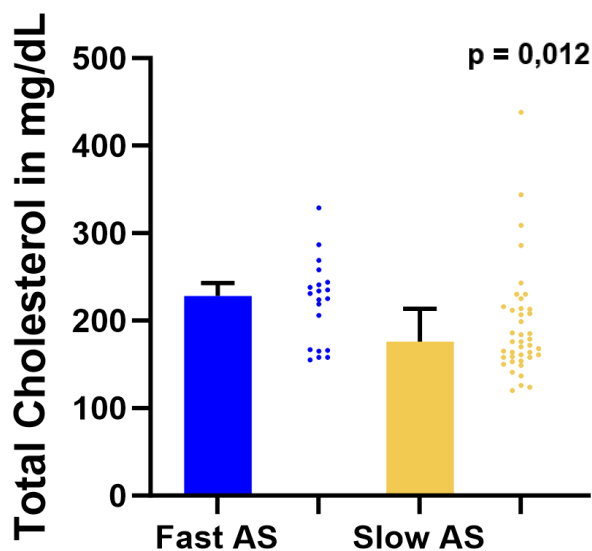


Abbildung 14: Vergleich des Gesamtcholesterins im Blut in mg/dL bei FP-AS und SP-AS.

Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

FP-AS = Fast-progressive aortic valve stenosis, SP-AS = Slow progressive aortic valve stenosis.

Das Gesamtcholesterin lag bei 61 der 88 Patienten vor, von denen 20 Patienten der Subgruppe der FP-AS und 41 Patienten der Subgruppe der SP-AS zugeordnet waren. In Abbildung 14 zu sehen sind jeweils ein Balkendiagramm des Medians mit Interquartilabstand inklusive Error Bar und ein Streudiagramm. Zwischen

den beiden Subgruppen zeigte sich ein signifikant erhöhtes Gesamtcholesterin der Patienten mit FP-AS ($p=0,012$). Der Median betrug für die Gesamtzahl der Patienten 202 mg/dL mit einem Interquartilabstand von 160-231 mg/dL. Der Median der Subgruppe SP-AS betrug 193 mg/dL mit einer IQR von 158-214 mg/dL. Der Median der Subgruppe FP-AS betrug 221 mg/dL mit einer IQR von 166-243 mg/dL. Die Werte sind in der Tabelle 2 in Kapitel 3.1 zusammengefasst.

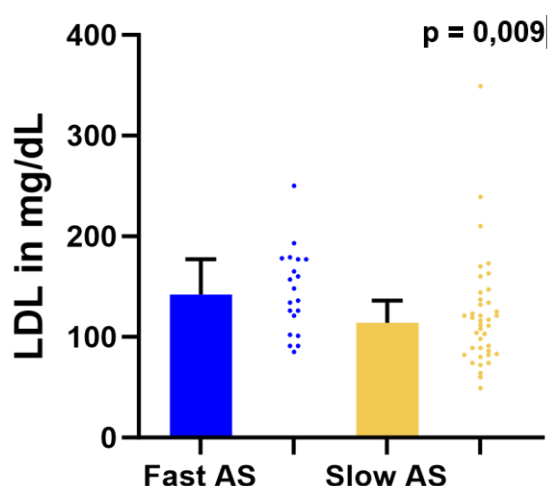


Abbildung 15: Vergleich von LDL im Blut in mg/dL bei FP-AS und SP-AS.

Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

FP-AS = Fast-progressive aortic valve stenosis, SP-AS = Slow progressive aortic valve stenosis.

Das LDL lag bei 57 der 88 Patienten vor, von denen 17 Patienten der Subgruppe der FP-AS und 40 Patienten der Subgruppe der SP-AS zugeordnet waren. In Abbildung 15 zu sehen sind jeweils ein Balkendiagramm des Medians mit Interquartilabstand inklusive Error Bar und ein Streudiagramm. Zwischen den beiden Subgruppen zeigte sich ein signifikant erhöhtes LDL der Patienten mit FP-AS ($p=0,009$). Der Median betrug für die Gesamtzahl der Patienten 129 mg/dL mit einem Interquartilabstand von 91-159 mg/dL. Der Median der Subgruppe SP-AS betrug 121 mg/dL mit einer IQR von 84-136 mg/dL. Der Median der Subgruppe FP-AS betrug 145 mg/dL mit einer IQR von 107-177 mg/dL. Die Werte sind in der Tabelle 2 in Kapitel 3.1 zusammengefasst.

3.3 Immunhistochemie Ergebnisse

Tabelle 3: Statistik-Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen.

Angegeben sind der Median und eingeklammert der Interquartilabstand. Der p-Wert wurde dem Mann-Whitney-U-Test entnommen (asymptotische Signifikanz, zweiseitiger Test).

Parameter	Alle Patienten, N=88	Fast AS, N= 31	Slow AS, N= 57	p-Wert
Zellkerne gesamt	15089 (7986-19250)	15401 (7924-18443)	14919 (8082-19779)	0,983
Zellkerne pro mm ²	1781 (1004-2293)	1611 (960-2030)	1874 (1042-2332)	0,301
Gesamte Klappenfläche in mm ² (CypA)	9,60 (5,39-12,19)	10,35 (5,4-11,7)	9,19 (5,31-12,76)	0,307
Gesamte Klappenfläche in mm ² (RAGE)	9,28 (5,21-11,22)	10,06 (5,56-11,15)	8,86 (5,06-11,59)	0,332
Gesamte Klappenfläche in mm ² (CD147)	9,39 (5,5-11,99)	10,16 (6,2-12,2)	8,97 (5,21-11,81)	0,277
CypA+ Fläche gesamt in mm ²	1,06 (0,36-1,57)	0,72 (0,29-0,97)	1,24 (0,43-1,76)	0,021
CypA+ in mm ² / mm ² Fläche	0,11 (0,05-0,16)	0,06 (0,03-0,09)	0,13 (0,07-0,18)	< 0,001
CypA+ in % der Gesamtfläche	10,99 (5,29-15,87)	6,58 (3,36-8,60)	13,39 (6,74-18,33)	0,000
RAGE+ Fläche gesamt in mm ²	0,27 (0,02-0,36)	0,26 (0,01-0,47)	0,28 (0,02-0,34)	0,671
RAGE+ in mm ² / mm ² Fläche	0,028 (0,0-0,04)	0,025 (0,0-0,03)	0,03 (0,0-0,04)	0,503
RAGE+ in % der Gesamtfläche	2,74 (0,31-3,84)	2,48 (0,13-3,06)	2,88 (0,39-3,95)	0,417
CD147+ Fläche gesamt in mm ²	0,52 (0,04-0,53)	0,53 (0,05-0,52)	0,52 (0,04-0,54)	0,969
CD147+ in mm ² / mm ² Fläche	0,05 (0,0-0,07)	0,049 (0,0-0,07)	0,053 (0,0-0,09)	0,627
CD147+ in % der Gesamtfläche	5,20 (0,46-7,06)	4,94 (0,42-6,63)	5,34 (0,47-8,31)	0,760



*Abbildung 16: Beispiel einer immunhistologischen Färbung mit CypA.
Mikroskopie-Übersichtsbild der Aortenklappe K54.*



*Abbildung 17: Beispiel einer immunhistologischen Färbung mit CD147.
Mikroskopie-Übersichtsbild der Aortenklappe K54.*



Abbildung 18: Beispiel einer immunhistologischen Färbung mit RAGE.

Mikroskopie-Übersichtsbild der Aortenklappe K54.

3.4 Signifikante Erhöhung der Expression von CypA bei der SP-AS im Vergleich zur FP-AS

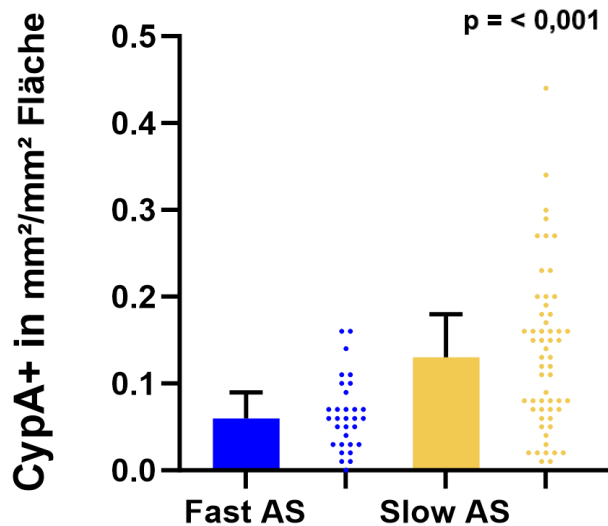


Abbildung 19: Vergleich der CypA-positiven Fläche in mm^2 pro Gesamtklappenschnittfläche in mm^2 bei FP-AS und SP-AS.

Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

FP-AS = Fast-progressive aortic valve stenosis, SP-AS= Slow progressive aortic stenosis.

Ausgewertet wurden die immunhistochemischen Färbungen der 88 Patienten, von denen 31 Patienten der Subgruppe FP-AS und 57 Patienten der Subgruppe SP-AS zugeordnet waren. In der Abbildung 19 dargestellt ist die Cyclophilin A positiv gefärbte Fläche in mm^2 pro mm^2 Gesamtfläche des jeweiligen Aortenklappenschnitts, unterteilt in die beiden Subgruppen FP-AS und SP-AS. Zu sehen sind jeweils ein Balkendiagramm des Medians mit Interquartilabstand inklusive Error Bar und ein Streudiagramm. Zwischen den beiden Subgruppen ergab sich eine deutliche Signifikanz ($p = < 0,001$) der Cyclophilin A positiv gefärbten Fläche. Der Median betrug für die Gesamtzahl der 88 Patienten 0,11 mit einem Interquartilabstand von 0,05-0,16. Der Median der Subgruppe FP-AS betrug 0,06 mit einem IQR von 0,03-0,09. Der Median der Subgruppe SP-AS betrug 0,13 mit einem IQR von 0,07-0,18. Die Werte sind in der Tabelle 3 in Kapitel 3.2 zusammengefasst.

3.5 Keine signifikante Erhöhung der Expression von RAGE im Vergleich der beiden Subgruppen

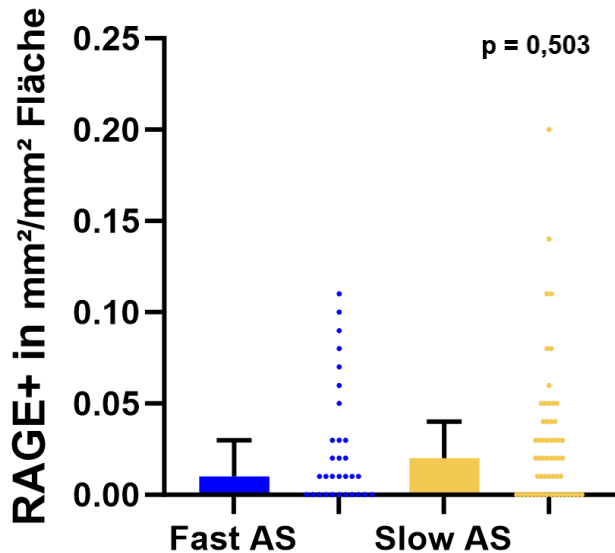


Abbildung 20: Vergleich der RAGE-positiven Fläche in mm² pro Gesamtklappenschnittfläche in mm² bei FP-AS und SP-AS.

Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

FP-AS = Fast-progressive aortic valve stenosis, SP-AS= Slow progressive aortic stenosis.

Ausgewertet wurden die immunhistochemischen Färbungen der 88 Patienten, von denen 31 Patienten der Subgruppe FP-AS und 57 Patienten der Subgruppe SP-AS zugeordnet waren. In der Abbildung 20 dargestellt ist die RAGE positiv gefärbte Fläche in mm² pro mm² Gesamtfläche des jeweiligen Aortenklappenschnitts, unterteilt in die beiden Subgruppen FP-AS und SP-AS. Zu sehen sind jeweils ein Balkendiagramm des Medians mit Interquartilabstand inklusive Error Bar und ein Streudiagramm. Zwischen den beiden Subgruppen ergab sich keine Signifikanz ($p = 0,503$) der RAGE positiv gefärbten Fläche. Der Median betrug für die Gesamtzahl der 88 Patienten 0,028 mit einem Interquartilabstand von 0,0-0,04. Der Median der Subgruppe FP-AS betrug 0,025 mit einem IQR von 0,0-0,03. Der Median der Subgruppe SP-AS betrug 0,03 mit einem IQR von 0,0-0,04. Die Werte sind in der Tabelle 3 in Kapitel 3.2 zusammengefasst

3.6 Keine signifikante Erhöhung der Expression von CD174 im Vergleich der beiden Subgruppen

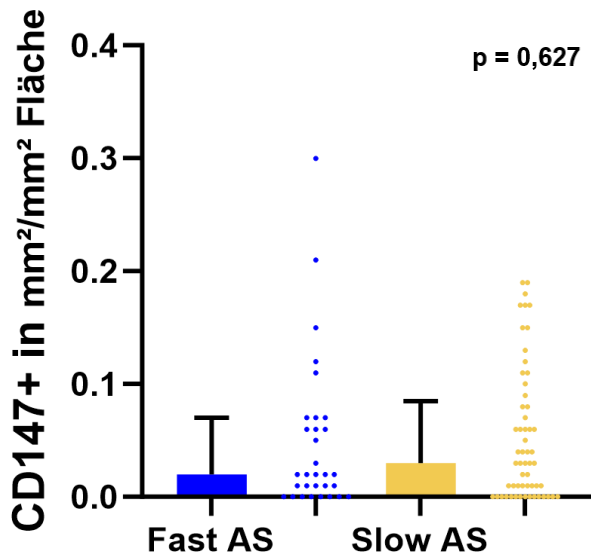


Abbildung 21: Vergleich der CD147-positiven Fläche in mm² pro Gesamtklappenschnittfläche in mm² bei FP-AS und SP-AS.

Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

FP-AS = Fast-progressive aortic valve stenosis, SP-AS= Slow progressive aortic stenosis.

Ausgewertet wurden die immunhistochemischen Färbungen der 88 Patienten, von denen 31 Patienten der Subgruppe FP-AS und 57 Patienten der Subgruppe SP-AS zugeordnet waren. In der Abbildung 21 dargestellt ist die CD147 positiv gefärbte Fläche in mm² pro mm² Gesamtfläche des jeweiligen Aortenklappenschnitts, unterteilt in die beiden Subgruppen FP-AS und SP-AS. Zu sehen sind jeweils ein Balkendiagramm des Medians mit Interquartilabstand inklusive Error Bar und ein Streudiagramm. Zwischen den beiden Subgruppen ergab sich keine Signifikanz ($p = 0,627$) der CD147/ EMMPRIN positiv gefärbten Fläche. Der Median betrug für die Gesamtzahl der 88 Patienten 0,05 mit einem Interquartilabstand von 0,0-0,07. Der Median der Subgruppe FP-AS betrug 0,49 mit einem IQR von 0,0-0,07. Der Median der Subgruppe SP-AS betrug 0,05 mit einem IQR von 0,0-0,09. Die Werte sind in der Tabelle 3 in Kapitel 3.2 zusammengefasst.

3.7 Co-Lokalisation von CypA, RAGE und EMMPRIN

Obwohl es in den immunhistochemischen Färbungen keinen signifikanten Unterschied der EMMPRIN und RAGE positiven Färbungen zwischen den beiden Subgruppen gab, lässt sich in den mikroskopischen Bildern eine Co-Lokalisation dieser Färbungen mit den CypA positiv gefärbten Bereichen zeigen (Abbildung 22-24).

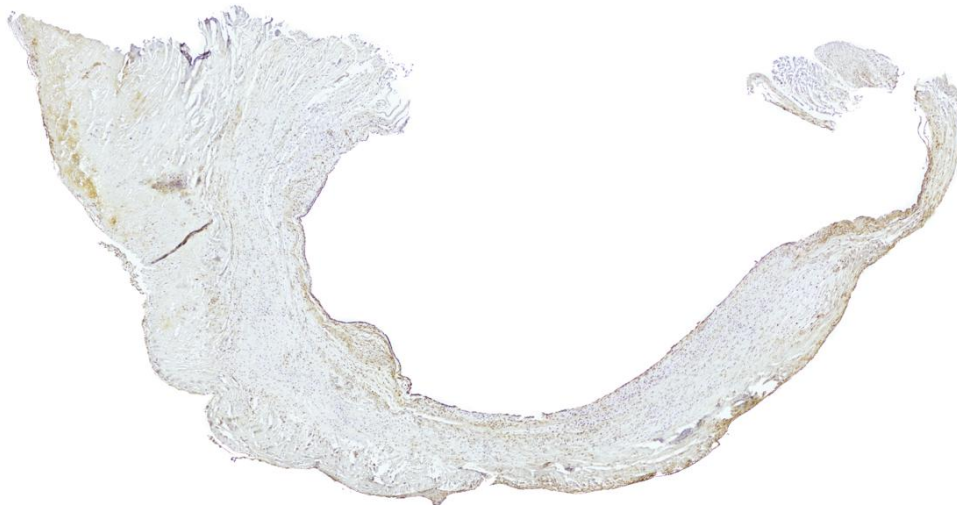


Abbildung 22: Beispiel Immunhistochemische Färbung von CypA.

Mikroskopie-Übersichtsbild der Aortenklappe K188.



*Abbildung 23: Beispiel Immunhistochemische Färbung von RAGE.
Mikroskopie-Übersichtsbild der Aortenklappe K188.*



*Abbildung 24: Beispiel Immunhistochemische Färbung von CD147.
Mikroskopie-Übersichtsbild der Aortenklappe K188.*

3.8 Kein signifikanter Unterschied der Zellzahl bei FP-AS und SP-AS

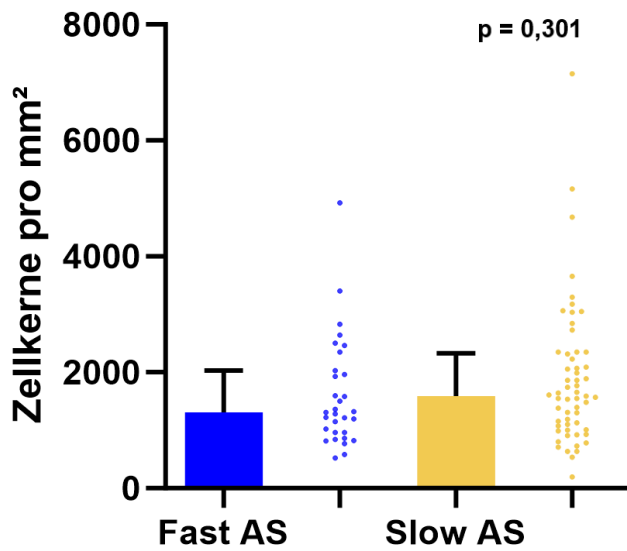


Abbildung 25: Vergleich der Anzahl der Zellkerne pro mm² Gesamtklappenschnittfläche bei FP-AS und SP-AS.

Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

FP-AS = Fast-progressive aortic valve stenosis, SP-AS= Slow progressive aortic stenosis.

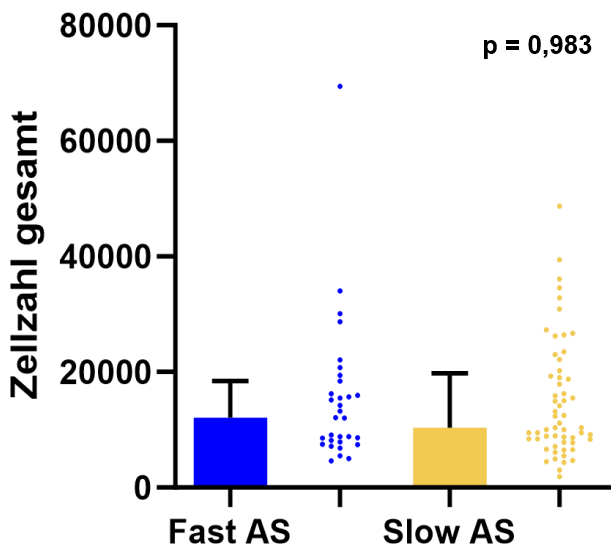


Abbildung 26: Vergleich der gesamten Anzahl der Zellkerne auf der Gesamtklappenschnittfläche bei FP-AS und SP-AS.

Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

FP-AS = Fast-progressive aortic valve stenosis, SP-AS= Slow progressive aortic stenosis.

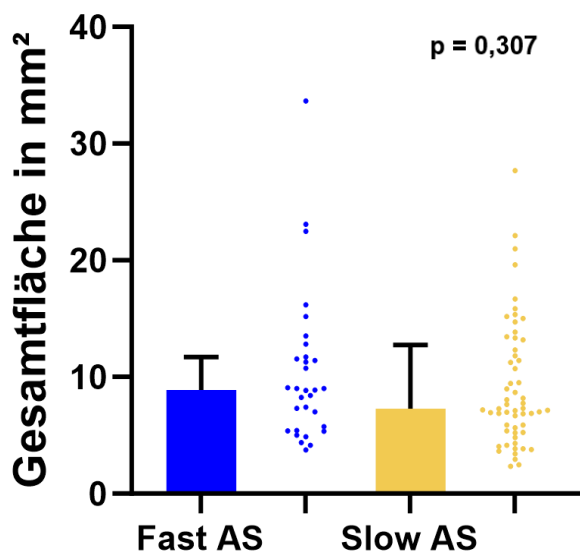


Abbildung 27: Vergleich der gesamten Schnittfläche der Aortenklappen in mm² bei FP-AS und SP-AS

Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

FP-AS = Fast-progressive aortic valve stenosis, SP-AS= Slow progressive aortic stenosis.

Ausgewertet wurden die immunhistochemischen Färbungen der 88 Patienten, von denen 31 Patienten der Subgruppe FP-AS und 57 Patienten der Subgruppe SP-AS zugeordnet waren. In der Abbildung 25 dargestellt ist die Zahl der Zellkerne pro mm² Gesamtfläche des Klappenschnittes, unterteilt in die beiden Subgruppen FP-AS und SP-AS. In der Abbildung 26 dargestellt ist die Gesamtzahl der Zellkerne des jeweiligen Aortenklappenschnitts, unterteilt in die beiden Subgruppen. In der Abbildung 27 dargestellt ist die Gesamtfläche der Aortenklappenschnitte beider Subgruppen. Zu sehen sind jeweils ein Balkendiagramm des Medians mit Interquartilabstand inklusive Error Bar und ein Streudiagramm.

In Abbildung 25 zeigt sich zwischen den beiden Subgruppen eine erhöhte Zahl der Zellkerne pro mm² der jeweiligen Klappenfläche der Patienten mit SP-AS, jedoch ohne signifikante Unterschiede ($p = 0,301$). Der Median betrug für die Gesamtzahl der 88 Patienten 1781 mit einem Interquartilabstand von 1004-2293. Der Median der Subgruppe FP-AS betrug 1611 mit einer IQR von 960-2030. Der

Median der Subgruppe SP-AS betrug 1874 mit einer IQR von 1042-2332. In Abbildung 26 zeigte sich zwischen den beiden Subgruppen eine leicht erhöhte Gesamtzahl der Zellkerne der Patienten mit FP-AS, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant ($p = 0,983$). Der Median betrug für die Gesamtzahl der 88 Patienten 15089 mit einem Interquartilabstand von 7986-19250. Der Median der Subgruppe FP-AS betrug 15401 mit einer IQR von 7924-18443. Der Median der Subgruppe SP-AS betrug 14919 mit einer IQR von 8082-19779. In Abbildung 27 zu sehen ist jedoch eine größere Klappenschnittfläche in der Subgruppe FP-AS im Vergleich zur SP-AS, ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,307$). Der Median betrug für die Gesamtzahl der Patienten 9,6 mit einer IQR von 5,39-12,19. Der Median der Subgruppe FP-AS betrug 10,35 mit einem IQR von 5,4-11,7. Der Median der Subgruppe SP-AS betrug 9,19 mit einem IQR von 5,31-12,76. Die Werte sind in der Tabelle 3 in Kapitel 3.2 zusammengefasst.

3.9 Zusammenhang von Blutfetten und CypA-Expression

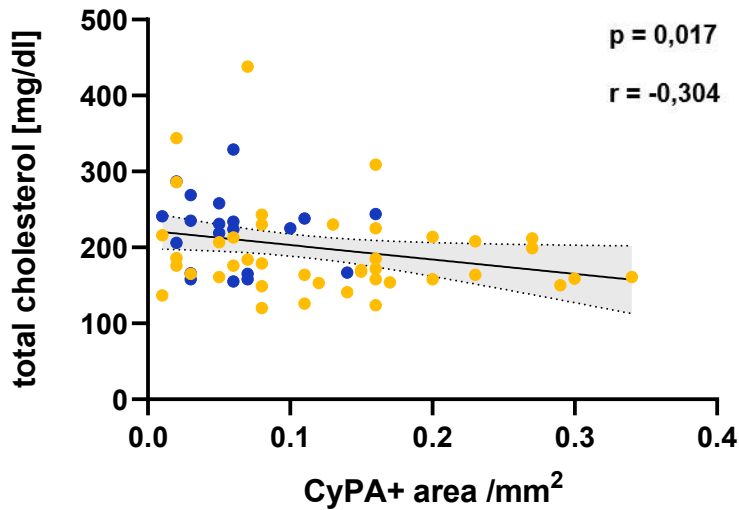


Abbildung 28: Korrelation von dem Gesamtcholesterin im Blut mit der CypA-Expression auf der Aortenklappe in den immunhistochemischen Färbungen.

Blau = FP-AS, Gelb = SP-AS. Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

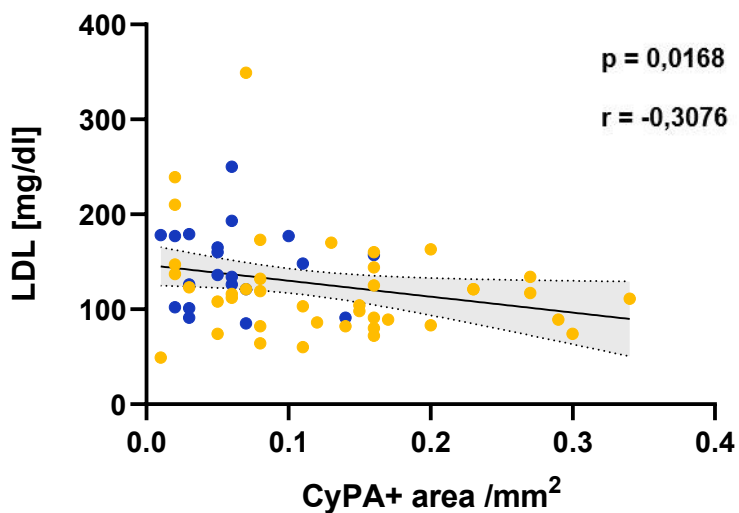


Abbildung 29: Korrelation von LDL im Blut mit der CypA-Expression auf der Aortenklappe in den immunhistochemischen Färbungen.

Blau = FP-AS, Gelb = SP-AS. Die Grafik wurde erstellt mit GraphPad Prism 10.

Wie in Kapitel 3.8 beschrieben, lagen für das LDL die Werte von 60 Patienten, für das Gesamtcholesterin von 61 Patienten vor. Es zeigten sich in den Korrelationsanalysen nach Spearman signifikante Zusammenhänge zwischen den im peripheren Blut gemessenen LDL-Werten und der CypA-Expression (in mm² gefärbter Fläche pro mm² Klappenfläche) auf der Aortenklappe ($p = 0,0168$) mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,3076$, sowie zwischen dem Gesamtcholesterin im peripheren Blut und der CypA-Expression (in mm² gefärbter Fläche pro mm² Klappenfläche) auf der Aortenklappe ($p = 0,017$) mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,304$. Es ergab sich somit jeweils eine gering negative Korrelation. So fanden sich bei Patienten mit höheren CypA-Werten in der IHC der Aortenklappen niedrigere Blutwerte für das Gesamtcholesterin und für das LDL als bei niedrigeren CypA-Werten in der IHC. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 28 und Abbildung 29 graphisch dargestellt.

3.10 Kein Nachweis weiterer Zusammenhänge zwischen Antikörper-Expression und klinischen Parametern oder der Zellzahl

In den Korrelationsanalysen ergab sich kein Zusammenhang zwischen Zellzahl und Exprimierung von CypA, EMMPRIN oder RAGE. Es ergab sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen den erfassten klinischen Parametern, z.B. Blutwerte, und der Exprimierung von RAGE oder EMMPRIN. Außerdem ließ sich zwischen CypA und allen anderen erfassten Parametern, außer des Gesamtcholesterin und LDL, ebenfalls kein Zusammenhang feststellen.

4. Diskussion

Die Pathologie der Aortenklappenstenose ist bis dato nicht vollständig verstanden. Für eine Erweiterung des Verständnisses teilten wir die Patienten mit Aortenklappenstenose in eine Gruppe mit einer schnelleren Progredienz und eine Gruppe mit einer langsameren Progredienz dieser Erkrankung ein und konnten erstmals eine signifikante Erhöhung des lokalen CypA-Wertes im Aortenklappengewebe bei der langsamer progredienten Aortenklappenstenose im Vergleich zur schneller progredienten Aortenklappenstenose in den immunhistochemischen Untersuchungen nachweisen. Bei den laborchemischen Risikofaktoren LDL und Gesamt-Cholesterin konnte eine signifikante Erhöhung in der Gruppe der schneller progredienten Aortenklappenstenose nachgewiesen werden, sodass sich eine negative Korrelation der lokalen CypA-Konzentration mit den systemischen Blutfetten ergab.

4.1 Erhöhte CypA-Expression bei SP-AS im Vergleich zur FP-AS

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie zeigen eine signifikante Rolle von Cyclophilin A in der Pathophysiologie der Aortenklappenstenose, insbesondere im Kontext der Kalzifizierung der Aortenklappen. Ähnliche Untersuchungen betonen ebenfalls die Bedeutung von CyPA in der Entwicklung und Progression der Aortenklappenstenose. Beispielsweise haben Perrucci et al. (2020) bereits gezeigt, dass CyPA in explantierten Aortenklappen von Patienten mit Aortenklappenstenose vermehrt nachweisbar ist. Unsere Ergebnisse erweitern dieses Wissen, indem sie die Unterschiede in der CyPA-Expression zwischen verschiedenen Formen der AS, nämlich der langsam progredienten AS (SP-AS) und der schnell progredienten AS (FP-AS), beleuchten. Unsere Arbeitsgruppe definierte zu Beginn der Studie diese zwei Unterformen der Aortenklappenstenose. Die FP-AS wurde charakterisiert durch eine schnellere Verschlechterung der Aortenklappenstenose über einen bestimmten Zeitraum, genauer gesagt eine beschleunigte Veränderung der maximalen transvalvulären Geschwindigkeit über der

Aortenklappe ($\Delta V_{\max} \geq 0,45$ m/s pro Jahr) und eine kürzere durchschnittliche Symptombdauer. Im Schnitt waren diese Patienten jünger und wiesen in den von-Kossa Färbungen unserer Arbeitsgruppe signifikant geringere Verkalkungen ihrer Aortenklappen auf, jedoch zeigten sie eine stärkere Entzündungsreaktion mit einer Immuzellinfiltration in das Klappengewebe (Mueller et al., 2024). Die SP-AS dagegen wurde charakterisiert durch eine langsamere Verschlechterung der Aortenklappenstenose, also eine Veränderung der maximalen transvalvulären Geschwindigkeit unter 0,45 m/s pro Jahr sowie eine längere Symptombdauer. Bei diesen Patienten verkalkte die Aortenklappe signifikant stärker in den von-Kossa Färbungen, wies aber eine geringere Entzündung in Form von Immuzellinfiltration auf (Mueller et al., 2024). Diese Ergebnisse decken sich mit den pathophysiologischen Mechanismen, die CyPA in den Vordergrund rücken. Eine Erklärung für die unterschiedliche Verteilung und Anreicherung von CyPA in den beiden Patientengruppen könnte in der zeitlichen Dynamik der Krankheitsprogression liegen. CyPA spielt eine zentrale Rolle als Entzündungsmediator sowie bei den Kalzifizierungsprozessen der Aortenklappe. Diese Prozesse können bei SP-AS über einen längeren Zeitraum stattfinden und somit eine verstärkte Akkumulation von CyPA im Klappengewebe mit seinen weiter pro-kalzifizierenden Effekten ermöglichen. Die Studie von Perrucci et al. (2020) unterstützt diese Hypothese, indem sie zeigt, dass CyPA eine wesentliche Rolle bei der Induktion von Kalziumablagerungen spielt und dass eine Hemmung von CyPA die Kalzifikation signifikant reduzieren kann. Außerdem ist bekannt, dass Zellen in Apoptose hohe Mengen an intrazellulärem CypA ausschütten, dies könnte ebenfalls bei atherosklerotischen Plaques der Fall sein. An Prädilektionsstelle zur Plaqueruptur, der Schulterregion der fibrösen Kappe, konnte eine erhöhte Menge von CypA und EMMPRIN festgestellt werden (Borst, 2010). Ebenfalls bei anderen entzündlichen Erkrankungen wie einer schweren Sepsis oder rheumatoider Arthritis konnte in der Vergangenheit eine Erhöhung des CypA-Spiegels nachgewiesen werden. (Billich et al., 1997, Tegeder et al., 1997). Bei der rheumatoiden Arthritis konnte sogar eine Korrelation der Höhe des lokalen Cyclophilinspiegels in der Synovialflüssigkeit mit dem Schweregrad der Erkrankung hergestellt werden (Billich et al., 1997). In Bezug auf die Aortenklappenstenose könnte dies auf der

gleichen Pathophysiologie beruhen, sodass die SP-AS ein späteres Krankheitsstadium mit einem höherem Schweregrad repräsentieren könnte. Denkbar ist auch, dass es Unterschiede des CypA-Blutplasmaspiegel zwischen den beiden Subgruppen gibt. Andere Studien zeigten bereits Zusammenhänge des Schweregrades der KHK und dem CypA-Plasmaspiegel (Manaswini et al., 2022, Ohtsuki et al., 2017, Satoh et al., 2013), wobei auch Unterschiede der Menge von thrombozytengebundenem CypA (Tz-CypA) und freiem CypA bei KHK nachweisbar sind (Fuchs, 2023). Die FP-AS könnte also ein früheres Krankheitsstadium repräsentieren, in dem eine erhöhte Anzahl von Immunzellen und eine systemische Entzündungsreaktion dominieren, wobei CyPA überwiegend im Blutplasma vorhanden sein und als proinflammatorischer Mediator agieren könnte. Bei der SP-AS hingegen, die als ein späteres Stadium der Krankheit angesehen werden könnte, könnte die erhöhte CyPA-Expression auf der Klappe das Ergebnis einer verstärkten Kalzifikation und Nekrose sein, welche zur weiteren Freisetzung von intrazellulärem CyPA lokal auf der Aortenklappe führt. In den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte außerdem bei den Patienten mit FP-AS eine signifikante Erhöhung der Expression des proinflammatorischen T-Zell-Zytokin MIF (Makrophagen-Migrationsinhibitionsfaktor) im Blutplasma sowie auf zirkulierenden Monozyten und Thrombozyten festgestellt werden, welche den vorherrschenden Aspekt der systemischen Entzündung im Vergleich zur SP-AS unterstreicht. (Mueller et al., 2024)

4.2 (Co-) Lokalisation von CypA, EMMPRIN und RAGE

In unseren immunhistochemischen Färbungen waren EMMPRIN und RAGE in den Aortenklappen der Patienten mit SP-AS im Vergleich zu den Patienten mit FP-AS tendenziell verstärkt nachweisbar, jedoch nicht signifikant. Beim Vergleich der mikroskopischen Bilder der immunhistochemischen Färbungen fällt eine Co-Lokalisation von CyPA, EMMPRIN und RAGE auf, welche bereits in einer Reihe anderer Studien gezeigt werden konnte. Beispielsweise zeigten die Untersuchungen von Borst (2010) eine ähnlich starke Expression von CypA und EMMPRIN in

atherosklerotischen Plaques von Aortenbögen Apolipoprotein E (ApoE)-defizienter Mäuse, welche in nicht-atherosklerotischen Aortenwänden der Wildtyp Mäuse nicht signifikant höher exprimiert waren. Dies unterstützt auch den möglichen Zusammenhang von CypA und EMMPRIN in Bezug auf Plaquerupturen durch freiwerdende Metalloproteinasen. (Borst, 2010) Ein Zusammenhang von CypA und EMMPRIN wird ebenfalls gezeigt in den Untersuchungen von Yang et al. (2008), in denen MMP-9 bei rheumatoider Arthritis durch eine direkte Bindung von CypA an EMMPRIN bei Monozyten und Makrophagen freigesetzt wurde, sowie in den Untersuchungen von Seizer et al. (2010a), in denen eine Bindung von CypA und EMMPRIN zu einer Regulation von MMP-9, MT1-MMP und M-CSF während der Schaumzellbildung führte. Ein Zusammenhang von CypA und RAGE war ebenfalls bereits Bestandteil anderer Untersuchungen. So zeigten Seizer et al. (2024), dass durch ein Fehlen oder ein Blockieren von RAGE die CypA-abhängige intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung, Bildung von Koaggregaten und Thrombozytenaktivierung aufgehoben wurden. Die CypA-abhängige Leukozytenadhäsion und Chemotaxis war in vitro und in vivo ebenfalls von RAGE abhängig und die Menge an CypA regulierte die in vivo Expression von RAGE. Auf Monozyten konnte außerdem ein ähnliches Verteilungsmuster der Rezeptoren RAGE und EMMPRIN gezeigt werden. (Seizer et al., 2024)

4.3 Höhere Blutserumspiegel von LDL und Gesamtcholesterin bei FP-AS

Der Zusammenhang von Hyperlipidämie und Aortenklappensklerose ist bekannt (Pohle et al., 2001, Rossebø and Pedersen, 2004, Stewart et al., 1997, Filip et al., 1987). Die Studie von Ten Kate et al. (2015) untersuchte die Prävalenz der Aortenklappensklerose bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie und konnte zeigen, dass sowohl bei Patienten mit homozygoter als auch heterozygoter familiärer Hypercholesterinämie ein erhöhtes Risiko besteht, an einer Aortenklappensklerose zu erkranken. In anderen Studien konnte ebenfalls bereits ein Zusammenhang zwischen einem hohen Cholesteringehalt im Blut mit einem schnelleren Progress der Aortenklappenstenose hergestellt werden. So hatten in

den Untersuchungen von Yilmaz et al. (2004) Patienten mit einer schneller progressierten Aortenklappenstenose ebenfalls einen höheren Spiegel Gesamtcholesterin im Blut und in den Untersuchungen von Seo et al. (2023) einen höheren LDL-Spiegel. Die Ergebnisse unserer Studie decken sich mit diesen Ergebnissen. Erklären lässt sich die schnellere Progression der Aortenklappenstenose bei Patienten mit höheren Blutfetten unter anderem dadurch, dass es zu einer vermehrten Ablagerung von Cholesterin in der Aortenklappe kommt, welche wiederum eine Entzündungsreaktion auslöst, bei der Immunzellen wie Makrophagen das Klappengewebe infiltrieren und unter Aufnahme von oxLDL zu Schaumzellen werden. Die Erkenntnisse lassen vermuten, dass Statine einen positiven Effekt auf das Fortschreiten der Aortenklappensklerose haben müssten. Die Studienlage ist zu diesbezüglich jedoch inkonsistent. Die Studien von Bellamy et al. (2002), Novaro et al. (2001) und Rosenhek et al. (2004) liefern Hinweise darauf, dass ein Fortschreiten der Aortenklappenstenose durch Statine verhindert werden könnte, andere Studien zeigten jedoch keinen relevanten Nutzen einer lipidsenkenden Therapie (Chan et al., 2010, Cowell et al., 2005).

4.4 Negative Korrelation von CypA auf der Aortenklappe und LDL sowie Gesamtcholesterin im Blutplasma

Wie in 4.1 und 4.3. beschrieben, ergaben unsere Untersuchungen eine signifikant höhere CypA-Expression lokal auf der Aortenklappe bei Patienten mit SP-AS im Vergleich zu Patienten mit FP-AS, wobei die Blutplasmawerte von LDL und Gesamtcholesterin bei den Patienten mit FP-AS im Vergleich zur SP-AS signifikant erhöht waren. In der Korrelationsanalyse nach Spearman ergab sich eine geringe negative Korrelation zwischen dem CypA lokal auf der Aortenklappe und dem LDL und Gesamtcholesterin im Blut. Dies unterstützt die Hypothese, dass die FP-AS im Vergleich zur SP-AS möglicherweise ein früheres Krankheitsstadium repräsentieren könnte. LDL ist bekanntermaßen stark atherogen wirksam (Borén et al., 2020) und treibt in der früheren Phase den Prozess der Plaquebildung an. Dazu passen die höheren LDL-Werten im Blutplasma der Patienten mit

FP-AS im Vergleich zur SP-AS in unseren Untersuchungen. Bei Patienten mit fortgeschritteneren Stadien im Krankheitsprozess der Aortenklappenstenose, wie es mutmaßlich bei der SP-AS der Fall ist, könnten mehrere Mechanismen der Grund eines vergleichsweise niedrigeren Spiegels an LDL und Gesamtcholesterin im Blut sein. Diese Patienten könnten bereits an einer weiter fortgeschrittenen Herzinsuffizienz leiden und dadurch bedingt einen höheren Energieverbrauch haben, was zu einer Senkung der Blutfette führen könnte. Es ist bekannt, dass Patienten mit Herzinsuffizienz in fortgeschritteneren Stadien häufig eine Kachexie entwickeln (Anker et al., 1997), unter anderem aber auch durch eine verringerte Nahrungsaufnahme (Kryzstofiak et al., 2020, Wernio et al., 2018). Des Weiteren kann ein Fortschreiten der Herzinsuffizienz zu einer Stauung der Leber führen und die physiologischen Funktionen der Leber beeinträchtigen, beispielsweise den Lipidstoffwechsel betreffend, sodass es ebenfalls zu einer Senkung der Blutfette kommt (Aspromonte et al., 2023). Andere Studien konnten ebenfalls eine Hypocholesterinämie bei Patienten mit weiter fortgeschrittener Herzinsuffizienz nachweisen (Lavie et al., 2014, Gouveia et al., 2023). In unseren Untersuchungen gab es passend hierzu tendenziell mehr Patienten mit einer höheren NYHA-Klassifikation in der Subgruppe der SP-AS im Vergleich zur FP-AS, allerdings nicht signifikant und beeinflusst durch starke Unterschiede der Gruppengrößen. Ein weiterer wichtiger Faktor mit Einfluss auf die Blutfette wird außerdem die Therapie mit Statinen sein, die möglicherweise Unterschiede in beispielsweise der Dauer der Einnahme zwischen den Subgruppen aufweisen könnte. In der Vergangenheit konnte außerdem bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass Entzündungen ebenfalls den Plasmalipidspiegel beeinflussen können, hierbei kommt es insbesondere zu einer Senkung des LDL-Spiegels. Bei der Genesung können sich die Lipide wieder normalisieren (Feingold and Grunfeld, 2000), dies könnte möglicherweise in Bezug auf die Aortenklappenstenose bedeuten, dass die systemische Entzündung der Frühphase abflacht und in die lokal entzündliche Endphase übergeht.

4.5 Limitationen dieser Studie

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten. Eine der Hauptbeschränkungen liegt in der ungleichmäßigen Verteilung der Probanden in den Subgruppen. Insbesondere waren deutlich mehr Patienten in der SP-AS-Gruppe vertreten, was zu einer möglichen Verzerrung der Ergebnisse und einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Gruppen führen könnte. Ein weiteres Problem stellt die insgesamt geringe Anzahl der Probanden dar. Eine größere Stichprobe wäre notwendig gewesen, um aussagekräftigere und besser generalisierbare Ergebnisse zu erzielen. Außerdem wiesen alle untersuchten Klappen eine hochgradige Stenose auf und es standen keine Klappen ohne Verkalkungen als Kontrollgruppe zur Verfügung. Die Variabilität in der Medikation der Patienten, deren Klappen untersucht wurden, stellt eine zusätzliche Herausforderung dar. Verschiedene Patienten erhielten unterschiedliche Medikamente, darunter auch Statine, was die Ergebnisse beeinflusst haben könnte. Insgesamt sollten diese Limitationen bei der Interpretation der Studienergebnisse berücksichtigt werden. Zukünftige Studien sollten bestrebt sein, diese Einschränkungen zu minimieren, um robustere und verlässlichere Ergebnisse zu erzielen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die kalzifizierende Aortenklappenstenose ist eine häufige Erkrankung, dessen Prävalenz aufgrund der älter werdenden Bevölkerung weiter zunehmen wird und für die es bislang keine medikamentöse Therapie gibt, die ein Fortschreiten verhindert. Die zugrundeliegende Pathophysiologie ist bisher unverstanden.

Ziel der Studie war es daher, die Pathophysiologie einer schnelleren Progression der Aortenklappenstenose näher zu beleuchten und hierbei mögliche therapeutische Ziele zu identifizieren. Hauptfokus war das Immunophilin CypA mit seinen Rezeptoren RAGE und EMMPRIN im Aortenklappengewebe, sowie die Risikofaktoren LDL und Gesamtcholesterin im Blutplasma. In unserer Studie untersuchten wir Patienten mit symptomatischer, schwerer Aortenklappenstenose mit Indikation zum chirurgischen Aortenklappenersatz und unterteilten diese in die zwei Untergruppen der schneller progredienten Aortenklappenstenose (FP-AS) und der langsamer progredienten Aortenklappenstenose (SP-AS). Wir konnten eine signifikant höhere Expression von CypA lokal auf der Aortenklappe von Patienten mit SP-AS im Vergleich zu FP-AS nachweisen, was auf ein weiter fortgeschrittenes Krankheitsstadium hinweist, in dem der Prozess lokal auf der Klappe vorherrschend ist. Die Risikofaktoren LDL und Gesamtcholesterin waren im Blutplasma der Patienten mit FP-AS im Vergleich zur SP-AS erhöht, was mit einem schnelleren Antreiben der Krankheitsprozesse in früheren Krankheitsstadien durch die Hyperlipidämie erklärbar sein könnte. In fortgeschritteneren Stadien könnten Faktoren wie metabolische Veränderungen, Kachexie und eine verminderte Leberfunktion vorherrschend sein, die zu einer Senkung der Blutfette führen. Zukünftige Studien könnten ein Augenmerk auf die Unterschiede in der Verteilung und Freisetzung von CyPA zwischen FP-AS und SP-AS legen, insbesondere lokal auf der Aortenklappe im Vergleich zum Plasmaspiegel. Dies könnte weitere Einblicke in die Pathophysiologie der Aortenklappenstenose bieten und möglicherweise ein erhöhtes CypA im Blutplasma bereits als Biomarker oder prognostischen Faktor etablieren.

6. Literaturverzeichnis

- AIKAWA, E. & LIBBY, P. 2017. A Rock and a Hard Place: Chiseling Away at the Multiple Mechanisms of Aortic Stenosis. *Circulation*, 135, 1951-1955.
- ALONSO-MONTES, C., MARTÍN, M., MARTÍNEZ-ARIAS, L., COTO, E., NAVES-DÍAZ, M., MORÍS, C., CANNATA-ANDÍA, J. B. & RODRÍGUEZ, I. 2018. Variants in cardiac GATA genes associated with bicuspid aortic valve. *Eur J Clin Invest*, 48, e13027.
- ANKER, S. D., PONIKOWSKI, P., VARNEY, S., CHUA, T. P., CLARK, A. L., WEBB-PEPLOE, K. M., HARRINGTON, D., KOX, W. J., POOLE-WILSON, P. A. & COATS, A. J. 1997. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet*, 349, 1050-3.
- ASPROMONTE, N., FUMARULO, I., PETRUCCI, L., BIFERALI, B., LIGUORI, A., GASBARRINI, A., MASSETTI, M. & MIELE, L. 2023. The Liver in Heart Failure: From Biomarkers to Clinical Risk. *International Journal of Molecular Sciences* [Online], 24.
- BELLAMY, M. F., PELLIKKA, P. A., KLARICH, K. W., TAJIK, A. J. & ENRIQUEZ-SARANO, M. 2002. Association of cholesterol levels, hydroxymethylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitor treatment, and progression of aortic stenosis in the community. *J Am Coll Cardiol*, 40, 1723-30.
- BERNARD, C., MORGANT, M. C., GUILLIER, D., CHEYNEL, N. & BOUCHOT, O. 2022. Point on the Aortic Bicuspid Valve. *Life (Basel)*, 12.
- BEYERSDORF, F., BAUER, T., FREEMANTLE, N., WALTHER, T., FRERKER, C., HERRMANN, E., BLEIZIFFER, S., MÖLLMANN, H., LANDWEHR, S., ENSMINGER, S., BEKEREDJIAN, R., CREMER, J., KUCK, K. H., FUJITA, B., GUMMERT, J., MÜLLER, L., BECKMANN, A., HAMM, C. W. & FOR THE, G. E. B. 2021. Five-year outcome in 18 010 patients from the German Aortic Valve Registry *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 60, 1139-1146.
- BHATIA, N., BASRA, S. S., SKOLNICK, A. H. & WENGER, N. K. 2016. Aortic valve disease in the older adult. *J Geriatr Cardiol*, 13, 941-944.

- BILLICH, A., WINKLER, G., ASCHAUER, H., ROT, A. & PEICHL, P. 1997. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, 185, 975-80.
- BODE, W. & MASKOS, K. 2003. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem*, 384, 863-72.
- BORÉN, J., CHAPMAN, M. J., KRAUSS, R. M., PACKARD, C. J., BENTZON, J. F., BINDER, C. J., DAEMEN, M. J., DEMER, L. L., HEGELE, R. A., NICHOLLS, S. J., NORDESTGAARD, B. G., WATTS, G. F., BRUCKERT, E., FAZIO, S., FERENC, B. A., GRAHAM, I., HORTON, J. D., LANDMESSER, U., LAUFS, U., MASANA, L., PASTERKAMP, G., RAAL, F. J., RAY, K. K., SCHUNKERT, H., TASKINEN, M. R., VAN DE SLUIS, B., WIKLUND, O., TOKGOZOGLU, L., CATAPANO, A. L. & GINSBERG, H. N. 2020. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*, 41, 2313-2330.
- BORST, O. 2010. *Neue molekulare Mechanismen zellulärer Interaktionen an der Gefäßwand und ihre Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose.*
- BUCCIARELLI, L. G., WENDT, T., QU, W., LU, Y., LALLA, E., RONG, L. L., GOOVA, M. T., MOSER, B., KISLINGER, T., LEE, D. C., KASHYAP, Y., STERN, D. M. & SCHMIDT, A. M. 2002. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, 106, 2827-35.
- CHAN, K. L., TEO, K., DUMESNIL, J. G., NI, A. & TAM, J. 2010. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation*, 121, 306-14.
- CHAVAKIS, T., BIERHAUS, A., AL-FAKHRI, N., SCHNEIDER, D., WITTE, S., LINN, T., NAGASHIMA, M., MORSER, J., ARNOLD, B., PREISSNER, K. T. & NAWROTH, P. P. 2003. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med*, 198, 1507-15.
- CHESTER, A. H., EL-HAMAMSY, I., BUTCHER, J. T., LATIF, N., BERTAZZO, S. & YACOUB, M. H. 2014. The living aortic valve:

- From molecules to function. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2014, 52-77.
- CHOI, E. Y., KIM, D., HONG, B. K., KWON, H. M., SONG, Y. G., BYUN, K. H., PARK, H. Y., WHANG, K. C. & KIM, H. S. 2002. Upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and gelatinases in human atherosclerosis infected with *Chlamydia pneumoniae*: the potential role of *Chlamydia pneumoniae* infection in the progression of atherosclerosis. *Exp Mol Med*, 34, 391-400.
- COFFEY, S., CAIRNS, B. J. & IUNG, B. 2016. The modern epidemiology of heart valve disease. *Heart*, 102, 75-85.
- COWELL, S. J., NEWBY, D. E., PRESCOTT, R. J., BLOOMFIELD, P., REID, J., NORTHRIDGE, D. B. & BOON, N. A. 2005. A Randomized Trial of Intensive Lipid-Lowering Therapy in Calcific Aortic Stenosis. *New England Journal of Medicine*, 352, 2389-2397.
- DENG, G., ZHANG, L., WANG, C., WANG, S., XU, J., DONG, J., KANG, Q., ZHAI, X., ZHAO, Y. & SHAN, Z. 2020. AGEs-RAGE axis causes endothelial-to-mesenchymal transition in early calcific aortic valve disease via TGF- β 1 and BMPR2 signaling. *Experimental Gerontology*, 141, 111088.
- DENHARDT, D. T., FENG, B., EDWARDS, D. R., COCUZZI, E. T. & MALYANKAR, U. M. 1993. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): Structure, control of expression and biological functions. *Pharmacology & Therapeutics*, 59, 329-341.
- DOLLERY, C. M., MCEWAN, J. R. & HENNEY, A. M. 1995. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 77, 863-8.
- DONATO, M., FERRI, N. A.-O., LUPO, M. A.-O., FAGGIN, E. & RATAZZI, M. Current Evidence and Future Perspectives on Pharmacological Treatment of Calcific Aortic Valve Stenosis. LID - 10.3390/ijms21218263 [doi] LID - 8263.
- DURBIN, A. D. & GOTLIEB, A. I. 2002. Advances towards understanding heart valve response to injury. *Cardiovasc Pathol*, 11, 69-77.
- EDEP, M. E., SHIRANI, J., WOLF, P. & BROWN, D. L. 2000. Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol*, 9, 281-6.
- EGAWA, N., KOSHIKAWA, N., TOMARI, T., NABESHIMA, K., ISOBE, T. & SEIKI, M. 2006. Membrane type 1 matrix

- metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells. *J Biol Chem*, 281, 37576-85.
- ELVERS, M., HERRMANN, A., SEIZER, P., MÜNZER, P., BECK, S., SCHÖNBERGER, T., BORST, O., MARTIN-ROMERO, F. J., LANG, F., MAY, A. E. & GAWAZ, M. 2012. Intracellular cyclophilin A is an important Ca(2+) regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation. *Blood*, 120, 1317-26.
- FARRAR, E. J. & BUTCHER, J. T. 2014. Heterogeneous susceptibility of valve endothelial cells to mesenchymal transformation in response to TNF α . *Ann Biomed Eng*, 42, 149-61.
- FARRAR, E. J., HUNTLEY, G. D. & BUTCHER, J. 2015. Endothelial-derived oxidative stress drives myofibroblastic activation and calcification of the aortic valve. *PLoS One*, 10, e0123257.
- FEINGOLD, K. R. & GRUNFELD, C. 2000. The Effect of Inflammation and Infection on Lipids and Lipoproteins. *In*: FEINGOLD, K. R., ANAWALT, B., BLACKMAN, M. R., BOYCE, A., CHROUSOS, G., CORPAS, E., DE HERDER, W. W., DHATARIYA, K., DUNGAN, K., HOFLAND, J., KALRA, S., KALTSAS, G., KAPOOR, N., KOCH, C., KOPP, P., KORBONITS, M., KOVACS, C. S., KUOHUNG, W., LAFERRÈRE, B., LEVY, M., MCGEE, E. A., MCLACHLAN, R., NEW, M., PURNELL, J., SAHAY, R., SHAH, A. S., SINGER, F., SPERLING, M. A., STRATAKIS, C. A., TRENCE, D. L. & WILSON, D. P. (eds.) *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Copyright © 2000-2024, MDText.com, Inc.
- FILIP, D. A., NISTOR, A., BULLA, A., RADU, A., LUPU, F. & SIMIONESCU, M. 1987. Cellular events in the development of valvular atherosclerotic lesions induced by experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 67, 199-214.
- FONDARD, O., DETAINT, D., IUNG, B., CHOQUEUX, C., ADLE-BIASSETTE, H., JARRAYA, M., HVASS, U., COUETIL, J. P., HENIN, D., MICHEL, J. B., VAHANIAN, A. & JACOB, M. P. 2005. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J*, 26, 1333-41.
- FUCHS, C. 2023. *Quantitative Charakterisierung der freien und thrombozytengebundenen Cyclophilin-A-Expression bei*

- Patienten mit akutem Koronarsyndrom* [Online]. Medizinische Fakultät Tübingen. Available: <http://dx.doi.org/10.15496/publikation-79913> [Accessed].
- GIMBRONE, M. A., JR. & GARCÍA-CARDEÑA, G. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*, 118, 620-36.
- GOODY, P. R., HOSEN, M. R., CHRISTMANN, D., NIEPMANN, S. T., ZIETZER, A., ADAM, M., BÖNNER, F., ZIMMER, S., NICKENIG, G. & JANSEN, F. 2020. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 40, 885-900.
- GOUVEIA, R., MADUREIRA, S., ELIAS, C., NEVES, A., SOARES, P. R., SOARES-CARREIRA, M., PEREIRA, J., RIBEIRO, A., AMORIM, M., ALMEIDA, J., ARAÚJO, J. P. & LOURENCO, P. 2023. Lower low density lipoprotein cholesterol associates to higher mortality in non-diabetic heart failure patients. *Int J Cardiol Cardiovasc Risk Prev*, 18, 200197.
- GRAUEN LARSEN, H., MARINKOVIC, G., NILSSON, P. M., NILSSON, J., ENGSTRÖM, G., MELANDER, O., ORHOMELANDER, M. & SCHIOPU, A. 2019. High Plasma sRAGE (Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products) Is Associated With Slower Carotid Intima-Media Thickness Progression and Lower Risk for First-Time Coronary Events and Mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39, 925-933.
- GUI, Y., ZHENG, H. & CAO, R. Y. 2022. Foam Cells in Atherosclerosis: Novel Insights Into Its Origins, Consequences, and Molecular Mechanisms. *Front Cardiovasc Med*, 9, 845942.
- HJORTNAES, J., SHAPERO, K., GOETTSCH, C., HUTCHESON, J. D., KEEGAN, J., KLUIN, J., MAYER, J. E., BISCHOFF, J. & AIKAWA, E. 2015. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 242, 251-260.
- HOFMANN, M. A., DRURY, S., FU, C., QU, W., TAGUCHI, A., LU, Y., AVILA, C., KAMBHAM, N., BIERHAUS, A., NAWROTH, P., NEURATH, M. F., SLATTERY, T., BEACH, D., MCCLARY, J., NAGASHIMA, M., MORSER, J., STERN, D. & SCHMIDT, A. M. 1999. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97, 889-901.
- HORI, O., BRETT, J., SLATTERY, T., CAO, R., ZHANG, J., CHEN, J. X., NAGASHIMA, M., LUNDH, E. R., VIJAY, S., NITECKI, D.

- & ET AL. 1995. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem*, 270, 25752-61.
- ITOH, Y. 2015. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biology*, 44-46, 207-223.
- IUNG, B., BARON, G., BUTCHART, E. G., DELAHAYE, F., GOHLKE-BÄRWOLF, C., LEVANG, O. W., TORNOS, P., VANOVERSHELDE, J. L., VERMEER, F., BOERSMA, E., RAVAUD, P. & VAHANIAN, A. 2003. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*, 24, 1231-43.
- JIN, Z. G., MELARAGNO, M. G., LIAO, D. F., YAN, C., HAENDELER, J., SUH, Y. A., LAMBETH, J. D. & BERK, B. C. 2000. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res*, 87, 789-96.
- JUVONEN, J., LAURILA, A., JUVONEN, T., ALÄKARPPÄ, H., SURCEL, H. M., LOUNATMAA, K., KUUSISTO, J. & SAIKKU, P. 1997. Detection of Chlamydia pneumoniae in human nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol*, 29, 1054-9.
- KADEN, J. J., BICKELHAUPT, S., GROBHOLZ, R., HAASE, K. K., SARIKOÇ, A., KILIÇ, R., BRUECKMANN, M., LANG, S., ZAHN, I., VAHL, C., HAGL, S., DEMPFLER, C. E. & BORGGREFE, M. 2004. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol*, 36, 57-66.
- KADEN, J. J., DEMPFLER, C. E., GROBHOLZ, R., FISCHER, C. S., VOCKE, D. C., KILIÇ, R., SARIKOÇ, A., PIÑOL, R., HAGL, S., LANG, S., BRUECKMANN, M. & BORGGREFE, M. 2005. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol*, 14, 80-7.
- KAUSHIK, D. K., HAHN, J. N. & YONG, V. W. 2015. EMMPRIN, an upstream regulator of MMPs, in CNS biology. *Matrix Biol*, 44-46, 138-46.
- KIANI, A. N., FISHMAN, E. K. & PETRI, M. 2006. Aortic valve calcification in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 15, 873-6.
- KIM, H., KIM, W.-J., JEON, S.-T., KOH, E.-M., CHA, H.-S., AHN, K.-S. & LEE, W.-H. 2005. Cyclophilin A may contribute to the

- inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clinical Immunology*, 116, 217-224.
- KOSTYUNIN, A., MUKHAMADIYAROV, R., GLUSHKOVA, T., BOGDANOV, L., SHISHKOVA, D., OSYAEV, N., OVCHARENKO, E. & KUTIKHIN, A. 2020. Ultrastructural Pathology of Atherosclerosis, Calcific Aortic Valve Disease, and Bioprosthetic Heart Valve Degeneration: Commonalities and Differences. *International Journal of Molecular Sciences* [Online], 21.
- KOSTYUNIN, A. E., YUZHALLIN, A. E., OVCHARENKO, E. A. & KUTIKHIN, A. G. 2019. Development of calcific aortic valve disease: Do we know enough for new clinical trials? *J Mol Cell Cardiol*, 132, 189-209.
- KRYSZTOFIK, H., WLEKLIK, M., MIGAJ, J., DUDEK, M., UCHMANOWICZ, I., LISIAK, M., KUBIELAS, G., STRABURZYŃSKA-MIGAJ, E., LESIAK, M. & KAŁUŻNA-OLEKSY, M. 2020. Cardiac Cachexia: A Well-Known but Challenging Complication of Heart Failure. *Clin Interv Aging*, 15, 2041-2051.
- LAVIE, C. J., DE SCHUTTER, A., ALPERT, M. A., MEHRA, M. R., MILANI, R. V. & VENTURA, H. O. 2014. Obesity paradox, cachexia, frailty, and heart failure. *Heart Fail Clin*, 10, 319-26.
- LECLERC, E., FRITZ, G., VETTER, S. W. & HEIZMANN, C. W. 2009. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 993-1007.
- LEE, C. & HAHN, R. T. 2023. Valvular Heart Disease Associated With Radiation Therapy: A Contemporary Review. *Struct Heart*, 7, 100104.
- LEOPOLD, J. A. 2012. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circ Cardiovasc Interv*, 5, 605-14.
- LERMAN, D. A., PRASAD, S. & ALOTTI, N. Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches.
- LI, J. & SCHMIDT, A. M. 1997. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 272, 16498-506.
- LI, R. G., XU, Y. J., WANG, J., LIU, X. Y., YUAN, F., HUANG, R. T., XUE, S., LI, L., LIU, H., LI, Y. J., QU, X. K., SHI, H. Y., ZHANG, M., QIU, X. B. & YANG, Y. Q. 2018. GATA4 Loss-of-Function

- Mutation and the Congenitally Bicuspid Aortic Valve. *Am J Cardiol*, 121, 469-474.
- LI, T., LI, X., FENG, Y., DONG, G., WANG, Y. & YANG, J. 2020. The Role of Matrix Metalloproteinase-9 in Atherosclerotic Plaque Instability. *Mediators Inflamm*, 2020, 3872367.
- LI, T., YU, H., ZHANG, D., FENG, T., MIAO, M., LI, J. & LIU, X. 2022. Matrix Vesicles as a Therapeutic Target for Vascular Calcification. *Front Cell Dev Biol*, 10, 825622.
- LIU, A. C., JOAG, V. R. & GOTLIEB, A. I. 2007. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol*, 171, 1407-18.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2015. *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart ; New York, Georg Thieme Verlag.
- MA, X., ZHAO, D., YUAN, P., LI, J., YUN, Y., CUI, Y., ZHANG, T., MA, J., SUN, L., MA, H., ZHANG, Y., ZHANG, H., ZHANG, W., HUANG, J., ZOU, C. & WANG, Z. 2020. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Calcific Aortic Valve Disease. *Acta Cardiol Sin*, 36, 183-194.
- MAJOR, T. C., LIANG, L., LU, X., ROSEBURY, W. & BOCAN, T. M. 2002. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1200-7.
- MAMILOS, A., WINTER, L., SCHMITT, V. H., BARSCH, F., GREVENSTEIN, D., WAGNER, W., BABEL, M., KELLER, K., SCHMITT, C., GÜRTLER, F., SCHREML, S., NIEDERMAIR, T., RUPP, M., ALT, V. & BROCHHAUSEN, C. 2023. Macrophages: From Simple Phagocyte to an Integrative Regulatory Cell for Inflammation and Tissue Regeneration-A Review of the Literature. *Cells*, 12.
- MANASWINI, N., SREEDEVI, N. N., THUMMALA, S., SAIBABA, K. S. S., MOHAMMED, N. & SATISH, O. S. 2022. Association of Serum Cyclophilin A Levels with Severity of Coronary Artery Disease. *J Lab Physicians*, 14, 253-259.
- MATILLA, L., RONCAL, C., IBARROLA, J., ARRIETA, V., GARCÍA-PEÑA, A., FERNÁNDEZ-CELIS, A., NAVARRO, A., ÁLVAREZ, V., GAINZA, A., ORBE, J., CACHOFEIRO, V., ZALBA, G., SÁDABA, R., RODRÍGUEZ, J. A. & LÓPEZ-ANDRÉS, N. 2020. A Role for MMP-10 (Matrix Metalloproteinase-10) in Calcific Aortic Valve Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 40, 1370-1382.

- MAZUR, P., KOPYTEK, M., ZĄBCZYK, M., UNDA, A. & NATORSKA, J. 2021. Towards Personalized Therapy of Aortic Stenosis. *J Pers Med*, 11.
- MICHAEL SCHÜNKE, E. S., UDO SCHUMACHER, MARKUS VOLL, KARL WESKER 2012. *Prometheus LernAtlas der Anatomie, Innere Organe*.
- MIYATA, T., HORI, O., ZHANG, J., YAN, S. D., FERRAN, L., IIDA, Y. & SCHMIDT, A. M. 1996. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Clin Invest*, 98, 1088-94.
- MOHLER, E. R., 3RD, GANNON, F., REYNOLDS, C., ZIMMERMAN, R., KEANE, M. G. & KAPLAN, F. S. 2001. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*, 103, 1522-8.
- MOHLER, E. R., III 2004. Mechanisms of aortic valve calcification. *American Journal of Cardiology*, 94, 1396-1402.
- MONGKOLDHUMRONGKUL, N., YACOUB, M. H. & CHESTER, A. H. 2016. Valve Endothelial Cells - Not Just Any Old Endothelial Cells. *Curr Vasc Pharmacol*, 14, 146-54.
- MUELLER, K. A. L., LANGNAU, C., HARM, T., SIGLE, M., MOTT, K., DROPPA, M., BORST, O., ROHLFING, A. K., GEKELER, S., GÜNTHER, M., GOEBEL, N., FRANKE, U. F. W., RADWAN, M., SCHLENSAK, C., JANNING, H., SCHEUERMANN, S., SEITZ, C. M., RATH, D., KREISSELMEIER, K. P., CASTOR, T., MUELLER, II, SCHULZE, H., AUTENRIETH, S. E. & GAWAZ, M. P. 2024. Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Thromboinflammation and Predicts Fast Progression of Aortic Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 44, 2118-2135.
- MULHOLLAND, D. L. & GOTLIEB, A. I. 1996. Cell biology of valvular interstitial cells. *Can J Cardiol*, 12, 231-6.
- NAGASE, H., VISSE, R. & MURPHY, G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69, 562-73.
- NETTERSHEIM, F. S. & BALDUS, S. ESC/EACTS-Leitlinien 2021 zum Management von Herzklappenerkrankungen.
- NEW, S. E. & AIKAWA, E. 2011. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circ Res*, 108, 1381-91.

- NEWBY, A. C. 2007. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med*, 17, 253-8.
- NIGRO, P., POMPILIO, G. & CAPOGROSSI, M. C. 2013. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death & Disease*, 4, e888-e888.
- NIGRO, P., SATOH, K., O'DELL, M. R., SOE, N. N., CUI, Z., MOHAN, A., ABE, J., ALEXIS, J. D., SPARKS, J. D. & BERK, B. C. 2011. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*, 208, 53-66.
- NKOMO, V. T., GARDIN, J. M., SKELTON, T. N., GOTTDIENER, J. S., SCOTT, C. G. & ENRIQUEZ-SARANO, M. 2006. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet*, 368, 1005-11.
- NOVARO, G. M., TIONG, I. Y., PEARCE, G. L., LAUER, M. S., SPRECHER, D. L. & GRIFFIN, B. P. 2001. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation*, 104, 2205-9.
- NSAIBIA, M. J., BOULANGER, M. C., BOUCHAREB, R., MKANNEZ, G., LE QUANG, K., HADJI, F., ARGAUD, D., DAHOU, A., BOSSÉ, Y., KOSCHINSKY, M. L., PIBAROT, P., ARSENAULT, B. J., MARETTE, A. & MATHIEU, P. 2017. OxLDL-derived lysophosphatidic acid promotes the progression of aortic valve stenosis through a LPAR1-RhoA-NF- κ B pathway. *Cardiovasc Res*, 113, 1351-1363.
- NYSTRÖM-ROSANDER, C., THELIN, S., HJELM, E., LINDQUIST, O., PÅHLSON, C. & FRIMAN, G. 1997. High incidence of Chlamydia pneumoniae in sclerotic heart valves of patients undergoing aortic valve replacement. *Scand J Infect Dis*, 29, 361-5.
- O'BRIEN, K. D. 2006. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 1721-8.
- OHTSUKI, T., SATOH, K., OMURA, J., KIKUCHI, N., SATOH, T., KUROSAWA, R., NOGI, M., SUNAMURA, S., YAOITA, N., AOKI, T., TATEBE, S., SUGIMURA, K., TAKAHASHI, J., MIYATA, S. & SHIMOKAWA, H. 2017. Prognostic Impacts of Plasma Levels of Cyclophilin A in Patients With Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37, 685-693.

- OSNABRUGGE, R. L., MYLOTTE, D., HEAD, S. J., VAN MIEGHEM, N. M., NKOMO, V. T., LEREUN, C. M., BOGERS, A. J., PIAZZA, N. & KAPPETEIN, A. P. 2013. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol*, 62, 1002-12.
- OTTO, C. M., KUUSISTO, J., REICHENBACH, D. D., GOWN, A. M. & O'BRIEN, K. D. 1994. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*, 90, 844-53.
- OWEN, W. F., JR., HOU, F. F., STUART, R. O., KAY, J., BOYCE, J., CHERTOW, G. M. & SCHMIDT, A. M. 1998. Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products modulates collagen synthesis by human fibroblasts. *Kidney Int*, 53, 1365-73.
- PEETERS, F., MEEUX, S. J. R., DWECK, M. R., AIKAWA, E., CRIJNS, H., SCHURGERS, L. J. & KIETSELAER, B. 2018. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment. *Eur Heart J*, 39, 2618-2624.
- PERRUCCI, G. L., SONGIA, P., MOSCHETTA, D., BARBAGALLO, V. A., VALERIO, V., MYASOEDOVA, V. A., ALFIERI, V., MASSAIU, I., ROBERTO, M., MALESEVIC, M., POMPILIO, G. & POGGIO, P. 2020. Cyclophilin A inhibition as potential treatment of human aortic valve calcification. *Pharmacological Research*, 158.
- PISKÓR, B. M., PRZYLIPIAK, A., DĄBROWSKA, E., NICZYPORUK, M. & ŁAWICKI, S. 2020. Matrilysins and Stromelysins in Pathogenesis and Diagnostics of Cancers. *Cancer Manag Res*, 12, 10949-10964.
- POHLE, K., MÄFFERT, R., ROPERS, D., MOSHAGE, W., STILIANAKIS, N., DANIEL, W. G. & ACHENBACH, S. 2001. Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation*, 104, 1927-32.
- RAJAMANNAN, N. M., EVANS, F. J., AIKAWA, E., GRANDE-ALLEN, K. J., DEMER, L. L., HEISTAD, D. D., SIMMONS, C. A., MASTERS, K. S., MATHIEU, P., O'BRIEN, K. D., SCHOEN, F. J., TOWLER, D. A., YOGANATHAN, A. P. & OTTO, C. M. 2011. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and

- Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*, 124, 1783-91.
- RAMASAMY, R., VANNUCCI, S. J., YAN, S. S., HEROLD, K., YAN, S. F. & SCHMIDT, A. M. 2005. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*, 15, 16r-28r.
- RAMASAMY, R., YAN, S. F., HEROLD, K., CLYNES, R. & SCHMIDT, A. M. 2008. Receptor for advanced glycation end products: fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1126, 7-13.
- ROSENHEK, R., RADER, F., LOHO, N., GABRIEL, H., HEGER, M., KLAAR, U., SCHEMPER, M., BINDER, T., MAURER, G. & BAUMGARTNER, H. 2004. Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. *Circulation*, 110, 1291-5.
- ROSS, J., JR. & BRAUNWALD, E. 1968. Aortic stenosis. *Circulation*, 38, 61-7.
- ROSS, R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*, 340, 115-126.
- ROSSEBØ, A. B. & PEDERSEN, T. R. 2004. Hyperlipidaemia and aortic valve disease. *Curr Opin Lipidol*, 15, 447-51.
- SAKAGUCHI, T., YAN, S. F., YAN, S. D., BELOV, D., RONG, L. L., SOUSA, M., ANDRASSY, M., MARSO, S. P., DUDA, S., ARNOLD, B., LILIENSIEK, B., NAWROTH, P. P., STERN, D. M., SCHMIDT, A. M. & NAKA, Y. 2003. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Invest*, 111, 959-72.
- SATOH, K., FUKUMOTO, Y., SUGIMURA, K., MIURA, Y., AOKI, T., NOCHIOKA, K., TATEBE, S., MIYAMICHI-YAMAMOTO, S., SHIMIZU, T., OSAKI, S., TAKAGI, Y., TSUBURAYA, R., ITO, Y., MATSUMOTO, Y., NAKAYAMA, M., TAKEDA, M., TAKAHASHI, J., ITO, K., YASUDA, S. & SHIMOKAWA, H. 2013. Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. *Circ J*, 77, 447-55.
- SATOH, K., MATOBA, T., SUZUKI, J., O'DELL, M. R., NIGRO, P., CUI, Z., MOHAN, A., PAN, S., LI, L., JIN, Z.-G., YAN, C., ABE, J.-I. & BERK, B. C. 2008. Cyclophilin A Mediates Vascular

- Remodeling by Promoting Inflammation and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circulation*, 117, 3088-3098.
- SCHMIDT, A. M., VIANNA, M., GERLACH, M., BRETT, J., RYAN, J., KAO, J., ESPOSITO, C., HEGARTY, H., HURLEY, W., CLAUSS, M. & ET AL. 1992. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*, 267, 14987-97.
- SCHMIDT, A. M., YAN, S. D., BRETT, J., MORA, R., NOWYGRAD, R. & STERN, D. 1993. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest*, 91, 2155-68.
- SCHMIDT, A. M., YAN, S. D., WAUTIER, J. L. & STERN, D. 1999. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*, 84, 489-97.
- SCHMIDT, R., BÜLTMANN, A., FISCHER, S., GILLITZER, A., CULLEN, P., WALCH, A., JOST, P., UNGERER, M., TOLLEY, N. D., LINDEMANN, S., GAWAZ, M., SCHÖMIG, A. & MAY, A. E. 2008. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes. *Circ Res*, 102, 302-9.
- SEIZER, P., BORST, O., LANGER, H. F., BÜLTMANN, A., MÜNCH, G., HEROUY, Y., STELLOS, K., KRÄMER, B., BIGALKE, B., BÜCHELE, B., BACHEM, M. G., VESTWEBER, D., SIMMET, T., GAWAZ, M. & MAY, A. E. 2009. EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction. *Thromb Haemost*, 101, 682-6.
- SEIZER, P., SCHONBERGER, T., SCHOTT, M., LANG, M. R., LANGER, H. F., BIGALKE, B., KRAMER, B. F., BORST, O., DAUB, K., HEIDENREICH, O., SCHMIDT, R., LINDEMANN, S., HEROUY, Y., GAWAZ, M. & MAY, A. E. 2010a. EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation. *Atherosclerosis*, 209, 51-7.
- SEIZER, P., SCHÖNBERGER, T., SCHÖTT, M., LANG, M. R., LANGER, H. F., BIGALKE, B., KRÄMER, B. F., BORST, O., DAUB, K., HEIDENREICH, O., SCHMIDT, R., LINDEMANN, S., HEROUY, Y., GAWAZ, M. & MAY, A. E. 2010b. EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation. *Atherosclerosis*, 209, 51-7.

- SEIZER, P., UNGERN-STERBERG, S. N. I. V., SCHÖNBERGER, T., BORST, O., MÜNZER, P., SCHMIDT, E.-M., MACK, A. F., HEINZMANN, D., CHATTERJEE, M., LANGER, H., MALEŠEVIĆ, M., LANG, F., GAWAZ, M., FISCHER, G. & MAY, A. E. 2015. Extracellular Cyclophilin A Activates Platelets Via EMMPRIN (CD147) and PI3K/Akt Signaling, Which Promotes Platelet Adhesion and Thrombus Formation In Vitro and In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35, 655-663.
- SEIZER, P., VON UNGERN-STERBERG, S. N. I., HAUG, V., DICENTA, V., ROSA, A., BUTT, E., NÖTHEL, M., ROHLFING, A. K., SIGLE, M., NAWROTH, P. P., NUSSBAUM, C., SPERANDIO, M., KUSCH, C., MEUB, M., SAUER, M., MÜNZER, P., BIEBER, K., STANGER, A., MACK, A. F., HUBER, R., BRAND, K., LEHNERS, M., FEIL, R., POSO, A., KRUTZKE, K., SCHÄFFER, T. E., NIESWANDT, B., BORST, O., MAY, A. E., ZERNECKE, A., GAWAZ, M. & HEINZMANN, D. 2024. Cyclophilin A is a ligand for RAGE in thromboinflammation. *Cardiovasc Res*, 120, 385-402.
- SENECHAL, M. & GERMAIN, D. P. 2003. Fabry disease: a functional and anatomical study of cardiac manifestations in 20 hemizygous male patients. *Clin Genet*, 63, 46-52.
- SEO, J. H., KIM, K. H., CHUN, K. J., LEE, B. K., CHO, B. R. & RYU, D. R. 2023. Impact of low-density lipoprotein cholesterol on progression of aortic valve sclerosis and stenosis. *Front Cardiovasc Med*, 10, 1171703.
- SHAH, S. M., SHAH, J., LAKEY, S. M., GARG, P. & RIPLEY, D. P. 2023. Pathophysiology, emerging techniques for the assessment and novel treatment of aortic stenosis. *Open Heart*, 10.
- SHERRY, B., YARLETT, N., STRUPP, A. & CERAMI, A. 1992. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3511-5.
- SIDHU, S. S., MENGISTAB, A. T., TAUSCHER, A. N., LAVAIL, J. & BASBAUM, C. 2004. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene*, 23, 956-63.
- SIMMONS, C. A., GRANT, G. R., MANDUCHI, E. & DAVIES, P. F. 2005. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes

- correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res*, 96, 792-9.
- SØNDERGAARD, L., STEINBRÜCHEL, D. A., IHLEMANN, N., NISSEN, H., KJELDTSEN, B. J., PETURSSON, P., NGO, A. T., OLSEN, N. T., CHANG, Y., FRANZEN, O. W., ENGSTRØM, T., CLEMMENSEN, P., OLSEN, P. S. & THYREGOD, H. G. 2016. Two-Year Outcomes in Patients With Severe Aortic Valve Stenosis Randomized to Transcatheter Versus Surgical Aortic Valve Replacement: The All-Comers Nordic Aortic Valve Intervention Randomized Clinical Trial. *Circ Cardiovasc Interv*, 9.
- STERN, D., YAN, S. D., YAN, S. F. & SCHMIDT, A. M. 2002. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 1615-25.
- STEWART, B. F., SISCOVICK, D., LIND, B. K., GARDIN, J. M., GOTTDIENER, J. S., SMITH, V. E., KITZMAN, D. W. & OTTO, C. M. 1997. Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease. This study was supported in part by Contracts NO1-HC85079 through HC-850086 from the National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. *Journal of the American College of Cardiology*, 29, 630-634.
- SU, Z., LIN, R., CHEN, Y., SHU, X., ZHANG, H., LIANG, S., NIE, R., WANG, J. & XIE, S. 2016. Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Cyclophilin A Secretion Requires ROCK-Dependent Diphosphorylation of Myosin Light Chain. *J Vasc Res*, 53, 206-215.
- SUN, L., CHANDRA, S. & SUCOSKY, P. 2012. Ex vivo evidence for the contribution of hemodynamic shear stress abnormalities to the early pathogenesis of calcific bicuspid aortic valve disease. *PLoS One*, 7, e48843.
- SUZUKI, J., JIN, Z. G., MEOLI, D. F., MATOBA, T. & BERK, B. C. 2006. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 98, 811-7.
- TAO, G., KOTICK, J. D. & LINCOLN, J. 2012. Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells. *Curr Top Dev Biol*, 100, 203-32.
- TEGEDER, I., SCHUMACHER, A., JOHN, S., GEIGER, H., GEISLINGER, G., BANG, H. & BRUNE, K. 1997. Elevated

- Serum Cyclophilin Levels in Patients with Severe Sepsis. *Journal of Clinical Immunology*, 17, 380-386.
- TEN KATE, G. R., BOS, S., DEDIC, A., NEEFJES, L. A., KURATA, A., LANGENDONK, J. G., LIEM, A., MOELKER, A., KRESTIN, G. P., DE FEYTER, P. J., ROETERS VAN LENNEP, J. E., NIEMAN, K. & SIJBRANDS, E. J. 2015. Increased Aortic Valve Calcification in Familial Hypercholesterolemia: Prevalence, Extent, and Associated Risk Factors. *J Am Coll Cardiol*, 66, 2687-2695.
- THOGATA, H., GARIKIPATI, S., REDDY, S. S., ABHINAV REDDY, P. & KUMAR JELLA, H. 2023. Long-Term Prognosis and Predictors of Mortality in Patients Undergoing Transcatheter Aortic Valve Replacement: A Retrospective Analysis. *Cureus*, 15, e44432.
- VAN DER LINDE, D., ANDRINOPOULOU, E. R., OECHSLIN, E. N., BUDTS, W., VAN DIJK, A. P., PIEPER, P. G., WAJON, E. M., POST, M. C., WITSENBURG, M., SILVERSIDES, C. K., OXENIUS, A., BOGERS, A. J., TAKKENBERG, J. J. & ROOS-HESELINK, J. W. 2013. Congenital valvular aortic stenosis in young adults: predictors for rate of progression of stenosis and aortic dilatation. *Int J Cardiol*, 168, 863-70.
- VENGRENYUK, Y., CARLIER, S., XANTHOS, S., CARDOSO, L., GANATOS, P., VIRMANI, R., EINAV, S., GILCHRIST, L. & WEINBAUM, S. 2006. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 14678-83.
- VISSE, R. & NAGASE, H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92, 827-39.
- VON UNGERN-STERNBERG, S. N. I., ZERNECKE, A. & SEIZER, P. 2018. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer EMMPRIN (CD147) in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*, 19.
- WANG, P. & HEITMAN, J. 2005. The cyclophilins. *Genome Biol*, 6, 226.
- WANG, Y., FANG, Y., LU, P., WU, B. & ZHOU, B. 2021. NOTCH Signaling in Aortic Valve Development and Calcific Aortic Valve Disease. *Front Cardiovasc Med*, 8, 682298.
- WERNIO, E., JAGIELAK, D., DARDZIŃSKA, J. A., ALEKSANDROWICZ-WRONA, E., ROGOWSKI, J., GRUSZECKA, A. & MAŁGORZEWICZ, S. 2018. Analysis of

- Outcomes of the Nutritional Status in Patients Qualified for Aortic Valve Replacement in Comparison to Healthy Elderly. *Nutrients*, 10.
- XU, Q., LEIVA, M. C., FISCHKOFF, S. A., HANDSCHUMACHER, R. E. & LYTTLE, C. R. 1992. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem*, 267, 11968-71.
- XUE, C., SOWDEN, M. P. & BERK, B. C. 2018. Extracellular and Intracellular Cyclophilin A, Native and Post-Translationally Modified, Show Diverse and Specific Pathological Roles in Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38, 986-993.
- YAN, S. D., SCHMIDT, A. M., ANDERSON, G. M., ZHANG, J., BRETT, J., ZOU, Y. S., PINSKY, D. & STERN, D. 1994. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*, 269, 9889-97.
- YANG, Y., LU, N., ZHOU, J., CHEN, Z. N. & ZHU, P. 2008. Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 47, 1299-310.
- YI, B., ZENG, W., LV, L. & HUA, P. 2021. Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories. *Aging (Albany NY)*, 13, 12710-12732.
- YILMAZ, M. B., GURAY, U., GURAY, Y., CIHAN, G., CALDIR, V., CAY, S., KISACIK, H. L. & KORKMAZ, S. 2004. Lipid profile of patients with aortic stenosis might be predictive of rate of progression. *Am Heart J*, 147, 915-8.
- YONEKURA, H., YAMAMOTO, Y., SAKURAI, S., PETROVA, R. G., ABEDIN, M. J., LI, H., YASUI, K., TAKEUCHI, M., MAKITA, Z., TAKASAWA, S., OKAMOTO, H., WATANABE, T. & YAMAMOTO, H. 2003. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*, 370, 1097-109.
- YU, B., HAFIANE, A., THANASSOULIS, G., OTT, L., FILWOOD, N., CERRUTI, M., GOURGAS, O., SHUM-TIM, D., AL KINDI, H., DE VARENNES, B., ALSHEIKH-ALI, A., GENEST, J. & SCHWERTANI, A. 2017. Lipoprotein(a) Induces Human Aortic Valve Interstitial Cell Calcification. *JACC: Basic to Translational Science*, 2, 358-371.

- YUAN, W., GE, H. & HE, B. 2010. Pro-inflammatory activities induced by CyPA–EMMPRIN interaction in monocytes. *Atherosclerosis*, 213, 415-421.
- YURCHENKO, V., CONSTANT, S. & BUKRINSKY, M. 2006. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology*, 117, 301-9.
- YURCHENKO, V., CONSTANT, S., EISENMESSER, E. & BUKRINSKY, M. 2010. Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol*, 160, 305-17.
- YURCHENKO, V., ZYBARTH, G., O'CONNOR, M., DAI, W. W., FRANCHIN, G., HAO, T., GUO, H., HUNG, H. C., TOOLE, B., GALLAY, P., SHERRY, B. & BUKRINSKY, M. 2002. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem*, 277, 22959-65.
- ZHANG, J., GE, H., WANG, C., GUO, T. B., HE, Q., SHAO, Q. & FAN, Y. 2007. Inhibitory effect of PPAR on the expression of EMMPRIN in macrophages and foam cells. *International Journal of Cardiology*, 117, 373-380.
- ZHENG, K. H., TZOLOS, E. & DWECK, M. R. 2020. Pathophysiology of Aortic Stenosis and Future Perspectives for Medical Therapy. *Cardiology Clinics*, 38, 1-12.
- ZHU, P., DING, J., ZHOU, J., DONG, W.-J., FAN, C.-M. & CHEN, Z.-N. 2005. Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production. *Arthritis Research & Therapy*, 7, R1023.
- ZHU, X., SONG, Z., ZHANG, S., NANDA, A. & LI, G. 2014. CD147: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Curr Med Chem*, 21, 2138-45.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin III – Kardiologie und Angiologie, unter Betreuung von Frau PD Dr. Karin Müller durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau PD Dr. Karin Müller. Die Rekrutierung und Materialgewinnung der Patienten erfolgte durch die kardiologische Abteilung und die Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie. Die Fixierung des Klappengewebes in Formaldehyd erfolgte durch Frau Sarah Gekeler (MTA). Die primäre Paraffineinbettung führten Frau Sarah Gekeler, Frau Dr. med. Nura Marquetand, Herr Bo Li (PhD) und Frau Zeanub Khan (Ärztin) durch. Die Neueinbettung nach multipler Bearbeitung der eingebetteten Klappen, auch durch andere Kollegen, erfolgte unter anderem durch mich. Das Anfertigen der Schnitte sowie die immunhistochemischen Färbungen wurden, nach Einarbeitung durch meine Laborkollegin Frau Dr. med. Nura Marquetand, von mir eigenständig durchgeführt. Die Aufnahmen unter dem Mikroskop führte ich nach einer Einweisung durch Frau Dr. rer. nat. Anne-Katrin Rohlfing selbstständig durch. Die Berechnungen der angefärbten Klappenflächen, die Bestimmung der Gesamtklappenfläche und die automatisierten Zellzählungen per ImageJ führte ich, nach einer Einweisung durch Herrn Dr. med. Manuel Sigle und Herrn Dr. rer. nat. Marcel Kremser, eigenständig durch. Die Hämatoxylin-Eosin Färbungen wurden von Frau Dr. Nura Marquetand und Frau Zeanub Khan durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anleitung von Frau PD Dr. Karin Müller, durch mich. Das Erstellen der Grafiken und Abbildungen führte ich eigenständig durch.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

8. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Karin Müller, geschäftsführende Oberärztin in der Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen, welche mich an diesem interessanten Thema arbeiten ließ und mir mit Ratschlägen zur Seite stand.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Meinrad Gawaz, ärztlicher Direktor der Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen, für die zur Verfügung gestellten Laborräumlichkeiten und guten Arbeitsbedingungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt all meinen Laborkollegen, sowohl für das gute Arbeitsklima, neu gewonnene Freundschaften, als auch für die zahlreichen Unterstützungen und Ratschläge, insbesondere hervorheben möchte ich Manuel Sigle und Marcel Kremser, sowie Nura Marquetand.

Außerdem danke ich meiner Chefin der neuroradiologischen Abteilung, Frau Prof. Dr. Ulrike Ernemann, für die eingeräumten Freiheiten und den nötigen Ansporn.

Meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner Patrik Pelz danke ich für den emotionalen Support.