

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Bedeutung von Kalzifizierungsgrad und Inflammation in der
degenerativen Aortenklappenstenose**

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

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

vorgelegt von

Shcherbyna, Serhii

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Müller
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Jörg Henes

Tag der Disputation: 20.03.2025

Inhaltsverzeichnis

TABELLEN.....	3
ABBILDUNGEN.....	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. EINLEITUNG	7
1.1. EPIDEMIOLOGIE DER AORTENKLAPPENSTENOSE.....	7
1.2. DEFINITION UND KLASSIFIKATION DER AORTENKLAPPENSTENOSE	7
1.2.1. <i>Definition einer schnell progredienten Aortenklappenstenose</i>	8
1.3. DER NATÜRLICHE VERLAUF EINER AORTENKLAPPENSTENOSE	9
1.3.1. <i>Krankheitsprogression</i>	9
1.3.2. <i>Evolution der Symptomatik</i>	9
1.3.3. <i>Angina pectoris</i>	10
1.3.4. <i>Synkope</i>	11
1.3.5. <i>Dyspnoe</i>	12
1.4. DIAGNOSTIK.....	12
1.4.1. <i>Klinischer Befund</i>	12
1.4.2. <i>Apparative Diagnostik</i>	12
1.4.3. <i>Therapie</i>	14
1.5. ANATOMIE UND HÄMODYNAMIK EINER NORMALEN UND EINER STENOSIERTEN AORTENKLAPPE	14
1.5.1. <i>Phänotyp des Aortenklappengewebes</i>	16
1.6. PATHOGENESE EINER KALZIFIZIERENDEN AORTENKLAPPENERKRANKUNG	16
1.6.1. <i>Stadien der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung</i>	17
1.6.2. <i>Die Rolle der Thrombozyten bei Aortenstenose</i>	18
1.6.3. <i>Die Rolle des Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktors beim Fortschreiten der Aortenklappenverkalkung</i>	19
1.7. ZIEL DIESER ARBEIT	21
2. MATERIALEN UND METHODEN	21
2.1. STUDIENDESIGN, PATIENTENKOHORTE UND EINSCHLUSSKRITERIEN	21
2.1.1. <i>Echokardiographische Kriterien</i>	22
2.1.2. <i>Definition der Geschwindigkeit der AS-Progression</i>	23
2.2. COMPUTERTOMOGRAPHISCHE DARSTELLUNG DER AORTENKLAPPE UND DER AORTA ...	25
2.3. ENTNAHME VON AORTENKLAPPENGeweBE ZUR ANALYSE	26
2.3.1. <i>Messungen der groben Verkalkung</i>	26
2.3.2. <i>Histologie</i>	27

2.3.3.	<i>Immunohistochemie</i>	27
2.3.4.	<i>Mikroskopie</i>	30
2.4.	GENEXPRESSIONSANALYSE MIT DER NANOSTRING®-TECHNOLOGIE	30
2.5.	MESSUNG DES PLASMASPIEGELS VON ZYTOKINEN UND CHEMOKINEN (LEGENDPLEX)37	
2.6.	STATISTISCHE ANALYSE.....	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1.	KLINISCHE MERKMALE UND KLAPPENPATHOLOGIE VON PATIENTEN MIT LANGSAM UND SCHNELL PROGREDIENTER AORTENSTENOSE ZEIGEN SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN BEIDEN GRUPPEN.....	38
3.1.1.	<i>Die Beurteilung der groben Pathologie</i>	42
3.1.2.	<i>Die Beurteilung der Lipidakkumulation</i>	43
3.1.3.	<i>Die Beurteilung der Immunzelleninfiltration</i>	44
3.2.	DIE CHARAKTERISIERUNG DER LOKALEN GEWEBEENTZÜNDUNG IN EXPLANTIERTEN AORTENKLAPPEN VON PATIENTEN MIT SCHNELL UND LANGSAM PROGREDIENTER AORTENSTENOSE ZEIGT SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN BEIDEN GRUPPEN....	46
3.3.	DIE BEDEUTUNG DER DURCH MIF REGULIERTEN SIGNALÜBERTRAGUNG BEI PATIENTEN MIT SP-AS	51
3.4.	DIE BEDEUTUNG DER KARDIOVASKULÄREN RISIKOFAKTOREN SOWIE KOMORBIDITÄTEN BEI PATIENTEN MIT SP-AS	54
4.	DISKUSSION.....	56
4.1.	PROGRESSIONSGESCHWINDIGKEIT DER AORTENSTENOSE.....	57
4.2.	PROINFLAMMATORISCHE ROLLE VON THROMBOZYTEN BEI AORTENSTENOSE.....	58
4.3.	DAS VORHANDENSEIN VON AKTIVIERTEN THROMBOZYTEN KANN ALS BIOMARKER VERWENDET WERDEN, UM EINE KALZIFIZIERTE AORTENKLAPPENSTENOSE FRÜHZEITIG ZU ERKENNEN.....	59
4.4.	DIE ROLLE VON MIF BEI DER PROGRESSION DER AORTENSTENOSE.....	60
4.5.	KLINISCHE RELEVANZ DER THROMBOZYTENAKTIVIERUNG BEI AS	62
5.	ZUSAMMENFASSUNG	63
6.	LITERATURVERZEICHNIS	65
7.	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	72
8.	DANKSAGUNG	73

Tabellen

Tabelle 1: Klassifikation der Aortenklappenstenose durch die ACC/AHA von 2020	8
Tabelle 2: Hauptressourcentabelle Immunhistochemische Antikörper	28
Tabelle 3: Nano-String mRNA-Profilierung.....	31
Tabelle 4: Das Design der Patientenkohorte.	39

Abbildungen

Abbildung 1: Überleben von Patienten mit Aortenstenose.....	10
Abbildung 2: Flussdiagramm der Studie.....	22
Abbildung 3: Bestimmung der schnell und langsam progredienten Aortenklappenstenose	25
Abbildung 4: CT-Scans von Patienten mit langsam und schnell progredienter Aortenstenose	40
Abbildung 5: Computertomografische Aufnahmen der Aortenklappe.....	41
Abbildung 6: Morphologische Analyse von Patienten mit Aortenklappenstenose.....	42
Abbildung 7: Histologische Färbungen von Aortenklappen von Patienten mit langsam und schnell progredienter Aortenklappenstenose.....	43
Abbildung 8: Histologische Färbungen von Aortenklappen von Patienten mit langsam und schnell progredienter Aortenklappenstenose.....	44
Abbildung 9: Immunhistologische Färbungen von Aortenklappen von Patienten mit langsam und schnell progredienter Aortenklappenstenose.	45
Abbildung 10: Immunhistologische Färbungen von Aortenklappen im Vergleich zwischen aortaler und ventrikulärer Aortenklappenseite von Patienten mit langsam und schnell progredienter Aortenklappenstenose.....	46
Abbildung 11: Hierarchische Clustering-Analyse der 50 am stärksten differenziell exprimierten Gene aus dem Nano-String-mRNA-Profilierung.....	47
Abbildung 12: Die Ergebnisse der Nanostring®-Daten.....	48
Abbildung 13: Heatmap mit zeilenweisem Vergleich der Nanostring®-Daten... ..	50
Abbildung 14: KEGG-Signalwege-Analyse.....	51
Abbildung 15: Term-Gene-Diagramm.....	52
Abbildung 16: Immunhistologische Färbungen von Aortenklappen von Patienten mit langsam und schnell progredienter Aortenklappenstenose.....	53
Abbildung 17: Spearman-Korrelationsanalyse von langsam und schnell progredienten Aortenklappenstenose-Patienten.....	54

Abbildung 18: Auswirkung von kardiovaskulären Risikofaktoren, Komedikation und Begleiterkrankungen auf die Progressionsrate der Aortenklappenstenose.....55

Abkürzungsverzeichnis

AAo	aufsteigende Aorta
ADP	Adenosindiphosphat
ACC	American College of Cardiology Foundation
AHA	American Heart Association
AK	Aortenklappe
AKF	Aortenklappenfläche
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
AR	Aortenregurgitation
AS	Aortenklappenstenose
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
BAK	Bikuspide Aortenklappe
BMI	Body-Mass-Index
BMP	Bone morphogenetic proteins
CAVD	kalzifizierende Aortenklappenerkrankung
CCS	Canadian Cardiovascular Society
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DAVK	degenerative Aortenklappenerkrankung
ECM	extrazelluläre Matrix
EndMT	endothelial-mesenchymaler Übergang
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
EOA	effektive Öffnungsfläche
EV	extrazelluläre Vesikeln
GAGs	Glykosaminoglykanen
GP	Glyoprotein
GOA	geometrische Öffnungsfläche
HE	Hämatoxylin-Eosin
HI	Herzinsuffizienz
HR	Hazard Ratio
hsTNI	hochempfindliches Troponin I
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IQR	Interquartilsbereich
KEP	klinischer Endpunkt
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCC	linkskoronare Aortenklappentasche
LDL	Low-Density-Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein(a)
LP-AS	langsam progrediente Aortenklappenstenose
LPS	Lipopolysaccharid
LV	linker Ventrikel
LVEF	linksventrikuläre Pumpfunktion
LVOT	linksventrikulärer Ausflusstrakt
LVH	LV-Hypertrophie
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor
NCC	nichtkoronare Aortenklappentasche
NF-κB	Nuklearfaktor-kappa-B
NKT	natürliche T-Killer

OPLS-DA	orthogonale Partial-Least-Squares-Diskriminanzanalyse
PAPsys	Lungenarteriendruck
PGS	phosphatgepufferte Salzlösung
PLS-DA	Partielle Least-Squares-Diskriminanzanalyse
RCC	rechtskoronare Aortenklappentasche
RNA	Ribonukleinsäure
Runx2	laufbezogener Transkriptionsfaktor 2
SD	Standardabweichung;
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERPING1	Serinproteinase-Inhibitor-Familie-G-Mitglied 1),
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SP-AS	schnell progrediente Aortenklappenstenose
STS	Society of Thoracic Surgeons
TGF- β	Transforming Growth Faktor β
TNF	Tumornekrosefaktor
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
VECs	valvuläre Endothelzellen
VECM	valvuläre extrazelluläre Matrix
VC	Vena Contracta
VICs	valvuläre Interstitialzellen

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie der Aortenklappenstenose

Die Herzklappenerkrankungen wurden in der Vergangenheit typischerweise durch rheumatische Herzerkrankungen verursacht, die in den Entwicklungsländern nach wie vor eine große Last bilden. In den Industrieländern ist die Zahl der rheumatischen Herzerkrankungen jedoch deutlich zurückgegangen, und die verbleibenden Herzklappenerkrankungen sind nun meist degenerativ bedingt. Davon gilt die Aortenklappenstenose (AS) als die häufigste erworbene Herzklappenerkrankung in der westlichen Welt und umfasst sowohl bikuspidale- als auch trikuspidale Aortenklappen. (Nkomo et al., 2006, Lucas and Tribouilloy, 2000).

Die Prävalenz der Pathologie liegt bei Erwachsenen im Alter von 50-59 Jahren bei nur etwa 0,2 %, steigt jedoch exponentiell auf 9,8 % bei Patienten über 80 Jahren an, wobei die Gesamtprävalenz bei Erwachsenen über 75 Jahren 2,8 % beträgt und keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bestehen (Eveborn et al., 2013).

Nach dem Auftreten der Symptomatik liegt die Sterblichkeitsrate bei über 50 % und die durchschnittliche Überlebenszeit beträgt nur 2 bis 3 Jahre, wenn nicht sofort ein Aortenklappenersatz vorgenommen wird (Pellikka et al., 1990).

1.2. Definition und Klassifikation der Aortenklappenstenose

Eine Aortenklappenstenose (AS) liegt vor, wenn die antegrade Geschwindigkeit über einer veränderten Klappe mindestens 2 m/s beträgt (P. A. Pellikka, 2022). Die klinischen Stadien einer AS werden durch Symptome, Klappenanatomie, Klappenhämodynamik und linksventrikuläre Funktion definiert.

Eine Schwere AS ist definiert als eine maximale transvalvuläre Geschwindigkeit von ≥ 4 m/s, typischerweise mit einer Aortenklappenfläche von ≤ 1 cm². Von einer sehr schweren AS spricht man, wenn die antegrade Geschwindigkeit über einer veränderten Klappe ≥ 5 m/s beträgt. Tabelle 1 fasst die derzeitige Klassifikation von American College of Cardiology/ American Heart Association (ACC/AHA) der AS zusammen.

Der Begriff "symptomatische AS" bezieht sich auf eine AS, die kardiale Symptome verursacht. Zu den Symptomen im Endstadium gehören Herzinsuffizienz, anginale Brustbeschwerden und Synkopen. Die häufigsten Symptome bei prospektiv nachbeobachteten Patienten sind jedoch eine verminderte Belastungstoleranz und/oder kardiale Dyspnoe bei Belastung, beides als frühe Symptome einer Herzinsuffizienz (Otto et al., 2021, P. A. Pellikka, 2022).

Tabelle 1: Klassifikation der Aortenklappenstenose durch die ACC/AHA von 2020

Stadium	Definition	Klappenanatomie	Klappenhämodynamik	Symptome	LVEF
A	Risiko für AS	Leichte oder keine Verkalkung oder Verdickung der Klappentaschen	Normale Aortenklappenfunktion (keine signifikante Stenose)	Keine	Normale LVEF
B	Progrediente AS	Verdickung und/oder Verkalkung der Klappentaschen, eingeschränkte Separation	- Leichte AS : V_{max} 2,0-2,9 m/s oder $\Delta P < 20$ mm Hg - Mäßige AS : V_{max} 3,0-3,9 m/s oder ΔP 20-39 mm Hg	Keine	Normale LVEF
C	Schwere asymptomatische AS	Stark verkalkte Klappe, deutlich eingeschränkte Klappenseparation	$V_{max} \geq 4$ m/s, $\Delta P \geq 40$ mm Hg, $AKF \leq 1,0$ cm ²	Keine	C1 : normale LVEF C2 : LVEF <50%
D1	Schwere symptomatische AS	Stark verkalkte Klappe, deutlich eingeschränkte Klappenseparation	$V_{max} \geq 4$ m/s, $\Delta P \geq 40$ mm Hg, $AKF \leq 1,0$ cm ²	Symptome vorhanden	normale oder reduzierte LVEF
D2	Schwere LFLG AS mit reduzierter LVEF	Stark verkalkte Klappe, deutlich eingeschränkte Klappenseparation	$V_{max} < 4$ m/s, $AKF \leq 1,0$ cm ² , $\Delta P < 40$ mm Hg.	Symptome vorhanden	LVEF <50%
D3	Schwere LFLG AS mit normaler LVEF (paradoxe LF AS)	Stark verkalkte Klappe, deutlich eingeschränkte Klappenseparation	$V_{max} < 4$ m/s, $AKF \leq 1,0$ cm ² , $\Delta P < 40$ mm Hg, $SV_i < 35$ mL/m ²	Symptome vorhanden	normale LVEF

AS - Aortenklappenstenose; AKF - Aortenklappenfläche; ΔP – mittlerer Druckgradient zwischen LV und Aorta; LV - linksventrikulär; LFLG – „Low-Flow, Low-Gradient“, LVEF - linksventrikuläre Auswurfraction; V_{max} - maximale Geschwindigkeit über die Aortenklappe. Angepasst und modifiziert nach (Otto et al., 2021).

1.2.1. Definition einer schnell progredienten Aortenklappenstenose

Die Abgrenzung zwischen einem raschen und einem langsamen Fortschreiten der AS ist sowohl in den Leitlinien als auch in der Literatur nicht eindeutig definiert. Allerdings wurden in der Zwischenzeit mehrere kleinere Studien publiziert, in denen Vorschläge zur Definition der AS-Progression mit unterschiedlichen Ansätzen präsentiert wurden. In diesen Studien wird ein rasches Fortschreiten der Aortenstenose in der Regel wie folgt definiert:

1. Ein Anstieg der Spitzengeschwindigkeit des Aortenstrahls (V_{max}) um $\geq 0,3$ m/s pro Jahr (Nistri et al., 2012, Mateos et al., 2022).
2. Ein Anstieg des maximalen Druckgradienten um ≥ 10 mmHg pro Jahr (Yilmaz et al., 2004).
3. Eine Abnahme der Aortenklappenfläche um $\geq 0,16$ cm² pro Jahr (Chan et al., 2010).

Ein frühzeitiges Eingreifen bei asymptomatischen Patienten mit schwerer AS und raschem Fortschreiten der Erkrankung ist mit einer signifikanten Reduktion der Mortalität assoziiert (Gahl et al., 2020). Sowohl die ACC/AHA- als auch die European Society of Cardiology (ESC)-Leitlinien empfehlen eine AS-Intervention bei einem Anstieg der $V_{max} \geq 0,3$ m/s/Jahr (Empfehlungsklassen: IIa, Evidenzgrad: B-C) (Baumgartner et al., 2017, Otto et al., 2021).

1.3. Der natürliche Verlauf einer Aortenklappenstenose

1.3.1. Krankheitsprogression

Hämodynamische Verlaufsuntersuchungen von Patienten mit AS über mehrere Jahre haben bei den meisten Patienten eine signifikante Progression gezeigt, die in einer Verkleinerung der Aortenklappenfläche und einer Zunahme des transvalvulären systolischen Druckgradienten manifestiert. (Kelly et al., 1988, Pellikka et al., 1990). Es gibt jedoch große Unterschiede im Ausmaß der Ausflussbehinderung, die zu Symptomen führt, was teilweise von der Körpergröße der Patienten und der Stärke ihrer täglichen körperlichen Aktivität abhängt. Infolgedessen gibt es keinen einzigen Wert für die maximale transvalvuläre Geschwindigkeit der Aorta, den mittleren transvalvulären Gradienten oder die Aortenklappenfläche, der angibt, wann die Symptome auftreten werden. Bei den meisten Patienten mit AS und normaler systolischer LV-Funktion treten gelegentlich Symptome auf, bis die Stenose schwerwiegend ist (definiert als Klappenfläche $\leq 1,0 \text{ cm}^2$, Geschwindigkeit über Aortenklappe $4,0 \text{ m/s}$ oder höher und/oder mittlerer transvalvulärer Gradient $\geq 40 \text{ mmHg}$). Umgekehrt sind viele Patienten, die dieser Definition von schwerer AS entsprechen, nicht symptomatisch, da diese Definition so gewählt wurde, dass sie eine hohe Sensitivität (nicht Spezifität) für die Identifizierung von Patienten aufweist, die von einer Linderung der Ausflussobstruktion profitieren könnten (Otto and P. A. Pellikka, 2022). Patienten mit gleichzeitiger linksventrikulärer systolischer Dysfunktion können jedoch eine schwere Klappenobstruktion mit einem niedrigen Geschwindigkeits- und Druckgradienten, aber einer kleinen Aortenklappenfläche haben (Otto and Prendergast, 2014).

1.3.2. Evolution der Symptomatik

Die Kardinalmanifestationen von AS sind Brustschmerzen, Synkopen und Dyspnoe. Es ist allgemein anerkannt, dass die Entwicklung von dieser Symptomatik dient als Indikator für eine linksventrikuläre Dekompensation und spricht für eine schlechte Prognose ohne Intervention (**Abbildung 1**). Dies wurde erstmals 1968 in der wegweisenden Arbeit von Braunwald und Ross (Ross and Braunwald, 1968) beschrieben und bildet den zugrunde liegenden Rahmen unseres heutigen Umgangs mit Patienten. Es wurde gezeigt, dass die Patienten mit AS eine lange asymptomatische Latenzzeit anhielten, während das Überleben nahe einer ansonsten gesunden Bevölkerung war. Sobald sich die Symptome im Alter von ca. 60 Jahre entwickelt haben, nahm das Überleben steil ab (Carabello, 2013).

Heute deutet immer noch das Auftreten von Symptomen ohne Klappenersatz auf eine

schlechte Prognose hin, aber das Alter des Beginns der Symptome hat um ca. 15 Jahre erhöht, was auf eine Evolution der Pathogenese von einer rheumatischen und angeborenen AS zu einer atherosklerotischen hindeutet. Mit dem Altern macht auch eine Vielzahl altersbedingter Komorbiditäten eine erschwerende Beurteilung der Symptome von AS. Die Patienten können die Symptome von AS möglicherweise nicht erkennen und Symptome, die nicht auf AS zurückzuführen sind, können falsch interpretiert werden (Carabello, 2013, Malouf et al., 2012).

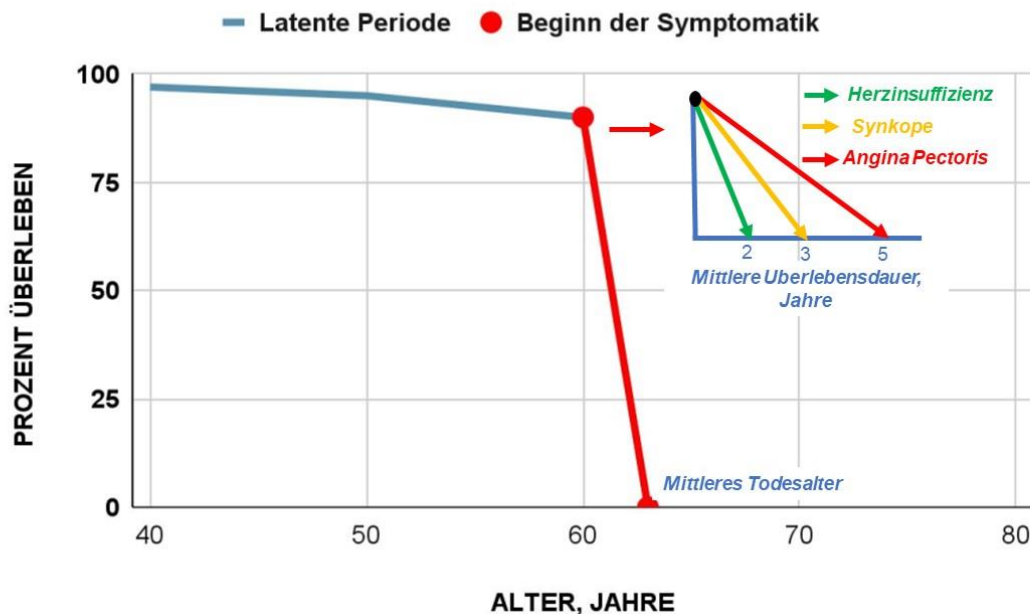


Abbildung 1: Überleben von Patienten mit Aortenstenose je nach symptomatischem Status in der Mitte des 20. Jahrhunderts (modifiziert nach Ross and Braunwald, 1968).

1.3.3. Angina pectoris

Ischämische Beschwerden im Sinne einer Angina pectoris treten bei ca. 35 % der AS-Patienten auf. (Selzer, 1987). Hypertrophie wird als einer der Hauptmechanismen des Myokards zur Anpassung an eine hämodynamische Überlastung angesehen. Bei Drucküberlastung bei AS normalisiert die konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) die Wandspannung (Grossman et al., 1975). Eine der Folgen der Hypertrophie ist myokardiale Ischämie und die begleitende Angina pectoris, die bei den Patienten mit Aortenstenose auch trotz normalen epikardialen Koronararterien berichtet wurde (Gould and Carabello, 2003). Angina tritt auf, wenn der myokardiale Sauerstoffbedarf das Angebot übersteigt.

Gleichzeitig kann auch die Sauerstoffversorgung bei AS reduziert werden. Normalerweise kann der koronare Blutfluss aufgrund der vasodilatatorischen Autoregulation um das ≥ 6 -fache ansteigen. Jedoch bei einer AS kann die Koronarfluss-Reserve auf weniger als die

Hälfte des Normalwerts begrenzt werden (Marcus et al., 1982). Eine reduzierte Reserve ist wahrscheinlich auf einen erhöhten diastolischen LV-Druck zurückzuführen, der das Endokard komprimiert und die Endokardialfunktion begrenzt. Eine begrenzte Kapillardichte kann auch eine Rolle spielen, weil das kapillare Einwachsen mit der Zunahme der Wanddicke nicht das Tempo halten kann, wenn sich eine LVH entwickelt (Ishihara et al., 1992, Breisch et al., 1984).

Jedoch das Vorhandensein und Ausmaß von LVH korreliert nicht mit dem Auftreten von Angina pectoris Symptomatik, obwohl die meisten Patienten mit AS LVH und reduzierte koronare Durchblutungsreserve haben (Rajappan et al., 2003). Somit bleibt die definitive Ursache der Angina bei AS ungewiss. Es ist wahrscheinlich, dass der schwer fassbare Mechanismus der Angina pectoris bei AS nicht auf einer einzigen Ursache beruht, sondern auf einer Mischung mehrerer anatomischer und pathophysiologischer Variablen (Carabello, 2013).

Das Auftreten von Angina pectoris erhöht das Risiko eines plötzlichen Todes im Vergleich zum Risiko bei asymptomatischen Patienten mit AS erheblich (Ross and Braunwald, 1968, Selzer, 1987, Gould and Carabello, 2003).

1.3.4. Synkope

Synkope ist ein kurzer reversibler Verlust des Bewusstseins und tritt normalerweise durch eine zerebrale Hypoperfusion auf. Obwohl ein arrhythmisches Ereignis bei Patienten mit AS sicherlich zu Hypotonie führen kann, wird Synkope normalerweise einem Ungleichgewicht im modifizierten Ohm Gesetz zugeschrieben: $\text{Blutdruck} = \text{Herzzeitvolumen} \times \text{gesamter peripherer Widerstand}$. Daher tritt eine Hypotonie auf, wenn Anomalien im Herzzeitvolumen oder im gesamten peripheren Widerstand oder beidem vorliegen. Eine physische Belastung führt zu einer peripheren Vasodilatation. Bei den gesunden Menschen wird dies durch ein erhöhtes Herzzeitvolumen für den Rückgang des Widerstands kompensiert und Blutdruck steigt an. Bei einer AS verhindert jedoch der hohe Widerstand an der Aortenklappe den Outputanstieg, gleichzeitig der periphere Widerstand sinkt immer noch, sodass der Blutdruck sinkt, was zu einer Synkope führt (Ross, 1976). Das Herzzeitvolumen kann auch durch die LV-Remodelierung limitiert sein, was eine AS begleitet und solche Patienten sind prädisponiert für Synkopen (Park et al., 2013).

Es gibt jedoch starke Daten, die für einen unzureichenden peripheren Gesamtwiderstand als eine mögliche Ursache der Synkope sprechen. Bei Hunderversuchen führte ein erhöhter LV-Druck, der durch eine Obstruktion des Aortenabflusses induziert wurde, zu einem vasodepressiven Reflex (Mark et al., 1973a). Da der transvalvuläre Gradient nimmt bei der Outputfläche zu (Gorlin and Gorlin, 1951), eine Verdopplung des Herzzeitvolumens würde

einen Gradienten von 40 mm Hg auf 160 mm Hg erhöhen - ein Druck, der die myokardialen Drucksensoren leicht beeinflussen und zu einer unangemessenen Vasodilatation führen könnte. Beim Menschen ist AS mit einem Versagen einer angemessenen Vasokonstriktion bei körperlicher Betätigung verbunden. (Mark et al., 1973b).

Schließlich kann eine belastungsinduzierte Arrhythmie für einige Fälle von Synkopen bei AS verantwortlich sein.

Zusammenfassend, gibt es wahrscheinlich, wie bei Angina pectoris, keine einzelne Ursache für Synkopen bei AS, sondern viele Faktoren wirken zusammen, um dieses Symptom zu verursachen (Carabello, 2013).

1.3.5. Dyspnoe

Dyspnoe und verminderte Belastungstoleranz – die häufigsten Symptome von AS. Mehrere Faktoren können dazu beitragen: eine diastolische Dysfunktion mit einem Anstieg des LV-Füllungsdrucks bei Belastung und eine Unfähigkeit des LV, das Herzzeitvolumen während einer Belastung zu erhöhen. Eine systolische LV-Dysfunktion ist ein später Befund, oft im Endstadium, normalerweise bei Patienten, die keine regelmäßige medizinische Versorgung erhalten haben. Eine LV-Drucküberlastung verursacht eine Drucküberlastung des linken Vorhofs und trägt auch bei der Entwicklung der Symptomatik bei (Carabello, 2013).

1.4. Diagnostik

1.4.1. Klinischer Befund

Die klinische Untersuchung spielt eine wichtige Rolle bei einem Verdacht auf eine AS. Die klinische Untersuchung beginnt mit einer Beurteilung der Symptome des Patienten, der Erhebung einer detaillierten Krankengeschichte und Auskultation des Herzens. Die Aortenstenose verursacht typischerweise ein charakteristisches systolisches Geräusch, das am besten im rechten zweiten Interkostalraum zu hören, häufig in die Karotiden ausstrahlt und wird als "crescendo-decrescendo" beschrieben. Es gibt keine Korrelation zwischen der Lautstärke des Herzgeräusches und dem Schweregrad der Stenose. Der Karotispuls kann langsam ansteigend und schwach sein ("parvus et tardus"), was das durch die Stenose reduzierte Schlagvolumen und die verlängerte Auswurfzeit widerspiegelt.

1.4.2. Apparative Diagnostik

Die transthorakale Echokardiographie liefert umfassende Informationen über Struktur und

Funktion des Klappenapparates und des Herzens und ist damit der Goldstandard zur Beurteilung der Aortenstenose (Klasse I, Evidenzlevel B). Der Schweregrad der AS wird mit Hilfe der Doppler Echokardiographie durch Berechnung der AK-Fläche, Messung der AK-Strahlgeschwindigkeit und des mittleren Druckgradienten zwischen LVOT und der effektiven Öffnungsfläche (Fläche des Strömungsstrahls an der Vena Contracta des Stenosejets) mit Hilfe der Bernoulli-Gleichung beurteilt werden. Diese 3 Parameter dienen zur Klassifizierung des Schweregrades der AS:

Leichtgradig: AOF $\geq 1,5 \text{ cm}^2$ bis 2 cm^2 , 3 m/s, $< 25 \text{ mmHg}$

Mittelgradig: AOF $\geq 1,0 \text{ cm}^2$ bis $1,5 \text{ cm}^2$, 3-4 m/s, 25-40 mmHg,

Hochgradig: AOF $< 1,0 \text{ cm}^2$, $> 4 \text{ m/s}$, $> 40 \text{ mmHg}$,

Im Falle einer Diskrepanz zwischen klinischem Befund und echokardiographischer Diagnose ist eine Dobutamin-Stressechokardiographie bei Patienten mit Low-Flow-, Low-Gradient-AS indiziert (Klasse IIa, Evidenzgrad B). In komplexen Fällen, in denen die transthorakale Echokardiographie unzureichend sein kann, spielt die transösophageale Echokardiographie eine wichtige ergänzende Rolle für eine bessere Visualisierung der Klappe und für präzise Messungen, insbesondere für die detaillierte Anatomie und die genaue Beurteilung der Aortenklappenfläche.

Die Herzkatheteruntersuchung ist in ausgewählten Fällen nach wie vor ein wichtiges invasives Diagnoseverfahren. Sie liefert direkte und genaue hämodynamische Messungen, bestätigt den Schweregrad der AS, beurteilt die koronare Herzkrankheit und hilft bei der präoperativen Planung, insbesondere in komplexen oder unklaren Fällen.

Obwohl sich mit dem Aufkommen der Echokardiographie die Aufgabe der Herzkatheruntersuchung zunehmend auf die Diagnostik und Therapie der koronaren Herzkrankheit verlagert hat, ist die nach wie vor von großer Bedeutung, insbesondere in bestimmten klinischen Szenarien, in denen nicht-invasive Tests nicht aussagekräftig sind oder einer weiteren Validierung bedürfen. Die Herzkatheteruntersuchung ermöglicht direkte und genaue hämodynamische Messungen, bestätigt den Schweregrad des AS, beurteilt die koronare Herzkrankheit und hilft bei der präoperativen Planung, insbesondere in komplexen oder unklaren Fällen.

Neben den oben genannten diagnostischen Verfahren spielt die kardiale Computertomographie (CT) eine zunehmend wichtige Rolle in der Diagnostik und Therapie der AS. Das kardiale CT ergänzt die Echokardiographie durch detaillierte anatomische Informationen, präzise Messungen der Aortenklappe (u.a. Agatston-Score, der mit dem Schweregrad der Stenose korreliert) und der umgebenden Strukturen sowie wertvolle Informationen für die Planung von Operationen und Eingriffen.

1.4.3. Therapie

Der erste chirurgische Aortenklappenersatz gelang Dr. Harken 1960 in Boston, was die erste erfolgreiche Implantation einer künstlichen Herzklappe war und gilt als der Beginn der modernen Herzklappenchirurgie. (Harken et al., 1960). 1961 führte Dr. Donald Ross in London die erste Implantation eines biologischen Herzklappenersatzes als Alternative zu mechanischen Herzklappen durch (Ross, 1962). In den letzten Jahren ist die Sterblichkeitsrate bei Aortenklappenersatz dank erheblicher Fortschritte in der Operationstechnik und beim Klappendesign drastisch gesunken (Lee et al., 2011). Der chirurgische Aortenklappenersatz ist nach wie vor der Goldstandard für den Aortenklappenersatz, da er seit langem erfolgreich ist, eine lange Haltbarkeit aufweist, vielseitig in der Behandlung komplexer Fälle eingesetzt werden kann und gute Langzeitergebnisse erzielt (Gummert et al., 2011).

Tatsächlich wird etwa ein Drittel der Patienten, bei denen ein Aortenklappenersatz indiziert ist, aufgrund ihres Alters, mehrerer Begleiterkrankungen und des damit verbundenen erhöhten perioperativen Mortalitätsrisikos nicht behandelt (Ashikhmina et al., 2011). Ursprünglich für diese Patientengruppe entwickelt, wurde die erste erfolgreiche Transkatheter-Aortenklappenimplantation im Jahr 2002 von Dr. Alain Cribier in Frankreich durchgeführt (Cribier et al., 2002). Damit begann eine neue Ära in der Behandlung der Aortenstenose. Inzwischen ist die Überlegenheit der Transkatheter-Aortenklappenimplantation gegenüber dem chirurgischen Aortenklappenersatz bei Hochrisikopatienten wissenschaftlich belegt (Smith et al., 2011, Adams et al., 2014).

Die pharmakologische Behandlung der CAVD ist ein aktives Forschungsgebiet, da die derzeitigen Therapien hauptsächlich die Symptome und die damit verbundenen Risikofaktoren behandeln, ohne direkt auf den zugrunde liegenden Verkalkungsprozess einzuwirken. Derzeit gibt es noch keine praktikablen Optionen für die nicht-chirurgische Behandlung von CAVD.

1.5. Anatomie und Hämodynamik einer normalen und einer stenosierten Aortenklappe

Bei den meisten Menschen besteht die Aortenklappe (AK) aus 3 sichelförmigen Klappenblättern, die auch als Taschen bezeichnet werden (trikuspidale Aortenklappe). Es wird zwischen einer rechten, linken und hinteren (septalen) Klappentasche unterschieden. Wenn nur 2 Klappentaschen vorhanden sind, spricht man von einer bikuspidalen Aortenklappe. Sie gilt als die häufigste angeborene Herzfehlbildung und tritt bei etwa 1 bis 2 % der Allgemeinbevölkerung auf (Tutar et al., 2005).

Die Klappe hat die Aufgabe, den diastolischen Rückfluss von Blut aus der Aorta in die linke Herzkammer am Ursprung der Aorta zu verhindern. Der Fluss durch die AK ist physiologisch pulsierend und hängt direkt von mehreren Faktoren ab, darunter die systolische und diastolische Funktion des linken Ventrikels (LV), der Aortendruck und die Compliance, der Klappentaschenmobilität sowie die LV-Geometrie und -Chronotropie. Wenn der ventrikuläre Druck den aortalen Druck zu Beginn der ventrikulären Systole übersteigt, öffnen sich die AK-Taschen und lassen den Fluss durch die Klappe zu. Das Herzzeitvolumen (HZV) steigt bis zur Spitzensystole an, danach beginnt es zu sinken. Die Druckdifferenz und die Strömungsgeschwindigkeit durch die Klappe variieren mit der Zeit im Herzzyklus. (Saikrishnan et al., 2014).

Der Fluss durch eine stenotische AK wird durch den Fluss durch eine konvergente Öffnung gut angenähert. Eine verengte AK-Öffnung und eine eingeschränkte Taschenöffnung erzeugen eine hämodynamische Düse, die eine Beschleunigung des Blutes durch die Klappe verursacht (Saikrishnan et al., 2014). Der mittlere Druckgradient über die AK und die Öffnungsfläche der Klappe werden zur Bestimmung des hämodynamischen Schweregrads der Erkrankung herangezogen.

Die hämodynamische Belastung durch die Aortenstenose ist in erster Linie eine Druckbelastung für den linken Ventrikel. Gemäß dem Laplace-Gesetz (Wandspannung = $[\text{transmuraler Druck} \times \text{Gefäßradius}] / 2 \times \text{Wanddicke}$) muss die Wanddicke der Ventrikel zunehmen, wenn der linksventrikuläre Druck ansteigt, um die Wandspannung aufrechtzuerhalten. Wenn die Zunahme der Wandstärke nicht mit dem Anstieg des linksventrikulären Drucks mithalten kann, steigt die Wandspannung (Nachlast), was die ventrikuläre Leistung beeinträchtigt. Dieses Phänomen wird als Nachlast-Fehlanpassung bezeichnet und spielt eine Rolle bei der systolischen linksventrikulären Dysfunktion bei einer Aortenstenose (Gunther and Grossman, 1979, Ross, 1976, Lester et al., 1998).

Es ist klar, dass dieses Konzept funktioniert, aber bei einer vollständigen Hypertrophie findet oft keine Kompensation statt. In einigen Fällen, besonders bei älteren Frauen, erscheint das Ausmaß der sich entwickelnden Hypertrophie übermäßig, die Nachlast ist auf ein subnormales Niveau reduziert und die Auswurfleistung ist normal oder überdurchschnittlich (Buttrick and Scheuer, 1992). In einigen Fällen reicht die Hypertrophie nicht aus, um die Wandspannung zu normalisieren, und die Ejektionsfraktion nimmt ab (Gunther and Grossman, 1979). In anderen Fällen kommt es zu einem konzentrischen Umbau mit geringer Hypertrophie, bei dem die LV-Wanddicke zunimmt, die Kammergröße jedoch abnimmt (Kupari et al., 2005, Hachicha et al., 2007). Obwohl die Auswurfleistung normal ist, bedeutet die Tatsache, dass der LV aus einem kleinen enddiastolischen Volumen ausstößt, dass das Schlagvolumen reduziert ist, was wiederum den transvalvulären Gradienten

verringert. Da häufig davon ausgegangen wird, dass eine schwere AS bei normaler LV-Funktion mit einem transvalvulären Gradienten von ≥ 40 mm Hg einhergeht, kann dies dazu führen, dass Kliniker den Schweregrad der AS unterschätzen - eine bis vor kurzem wenig verstandene Pathophysiologie der paradoxen Low-Flow-AS (Carabello, 2013).

1.5.1. Phänotyp des Aortenklappengewebes

Bei gesunden Menschen sind die Klappentaschen weniger als 1 mm dick und bestehen aus valvulären Endothelzellen (VEC), valvulären Interstitialzellen (VIC) und valvulärer extrazellulärer Matrix (VECM). VECs erfüllen wichtige Funktionen bei der Abdeckung der Klappe sowie der Regulierung der Durchlässigkeit und Homöostase. Histologisch bestehen die Klappentaschen aus 3 verschiedenen Schichten: die Laminae fibrosa (aortale Seite), spongiosa und ventricularis. Die hier liegende Hauptzellpopulation besteht aus VICs, die als primäre Quelle der Zellverkalkung dienen (Rutkovskiy et al., 2017, Lincoln et al., 2004, Wu et al., 2017). Um den unterschiedlichen physikalisch-mechanischen Herausforderungen der Klappe gerecht zu werden, haben diese Schichten eine komplexe extrazelluläre Matrix (ECM). Darüber hinaus weisen gesunde Klappen eine geringe Anzahl an ansässigen Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen sowie eine geringe Anzahl myofibroblastenähnlicher Zellen auf.

Die Lamina fibrosa, die den größten Teil der Klappe ausmacht und die wichtigste Stützstruktur ist, weist reichlich Typ-I-Kollagenfibrillen auf. Die Lamina ventricularis besteht aus Kollagen und radial ausgerichtetem Elastin, die zur radialen Verteilung der Kräfte beim Öffnen der Klappe beitragen. Dazwischen liegt die Lamina spongiosa, die größtenteils aus Glykosaminoglykanen (GAGs) besteht, von denen man annimmt, dass sie eine schmierende Funktion für die äußeren Schichten haben (Vesely, 1998, Simionescu et al., 2003, Goody et al., 2020).

1.6. Pathogenese einer kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung

Die Pathogenese einer kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (CAVD) ist komplex und nach wie vor nicht in vollem Umfang geklärt. Die Frühstadien der AS ähneln in vielerlei Hinsicht denen der Atherosklerose und umfassen überlappende Mechanismen der chronischen Entzündung, Lipidakkumulation und Verkalkung, die durch ähnliche Risikofaktoren und endotheliale Dysfunktion angetrieben werden (Agmon et al., 2001).

1.6.1. Stadien der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung

Der Beginn und die Progression einer kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung können als zwei verschiedene Phasen mit unterschiedlichen immunologischen, metabolischen, physiko-mechanischen und zellulären Reaktionen angesehen werden: die Initiationsphase, die der Atherosklerose ähnelt und durch Endothelschäden, Lipidinfiltration und Entzündungen gekennzeichnet ist, und die Ausbreitungsphase in denen VICs einen osteoblastenähnlichen Phänotyp annehmen und einen sich selbst erhaltenden Zyklus der Klappenverkalkung antreiben, der Ähnlichkeiten mit der Knochenbildung im Skelett aufweist (Pawade et al., 2015, Aikawa et al., 2007).

1.6.1.1. Die Initiationsphase: endotheliale Dysfunktion, Lipidablagerungen und Entzündung

Man geht davon aus, dass mechanische Belastung und andere Risikofaktoren eine endotheliale Dysfunktion der VEC-Schicht auslösen können, die zu zur Infiltration und Retention von Lipoproteinen und zur Rekrutierung von Entzündungszellen führt (Otto et al., 1994, Yearwood et al., 1989). Die Endothelschädigung führt zu einer Veränderung der Durchlässigkeit, wodurch das Eindringen von zirkulierenden Lipoproteinen, wie Lipoprotein (a) [Lp(a)] und Low-Density-Lipoprotein (LDL), sowie von Immunzellen, einschließlich Monozyten und T-Lymphozyten, ermöglicht wird (O'Brien et al., 1996, Olsson et al., 1999, Otto et al., 1994). Oxidierte LDLs sind zytotoxisch und stimulieren die osteogene Differenzierung von VICs (Li et al., 2015). Außerdem sind oxidiertes LDL und Lp(a) reich an oxidierten Phospholipiden, die ausgeprägte proinflammatorische und osteogene Wirkung haben (Boffa and Koschinsky, 2019). Dadurch wird eine chronische Entzündungsreaktion begünstigt und durch verstärkte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle werden Makrophagen, T-Zellen und Mastzellen rekrutiert (Otto et al., 1994, Ghaisas et al., 2000). Von diesen Immunzellen werden entzündungsfördernde Zytokine und proteolytische Enzyme produziert, die die fibrotischen und kalzifizierenden Prozesse in der Klappe fördern und unterhalten (Otto et al., 1994, Ghaisas et al., 2000).

Durch endotheliale Dysfunktion und Entzündung bedingter lokaler Zelltod führt zur Freisetzung von apoptotischen Körpern, die eine Mikroverkalkung verursachen, die durch die Freisetzung von extrazellulären Vesikeln (EV) aus Makrophagen und VICs weiter gefördert wird (Kim, 1976, Hjortnaes et al., 2013). Ähnlich wie bei der Knochenbildung werden mit Kalzium und anorganischem Phosphat gefüllte EVs ausgeschieden. In diesen EVs können sich dann Hydroxylapatit-Kristallen bilden, welche immer größer werden und schließlich die EVs zerstören können. Diese Kristalle kommen dann mit der ECM in Kontakt,

wo sie als Ursprungsort für die weitere Makroverkalkung dienen können (Kim, 1976, Proudfoot et al., 2000). Eine solche Verkalkung löst dann eine noch stärkere Immunreaktion aus. So entsteht ein Teufelskreis, der in die Ausbreitungsphase führt.

1.6.1.2. Die Ausbreitungsphase

Die Ausbreitungsphase bezeichnet den Zeitraum des aktiven Krankheitsverlaufs, in dem die Verkalkung zur treibenden Kraft wird und eine zunehmende Verschlechterung der Klappenfunktion zu beobachten ist.

In dieser Phase gilt die phänotypische Transformation von VICs in myofibroblastisch- und osteoblastenähnliche Phänotypen als Schlüsselschritt (Peeters et al., 2018). Die Einleitung dieser Differenzierung scheint durch Makrophagen und T-Zellen über die Sekretion von TNF (Tumornekrosefaktor), IL (Interleukin)-1 β , IL-6 und RANKL (Rezeptoraktivator des Nuklearfaktors kappa B) stimuliert zu sein (New and Aikawa, 2011).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die VICs in verschiedenen Schichten der Aortenklappe ein unterschiedliches Kalzifizierungspotenzial aufweisen, wobei der Schwerpunkt auf der Fibrosa-Schicht liegt (Galeone et al., 2013). Diese Schicht ist mit Prozessen der Kollagenbiosynthese, des Abbaus der extrazellulären Matrix und des Lipidstoffwechsels verbunden, die zu einer erheblichen Verkalkung führen (Galeone et al., 2013).

Des Weiteren ist die Ausbreitungsphase durch die Aktivierung diverser Signalwege gekennzeichnet, darunter Rho A/ROCK1, der Notch-Signalweg, BMP-Signalisierung (Bone morphogenetic proteins) sowie der Hedgehog-Signalweg und TGF- β (Transforming Growth Faktor β) (Liu et al., 2007). In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die Notch-Signalisierung einen Schutzmechanismus gegen die osteoblastische Differenzierung darstellt, während die anderen diese fördern.

Mit zunehmender Verkalkung werden die pro-osteogenen Mechanismen überwältigt, was letztlich zu schwerer Verkalkung und einer Beeinträchtigung der Klappenfunktion führt (Peeters et al., 2018). Die Aortenklappe wird wesentlich steifer und hat eine deutlich kleinere Öffnungsfläche, da die verkalkten Massen zusammenwachsen und den Öffnungsmechanismus der Klappe behindern.

1.6.2. Die Rolle der Thrombozyten bei Aortenstenose

Die Auswirkungen einer AS auf die Thrombozytenfunktion sind ein komplexes Zusammenspiel von Aktivierung, Schädigung und veränderter Reaktivität, wobei hohe

Scherkräfte in der verengten Klappe je nach spezifischen Bedingungen und Schweregrad der Erkrankung sowohl zu einer erhöhten als auch zu einer verminderten Thrombozytenfunktion führen.

Bei einer AS führen hohe Scherkräfte zunächst zu einer Aktivierung der Blutplättchen, gefolgt von einer Inaktivierung und Schädigung, was eine komplexe Reaktion zur Folge hat (O'Brien et al., 1995, Kanda et al., 2021). Diese durch Scherkräfte verursachten Schäden tragen zur Blutungsneigung bei, die bei einigen Patienten beobachtet wird und als erworbenes von-Willebrand-Syndrom bekannt ist (Vincentelli et al., 2003). Der Schweregrad der Thrombozytenfunktionsstörung korreliert mit dem Grad der AS, wobei schwerere Fälle stärkere Veränderungen der Thrombozytenfunktion aufweisen (O'Brien et al., 1995). Es ist bemerkenswert, dass die Thrombozytenfunktionsstörung reversibel ist und sich nach einem Aortenklappenersatz wieder normalisiert. Dies lässt auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Hämodynamik der Klappe und dem Thrombozytenverhalten schließen (Vincentelli et al., 2003).

Andersherum, eine erhöhte Scherung kann folglich sowohl die Freisetzung von Thrombin steigern als auch die Thrombozyten bei Patienten mit mittelschwerer bis schwerer AS aktivieren (Natorska et al., 2011). Diese These konnte bislang jedoch nicht in den anderen Studien reproduziert werden (Prohaska et al., 2008, Panzer et al., 2010). Es wird angenommen, dass der Scherstress sowie die turbulenten Blutflussmuster eine Aktivierung des Endothels bewirken und darüber hinaus die Adhäsion und Aktivierung von Blutplättchen an der Oberfläche der AK fördern könnten. Dies würde eine Freisetzung von zahlreichen Mediatoren zur Folge haben, wodurch eine proosteogene Wirkung in der AK entstünde (Nsaibia et al., 2017).

Des Weiteren lässt die Studie von Bouchareb et al. vermuten, dass die aktivierten Thrombozyten die Verkalkung der Herzklappen bei hoher Scherbelastung im Rahmen einer schweren AS auch direkt fördern könnten (Bouchareb et al., 2019). Die Studie identifiziert eine bisher unbekannte Rolle aktivierter Blutplättchen bei der Progression von CAVD durch Förderung der Mineralisierung und des osteogenen Übergangs von VICs.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Thrombozyten bei AS aufgrund veränderter Hämodynamik und Scherkräfte erhebliche funktionelle Veränderungen erfahren. Diese Veränderungen wirken sich nicht nur auf das Blutungsrisiko aus, sondern scheinen auch zur Progression der Klappenverkalkung und Stenose beizutragen.

1.6.3. Die Rolle des Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktors beim Fortschreiten der Aortenklappenverkalkung

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (MIF) wurde vor fast 60 Jahren bei Studien

zur Immunreaktionen entdeckt (Bloom and Bennett, 1966, David, 1966). Es war eines der ersten identifizierten Zytokine, welches von T-Zellen bei verzögerten Überempfindlichkeitsreaktionen exprimiert wird und eine hemmende Wirkung auf die Makrophagenmigration ausübt (David, 1966). Die tatsächliche biologische Aktivität des MIF war jedoch bis zur Klonierung der komplementären DNA des menschlichen MIF im Jahr 1989 unklar (Weiser et al., 1991). Bei MIF handelt es sich um ein homo-trimeres Protein, das als pleiotropes pro-inflammatorisches Zytokin wirkt. Ursprünglich wurde MIF als Lymphokin der T-Zellen erkannt. Es zeigte sich jedoch bald, dass MIF in verschiedenen Zell- und Gewebetypen in großem Umfang exprimiert wird, unter anderem in Zellen der glatten Muskulatur (Fan, Zhang et al. 2017), des Immun- und Nervensystems (Calandra, Spiegel et al. 1998), in Hypophysenzellen (Bernhagen, Calandra et al. 1993), Epi- und Endothelzellen (He et al., 2006, Pellowe et al., 2019), sowie in mesenchymalen Zellen (Park et al., 2009). MIF ist ein potenzieller Mediator bei vielen Entzündungs- und Immunerkrankungen aufgrund seiner vielfältigen regulatorischen Eigenschaften, inklusive bakterieller Sepsis (Bozza et al., 2004), parasitären (Malaria, Leishmaniose (Juttner et al., 1998, Martiney et al., 2000) und viralen (Denguefieber) Infektionen (Chuang et al., 2015). MIF reguliert die Makrophagenreaktionen während einer Infektion und stimuliert direkt oder indirekt die Produktion oder Expression einer großen Gruppe proinflammatorischer Zytokine, wie Z.b. TNF- α , IFN- γ (Interferon- γ), IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, Stickstoffmonoxid und COX2 (Calandra and Roger, 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MIF an der Pathogenese zahlreicher akuter und chronischer Entzündungskrankheiten wie Glomerulonephritis (Lan et al., 2000), rheumatoide Arthritis (Leech et al., 1999), Asthma bronchiale (Yamaguchi et al., 2000), Diabetes mellitus Typ 2 (Yabunaka et al., 2000), Colitis und Morbus Crohn beteiligt ist (de Jong et al., 2001, Murakami et al., 2001). Außerdem haben bereits mehrere Studien die Bedeutung von MIF bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose gezeigt (Chen et al., 2004). Chronische Inflammationen, die durch mechanischen Stress und Endothelschädigung ausgelöst werden, sind ein Triggerpunkt der Atherosklerose und MIF ist ein scherstressempfindliches Zytokin, das bereits in der Initiationsphase der Atherosklerose nachgewiesen wurde und zur pathologischen Progression der Läsionen beitragen kann (Qiao et al., 2018, Burger-Kentischer et al., 2002). Da sowohl die Pathogenese der Atherosklerose als auch der Aortenstenose ähnliche Mechanismen der Krankheitsentstehung und -progression beinhalten, legen diese Gemeinsamkeiten nahe, dass die beiden Erkrankungen miteinander verbunden sind und dass die einzigartigen Eigenschaften und Funktionen des MIF diesen zu einem potenziellen Ziel für therapeutische Strategien oder als diagnostischen Marker für kalzifizierende Herzklappenerkrankungen machen.

1.7. Ziel dieser Arbeit

Die Diagnose einer raschen Progression der AS kann eine Herausforderung darstellen. Bei diesen Patienten ist eine frühzeitige Intervention jedoch von entscheidender Bedeutung, um potenziell schwerwiegende Konsequenzen zu vermeiden (Gahl et al., 2020). Derzeit steht für die Behandlung der AS kein wirksames Medikament zur Verfügung, sodass ein Klappenersatz die einzige Behandlungsoption für die Erkrankung im Endstadium darstellt. Die Identifikation von Mechanismen und Risikofaktoren, welche ein schnelles Fortschreiten der Aortenstenose begünstigen, kann die Grundlage für die Entwicklung einer darauf basierenden Therapieoption bilden. Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, das Verständnis der Pathogenese der CAVD zu optimieren. Die vorliegende Untersuchung befasst sich mit der Fragestellung, ob Patienten, die echokardiographisch in schnell und langsam progrediente AS eingeteilt werden, einen unterschiedlichen valvulären Phänotyp aufweisen. Dafür wurde die lokale Expression von Markern der Thrombozyteninflammation untersucht.

2. Materialien und Methoden

2.1. Studiendesign, Patientenkohorte und Einschlusskriterien

Wir haben vom Dezember 2014 bis März 2021 prospektiv 475 Patienten mit schwerer symptomatischer (NYHA-Klasse \geq II) AS und mit einer Indikation für einen Aortenklappenersatz, die sich in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie und in der Abteilung für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen vorstellten, eingeschlossen. Das Design der Patientenkohorte ist in der **Abbildung 2** dargestellt.

Alle Patienten wurden klinisch und kardiologisch untersucht, einschließlich Echokardiographie, Elektrokardiographie, Erhebung der Krankheitsgeschichte bei Studienbeginn, Begleitmedikation, Komorbiditäten und Blutentnahme für Routinelaborparameter. Die Gewebeproben von explantierten AKs wurden von Patienten entnommen, die sich einem chirurgischen Klappenersatz unterzogen, und wurden durch Histologie, Immunhistochemie und Genexpressionsanalyse unter Verwendung der Nanostring-Technologie analysiert. Die klinischen Risikobewertungen basierten auf dem von der Society of Thoracic Surgeons (STS) entwickelten Scoring-Risikomodell (Otto et al., 2021, Vahanian et al., 2021), das einen Algorithmus verwendet, der auf dem Vorhandensein von Begleiterkrankungen basiert, um die Sterblichkeit nach 30 Tagen in Prozent vorherzusagen. Die koronare Herzkrankheit (KHK) wurde durch eine Koronarangiographie bestimmt und wurde als $> 25\text{--}50\%$ Stenose eines oder mehrerer Koronargefäße

charakterisiert.

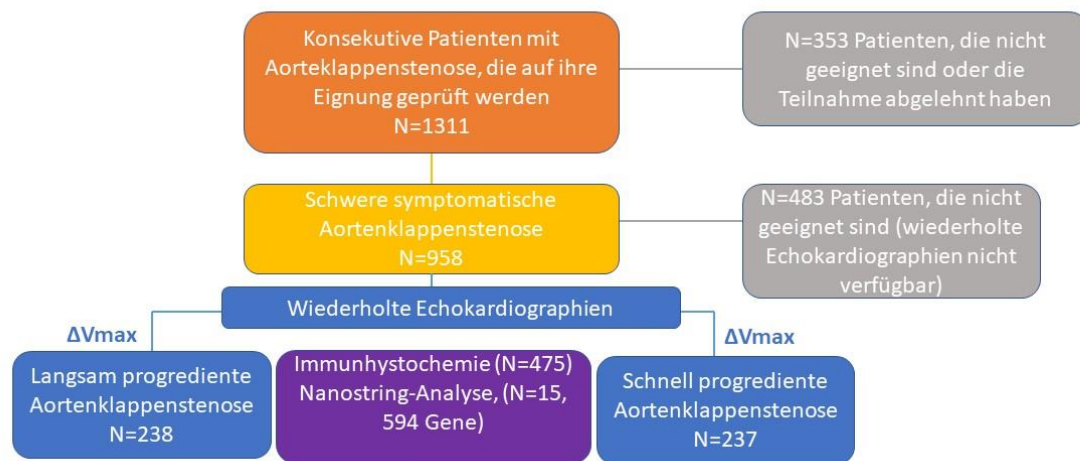


Abbildung 2: Flussdiagramm der Studie. Es wurde eine Kohorte von 475 Patienten mit schwerer symptomatischer AS (NYHA-Klasse \geq II) und mit einer Indikation für einen Aortenklappenersatz, die sich in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie und in der Abteilung für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen vom Dezember 2014 bis März 2021 vorstellten, aus 1311 Patienten gebildet, die die Einschlusskriterien der Studie erfüllten.

Die Einschlusskriterien unserer Studie waren das Alter über 18 Jahren und das Vorhandensein einer schweren AS, die in der Echokardiographie festgestellt wurde.

Zu den Ausschlusskriterien gehörten eine vorhandene mikrobielle systemische Infektion, eine vermutete oder aktive bakterielle Endokarditis innerhalb von 180 Tagen vor Studieneinschluss, eine schwere Leberzirrhose oder eine aktive Lebererkrankung in der Vorgeschichte sowie eine vom Heart Team festgestellte erhebliche Gebrechlichkeit mit einer Lebenserwartung von weniger als einem Jahr.

Als Laborparameter bestimmten wir unter anderem die Leukozyten- und Thrombozytenzahl, das N-terminale natriuretische Peptid vom Typ pro-B (NT-pro-BNP, > 300 ng/L), das hochempfindliche Troponin I (hs TNI, > 37 ng/L) und das C-reaktive Protein (CRP, $> 0,5$ mg/dL) als etablierte Marker für Myokard- und Entzündungsstress.

2.1.1. Echokardiographische Kriterien

Echokardiografische Untersuchungen und Standardmessungen wurden bei allen Patienten gemäß den Leitlinien der European Association of Echocardiography/American Society of Echocardiography (EAE/ASE) durchgeführt (Otto et al., 2021, Vahanian et al., 2021). Die LV-Ejektionsfraktion wurde mit der biplanen Simpson-Methode in den apikalen 4- und 2-Kammer-Ansichten gemessen. Die Diagnose und der Schweregrad von AS wurden gemäß den Empfehlungen der European Association of Echocardiography/American Society of Echocardiography (EAE/ASE) klassifiziert (Otto et al., 2021, Vahanian et al., 2021). Wir

haben den mittleren (P_{mean}) und den Spitzendruckgradienten (P_{max}) der AK und die Aortenklappenfläche (AKF) entsprechend gemessen. Der äußere Rand der Strahlgeschwindigkeitskurve der AS in der Kontinuitätsdoppler-Bildgebung wurde nachgezeichnet, um die maximale AS-Strahlgeschwindigkeit (V_{max} m/s) zusammen mit dem maximalen und mittleren transvalvulären Druckgradienten ($P_{\text{max}}/P_{\text{mean}}$, mmHg) zu erhalten. Die AKF wurde anhand der Kontinuitätsgleichung berechnet. Der AK-Phänotyp wurde als bikuspid oder trikuspid erfasst. Die degenerative Aortenklappenerkrankung (DAVK) und der Schweregrad der AS wurden anhand der hämodynamischen Parameter gemäß den aktuellen Leitlinien (Otto et al., 2021, Vahanian et al., 2021) in drei Schweregraden als leichte, mittelschwere und schwere AS definiert. Eine leichte AS wurde durch einen $P_{\text{mean}} < 20$ mmHg und eine AKF $> 1,5$ cm² definiert, eine mittelschwere AS wurde definiert als ein P_{mean} zwischen 20 und 40 mmHg und eine AKF zwischen 1,0 und 1,5 cm² und eine schwere AS durch einen $P_{\text{mean}} \geq 40$ mmHg und eine AKF $\leq 1,0$ cm².

2.1.2. Definition der Geschwindigkeit der AS-Progression

In einer konsekutiven Kohorte von Patienten mit schwerer AS identifizierten wir zwei Subgruppen von Patienten mit symptomatischer AS in Bezug auf die schnelle und langsame Krankheitsprogression durch wiederholte transthorakale echokardiographische Beurteilung in einer retrospektiven Analyse und/oder durch die mittlere Dauer der ersten der ersten dokumentierten Diagnose der AS bis zum Auftreten erster AS-bezogener Symptome, insbesondere Angina pectoris, Dyspnoe \geq NYHA-Klasse 2 und Synkope, definiert als "AS-Dauer".

In der transthorakalen Echokardiographie bestimmten wir die Rate der Krankheitsprogression durch die Veränderung der maximalen transvalvulären Flussgeschwindigkeit (ΔV_{max}) im Laufe der Zeit und ermittelten eine annualisierte Progressionsrate ΔV_{max} . Der Median der annualisierten ΔV_{max} wurde als Cut-off verwendet und somit waren zwei Untergruppen von Patienten mit entweder schnell progredienter AS (SP-AS) mit $\Delta V_{\text{max}} > 0,45$ m/s/Jahr oder langsam progredienter AS (LP-AS) - $\Delta V_{\text{max}} \leq 0,45$ m/s/Jahr erkennbar waren, bis schwere Symptome auftraten, die einen chirurgischen Klappenersatz rechtfertigten (**Abbildung 3 A, B**).

Darüber hinaus definierten wir entsprechend der Dauer von der ersten dokumentierten AS bis zum Auftreten von AS-bezogenen Symptomen, die einen AK-Ersatz rechtfertigten (AS-Dauer), einen Cut-off-Wert von einer mittleren AS-Dauer von 39 Monaten (Spanne von 0,17 - 329,2 Monaten), der als Dauer von der ersten dokumentierten AS-Diagnose bis zum Auftreten von Symptomen bestimmt wurde (**Abbildung 3 C, D**).

Unter Verwendung eines annualisierten ΔV_{\max} -Grenzwerts von 0,45 m/s/Jahr und eines Grenzwerts für die mittlere AS-Dauer von 39 Monaten klassifizierten wir 211 (44,4 %) Patienten als SP-AS, während 264 (55,6 %) als LP-AS eingestuft wurden, abhängig von ihrem medianen annualisierten $\Delta V_{\max} > 0,45$ und/oder ihrer mittleren AS-Dauer von 39 Monaten. Beide Cut-off-Werte waren bei 388 von 475 Patienten verfügbar, bei 87 Patienten war nur die klinische AS-Dauer verfügbar. Die Korrelationsanalyse zeigte jedoch, dass die AS- und die annualisierte ΔV_{\max} signifikant miteinander assoziiert waren (**Abbildung 3 C**), weshalb wir diese 87 Patienten in unsere Analyse einbezogen.

Die annualisierte ΔV_{\max} wurde berechnet, indem die älteste verfügbare Echokardiographie- V_{\max} -Messung von den Echokardiographiedaten vor der Operation abgezogen und durch die verstrichene Zeit geteilt wurde. Die mittlere Zeitspanne zwischen dem präoperativen und dem ältesten verfügbaren Echokardiographiebericht betrug 2,98 Jahre (Bereich: 0,01-10,22 Jahre).

Zur Bestimmung des jährlichen ΔV_{\max} wurde die folgende Formel verwendet (Surendran et al., 2020, Mateos et al., 2022):

Annualisierte ΔV_{\max} (m/s/Jahr) = (finaler V_{\max} – erster V_{\max}) / Δ Zeit,

wobei war „finaler V_{\max} “ die maximale Strahlgeschwindigkeit unmittelbar vor der Operation, „erster V_{\max} “ war die maximale Strahlgeschwindigkeit aus dem ältesten verfügbaren Echokardiographiebericht und/oder aus der Echokardiographie die innerhalb von 12 Monaten vor dem Klappenersatz liegt, und Δ Zeit ist die Zeit (in Jahren), die zwischen dem letzten und dem ersten Echokardiographiebericht liegt (Huo et al., 2003, Surendran et al., 2020, Yilmaz et al., 2004, Mateos et al., 2022, Gomez et al., 2015). Alle Patienten unterzogen sich wiederholten, mindestens 2 transthorakalen Echokardiogrammen, um das Fortschreiten der AS zu beurteilen.

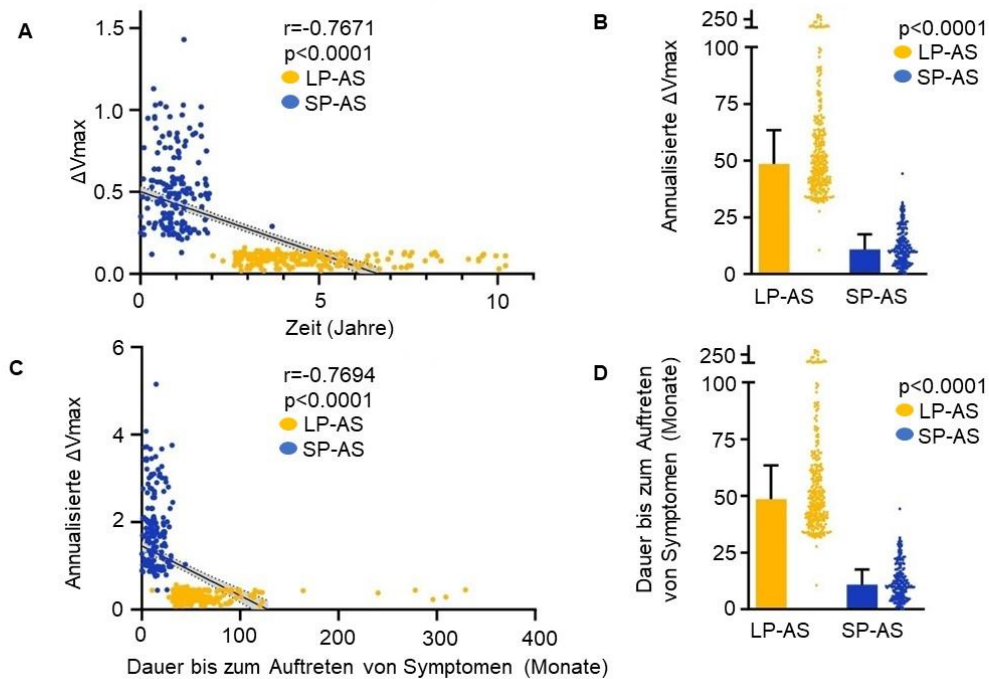


Abbildung 3: Bestimmung der schnell und langsam progredienten Aortenklappenstenose. Zwei Subgruppen von Patienten mit symptomatischer AS in Bezug auf schnelles und langsames Fortschreiten der Erkrankung wurden entweder durch wiederholte transthorakale echokardiographische Beurteilung in einer retrospektiven Analyse und/oder durch die mittlere Dauer von der ersten dokumentierten Diagnose der AS bis zum Auftreten erster AS-bezogener Symptome, insbesondere Angina pectoris, Dyspnoe \geq NYHA-Klasse II und Synkope, definiert als "AS-Dauer", identifiziert. **(A)** Das Diagramm stellt die Spearman-Korrelationsanalyse dar, um den Zusammenhang zwischen ΔV_{max} und Zeit (Jahre) zu bewerten ($r=-0,7671$, p -Wert $<0,0001$). Statistik: Spearman's Korrelationskoeffizient r . **(B)** Der Median der annualisierten ΔV_{max} wurde als Grenzwert verwendet, so dass zwei Subgruppen von Patienten mit SP-AS ($\Delta V_{max} >0,45$ m/s/Jahr) oder LP-AS ($\Delta V_{max} \leq 0,45$ m/s/Jahr) erkennbar waren, bis schwere Symptome auftraten, die einen chirurgischen Klappenersatz rechtfertigten. Die Grafik zeigt die Berechnung der echokardiographisch gemessenen annualisierten ΔV_{max} von Patienten, die als LP-AS ($n=204$) und SP-AS ($n=169$) charakterisiert wurden (LP-AS vs SP-AS; Median, IQR; $0,34$ ($0,225-0,43$) vs $1,752$ ($1,1-2,175$), $P<0,0001$). **(C)** Entsprechend der Dauer von der ersten dokumentierten AS bis zum Auftreten von AS-bezogenen Symptomen, die einen AK-Ersatz rechtfertigten (AS-Dauer), definierten wir auch einen Cut-off-Wert von einer mittleren AS-Dauer von 39 Monaten (Spanne von $0,17-329,2$ Monaten), bestimmt als Dauer von der ersten dokumentierten Diagnose der AS bis zum Auftreten der Symptome. Die Grafik zeigt die Spearman-Korrelationsanalyse zur Bewertung des Zusammenhangs zwischen der annualisierten ΔV_{max} und der Dauer bis zum Auftreten der Symptome (Monate) ($r=-0,7694$, p -Wert $<0,0001$). Statistik: Spearman's Korrelationskoeffizient r . **(D)** Die Grafik zeigt die Berechnung der Dauer bis zum Auftreten der Symptome (Monate) von Patienten, die als LP-AS ($n=238$) und SP-AS ($n=237$) charakterisiert wurden (LP-AS vs SP-AS; Median, IQR; $48,59$ ($40-63,48$) vs $10,83$ ($6,67-2,17,58$), $P<0,0001$). (B+D) Dargestellt: Median \pm Interquartilsbereich (IQR); Statistik: Mann-Whitney-U-Test (Mueller et al., 2024).

2.2. Computertomographische Darstellung der Aortenklappe und der Aorta

In einer Subgruppe von $n = 134$ Patienten wurde vor dem Klappenersatz eine Computertomographie der Aortenklappe und der Aorta durchgeführt.

Für die Analyse wurde die 3mensio Valves-Software (PIE Medical Imaging, Maastricht, Niederlande) verwendet.

Die erste Annulusebene wurde entsprechend den Ansatzstellen der Klappentaschen

definiert. Zur Quantifizierung des Verkalkungsgrades der Aortenwurzel wurde diese entlang ihrer doppel-obliquen Längsachse in zwei Bereiche unterteilt: der Bereich der Taschen erstreckte sich von der Anulusebene bis zur unter liegenden Koronararterie und der linksventrikuläre Ausflusstrakt (LVOT) von der Anulusebene bis 10 mm unmittelbar darunter. Diese Regionen wurden weiter in der Ringebene in drei verschiedene Sektoren unterteilt, die der nichtkoronaren (NCC), linkskoronaren (LCC) und rechtskoronaren (RCC) Tasche entsprechen. Die Verkalkung (mm^3) wurde mit einem vordefinierten 500-HU-Schwellenwert gemessen und bei Bedarf manuell angepasst (Rosenhek et al., 2000, Rosenhek et al., 2004). Diese Methode wurde der Standard-Agatston-Methode aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit vorgezogen.

2.3. Entnahme von Aortenklappengewebe zur Analyse

Die AK-Taschen wurden von 106 Patienten gewonnen, die sich zwischen Dezember 2014 und März 2021 einer AK-Ersatzoperation am Universitätsklinikum Tübingen unterzogen. Alle Klappen wurden nach der Entfernung pathologisch untersucht, und wenn der Verdacht auf Endokarditis bestand, wurden die Klappen für die vorliegende Analyse ausgeschlossen. Die Indikation zur Operation war bei unseren Patienten eine schwere symptomatische AS. Nach der chirurgischen Entfernung wurden die AK-Taschen sofort in eine eiskalte Lösung mit Natriumchlorid gelegt, in 4 % Paraformaldehyd bei 4 °C oder RNAlater (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) oder Tissue-TeK® (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) aufbewahrt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die durchschnittliche Verweilzeit von der Exzision bis zur Klappenbeschaffung betrug 30 Minuten.

Obwohl bei allen Patienten die klinische Diagnose einer schweren AS gestellt wurde, gab es pathologische Unterschiede im Ausmaß der Beteiligung der Aortenklappentasche.

2.3.1. Messungen der groben Verkalkung

Standardisierte Übersichtsbilder aller Aortenklappen wurden unter ähnlichen Aufnahmebedingungen erstellt: Klappenfragment auf schwarzem Hintergrund, gleiche Belichtung (Standardeinstellung der Frontkamera des Samsung Galaxy A70), gleicher Winkel (90 °) und gleicher Abstand (ca. 60 mm) zur Klappentasche. Der prozentuale Anteil der positiven Fläche kalzifizierter Knötchen wurde mit der Software NIS-Elements AR Version 5.21.00 64 bits berechnet. Bei allen AKs waren Teile des Ansatzes der Aortenwurzel und der Klappenspitze vorhanden, so dass die unkalzifizierten Abstandsmessungen

Rückschlüsse auf das Fortschreiten der Erkrankung zuließen. Die Dicke der Klappe wurde mit einem Messschieber in mm gemessen. Die Anzahl der Pixel wurde in der Software in mm umgerechnet, anschließend wurden die Gesamtfläche, die verkalkte Fläche, der Durchmesser und der Abstand vom äußeren Rand zur verkalkten Fläche gemessen und berechnet (Mosch et al., 2017).

2.3.2. Histologie

Formalin-fixierte, Paraffin-eingelegte Aortengewebeproben wurden mit einem Mikrotom (Leica, Jung Multicut) seriell in 6 µm Dicke präpariert. Die AK-Taschen wurden für die histologische und immunhistochemische Analyse vertikal präpariert. Die im Paraffin eingelegten Proben wurden angefärbt, um das schichtweise architektonische Muster zu veranschaulichen und die Kalkablagerungen in den ausgewählten AK-Taschenbereichen zu bestimmen. (Mosch et al., 2017). Zur morphologischen Beurteilung der Aortenklappen wurden die Schnitte mit den folgenden Färbungen gemäß den Anweisungen des Herstellers markiert: Hämatoxylin-Eosin, von Kossa (DIAPATH-Weinkauf Medizintechnik) zur Visualisierung von Kalzium und Movat-Pentachrom (DIAPATH-Weinkauf Medizintechnik) zur Visualisierung von Kollagen.

2.3.3. Immunohistochemie

Nach der Entparaffinierung durch absteigende Alkoholreihen (Roti®Histol, 100 % bis 70 % Alkohol) wurden die Gewebe im Zitratpuffer (pH 6) dreimal für 5 min in der Mikrowelle gekocht. Nach etwa 15-minütiger Abkühlung der Gewebe wurden sie dreimal für 5 min mit der phosphatgepufferten Salzlösung (PGS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durchgespült. Die Gewebe wurden 15 Minuten lang in 3%igem Hydroxidperoxid (Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert, gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Die Gewebe wurden mit serumfreier Blocklösung (Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA) unter Verwendung von 2 Tropfen der gebrauchsfertigen Lösung blockiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 30 µl der primären Antikörper und die entsprechende IgG-Kontrolle wurden aufgetragen und in PGS verdünnt. Für die Negativkontrolle wurden die primären Antikörper durch PGS ersetzt. Negative Kontrollfärbungen für unspezifische Bindungen wurden für die primären Antikörper mit geeigneten Immunglobulin-G-Kontrollantikörpern durchgeführt. Das Gewebe wurde über Nacht (14 Stunden) bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurden primäre Maus-Antihuman-CD68 (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), CD16 (Santa Cruz, Dallas, Texas,

USA), CD42b (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) und MIF-Antikörper (abcam, Cambridge, England) verwendet. Primäre Kaninchen-Antihuman-Antikörper wurden für TGFβ-1 (Santa Cruz) und BMP2 (BIOZOL Diagnostics, Eching, Deutschland) verwendet. Die Färbung von humanen Thromben diente als Positivkontrolle für die CD42b-, CD68- und CD16-Färbung, während TGFβ-1 und BMP2 im humanen Myokard untersucht wurden. Nach einem Waschschrift mit 0,05 % Tween20 (SIMGA ALDRICH, St. Louis Missouri, USA) in PGS erfolgte die Inkubation mit biotinylierten Anti-Maus/Kaninchen-Sekundärantikörpern (Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA).

Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten oder bis zu 1 Stunde in einer dunklen Kammer bei Raumtemperatur, gefolgt von einem Waschschrift mit 0,05 % Tween/PGS. 1-2 Tropfen Streptavidin-HRP-Konjugat von Dako (Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA) wurden für 10 Minuten hinzugefügt.

Nach dem letzten Waschschrift mit 0,05 % Tween/ PBS wurde das Gewebe mit dem DAB/LSAB-Kit (Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA) inkubiert.

Weitere Informationen zu allen Antikörpern und anderen wichtigen Quellen werden in der **Tabelle 2** dargestellt.

Die Inkubationsdauer wurde nach der makroskopischen Beurteilung der Schnitte beendet, sobald diese braun geworden waren. Schließlich wurden die Gewebe 3 Minuten lang mit Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt.

Die Gewebe wurden 15 Minuten lang unter fließendem kaltem Wasser gebläut. Danach wurde die aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt, und die Schnitte wurden schließlich in Roti®-Histokit (Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet und mit Deckgläsern versehen. Für die visuelle Interpretation der seriellen Schnitte wurde ein etabliertes Punktesystem verwendet, um eine halbquantitative Analyse der Daten zu ermöglichen. Die Anzahl der positiven Zellen pro Millimeterquadrat bzw. die Fläche des positiven Abschnitts pro gesamte Klappenfläche wurde für das gesamte Klappengewebe, für die Lamina fibrose (aortale Seite), die Lamina spongiosa (interstitielle Schicht) und gegebenenfalls die Lamina ventricularis (ventrikuläre Seite) bestimmt.

Tabelle 2: Hauptressourcentabelle Immunhistochemische Antikörper

<i>Immunhistochemische Antikörper</i>		
Antigen	Hersteller	Bestellnummer
Goat anti human IgG H&L	Abcam	Ab6858
Anti- MIF antibody	Abcam	Ab55445
Normal mouse IgG	Santa Cruz	Sc-2025
Goat Anti-Human IgG H&L (HRP) (ab6858)	Abcam	Ab6858
CD14 (UCH-M1)	Santa Cruz	Sc-1182

CD16 (DJ130c)	Santa Cruz	Sc-20052
CD68 (KP1)	Santa Cruz	Sc-20060
CD42b (E-8)	Santa Cruz	Sc-271171
Anti-CD3	Abcam	Ab16669
Anti-BMP-2	Bioss	bs-1012R
Anti-CD42b	Santa Cruz	Sc-7070
Anti-TGF- β 1	Santa Cruz	Sc-146-G
Rabbit Immunoglobulin Fraction (Solid-Phase Absorbed)	Agilent/ Dako	X0936
Immunhistologische Färbekits		
Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
LSAB2 Kits, Universal	Agilent/ Dako	K067511-2
DAB+ Chromogen, Liquid	Agilent/ Dako	K346811-2
Streptavidin (Conjugate) Streptavidin/HRP, Immunohistochemistry/ISH/Blot/ELISA, 1 mL	Agilent/ Dako	P039701-2
Proteinblock, Serum- free, Ready-to-use	Agilent/ Dako	X090930-2
Goat Serum (Normal, for Immunohistochemistry)	Agilent/ Dako	X090710-8
Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal)	Agilent/ Dako	X090302-8
Anti-Goat HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit	R&D Systems	CTS008
Anti-Mouse HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit	R&D Systems	CTS002
Histologische Färbekits		
Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Movat Pentachrom	DIAPATH /Weinkauf Medizintechnik	010247
Von Kossa	DIAPATH /Weinkauf Medizintechnik	010241
Mayers Hämalaunlösung	Merck	109249
Anderes histologisches Material		
Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Embedding cassettes Macrosette™	ROTH	EE16.1
Accessories Sponges for embedding cassettes	ROTH	TT56.1
Staining chamber StainTray™ black lid, for 20 microscope slides	ROTH	HA51.1
Staining through (Glass)	ROTH	H554.1
Staining trough ROTILABO®, blue	ROTH	HA44.1
Formaldehyd-solution 4 % buffered , 1 L	Fischar	27279
Hydrogen peroxide	ROTH	CP26.4
ROTI®Histol, 5 l	ROTH	6640.5
ROTI®Histokitt, 100 ml	ROTH	6638.1
Super PAP Pen Liquid Blocker new	Science Services	N71310-N
PBS Tablets	Thermo Fisher Scientific	18912014
Tween 20	SigmaAldrich	8221840500

2.3.4. Mikroskopie

Aortengewebeschnitte wurden mit dem Nikon Eclipse Ni-Mikroskop visualisiert und die Bilder wurden mit der Nikon-Kamera aufgenommen. Die formalinfixierten Aortenklappen mit unterschiedlichem Grad der makroskopischen Erkrankung wurden auf das Vorhandensein von Verkalkungsbereichen untersucht. Die Analysen wurden verblindet von 2 Erstuntersuchern durchgeführt und die Ergebnisse wurden von einem geschulten kardiovaskulären Pathologen mit einem Querverweis versehen.

2.4. Genexpressionsanalyse mit der NanoString®-Technologie

Die Expression von Ribonukleinsäure (RNA)-Profilen wurde mit dem nCounter Human Immunology v2 Panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, Washington, USA) bewertet. Die Gesamt-RNA wurde aus sechs Schnitten formalinfixierter, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten mit dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. RNA-Ausbeute und -Reinheit wurden mit dem NanoDrop ND-1000-Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, USA) bewertet. Die mRNA-Expression wurde mit dem NanoString nCounter Analysis System (NanoString Technologies, Seattle, USA) unter Verwendung von 100 ng der Gesamt-RNA gemessen. Das nCounter Human Immunology v2 Panel wurde durchgeführt und 18 Stunden lang bei 65 °C an die Gesamt-RNA hybridisiert. Die Beladung der nCounter Prep Station und die Quantifizierung der Expression mit dem nCounter Digital Analyzer erfolgten wie vom Hersteller empfohlen. Die Expressionsdaten wurden mit Hilfe der NanoString nSolver Analysis Software v3.0 analysiert. Die Qualitätskontrolle der Daten erfolgte unter Verwendung der Standardeinstellungen der nSolver-Software und durch Analyse der Anzahl der Positiv- und Negativkontrollen, der Housekeeper und der Gesamtzahlen (ohne Kontrollen) sowie der Bindungsdichten in jeder Probe. Alle in dieser Studie dargestellten Proben bestanden die Qualitätskontrollbedingungen, keine wurde von der Studie ausgeschlossen. Die aggregative Cluster-Heatmap-Analyse unter Verwendung des Pearson-Korrelationsabstandsmaßes wurde mit der nSolver-Software gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Eine vollständige Liste der Gene findet sich in der **Tabelle 3** unten.

Tabelle 3: Nano-String mRNA-Profilierung. Vollständige Liste der 594 getesteten Gene mit Namen und Hinterlegungsnummer in alphabetischer Reihenfolge.

Gen-Name	Beitritt #	Gen-Name	Beitritt #	Gen-Name	Beitritt #
ABCB1	NM_000927.3	BST2	NM_004335.2	CCL15	NM_032965.3
ABL1	NM_005157.3	BTK	NM_000061.1	CCL16	NM_004590.2
ADA	NM_000022.2	BTLA	NM_181780.2	CCL18	NM_002988.2
AHR	NM_001621.3	C14orf166	NM_016039.2	CCL19	NM_006274.2
AICDA	NM_020661.1	C1QA	NM_015991.2	CCL2	NM_002982.3
AIRE	NM_000383.2	C1QB	NM_000491.3	CCL20	NM_004591.1
APP	NM_000484.3	C1QBP	NM_001212.3	CCL22	NM_002990.3
ARG1	NM_000045.2	C1R	NM_001733.4	CCL23	NM_145898.1
ARG2	NM_001172.3	C1S	NM_001734.2	CCL24	NM_002991.2
ARHGDI3	NM_001175.4	C2	NM_000063.3	CCL26	NM_006072.4
ATG10	NM_001131028.1	C3	NM_000064.2	CCL3	NM_002983.2
ATG12	NM_004707.2	C4A/B	NM_007293.2	CCL4	NM_002984.2
ATG16L1	NM_198890.2	C4BPA	NM_000715.3	CCL5	NM_002985.2
ATG5	NM_004849.2	C5	NM_001735.2	CCL7	NM_006273.2
ATG7	NM_001136031.2	C6	NM_000065.2	CCL8	NM_005623.2
ATM	NM_000051.3	C7	NM_000587.2	CCND3	NM_001760.2
B2M	NM_004048.2	C8A	NM_000562.2	CCR1	NM_001295.2
B3GAT1	NM_018644.3	C8B	NM_000066.2	CCR10	NM_016602.2
BATF	NM_006399.3	C8G	NM_000606.2	CCR2	NM_001123041.2
BATF3	NM_018664.2	C9	NM_001737.3	CCR5	NM_000579.1
BAX	NM_138761.3	CAMP	NM_004345.3	CCR6	NM_031409.2
BCAP31	NM_005745.7	CARD9	NM_052813.4	CCR7	NM_001838.2
BCL10	NM_003921.2	CASP1	NM_001223.3	CCR8	NM_005201.2
BCL2	NM_000657.2	CASP10	NM_032977.3	CCRL1	NM_016557.2
BCL2L11	NM_138621.4	CASP2	NM_032982.2	CCRL2	NM_003965.4
BCL3	NM_005178.2	CASP3	NM_032991.2	CD14	NM_000591.2
BCL6	NM_001706.2	CASP8	NM_001228.4	CD160	NM_007053.2
BID	NM_001196.2	CCBP2	NM_001296.3	CD163	NM_004244.4
BLNK	NM_013314.2	CCL11	NM_002986.2	CD164	NM_006016.4
BST1	NM_004334.2	CCL13	NM_005408.2	CD19	NM_001770.4
CD1A	NM_001763.2	CD59	NM_000611.4	CIITA	NM_000246.3
CD1D	NM_001766.3	CD6	NM_006725.3	CISH	NM_145071.2
CD2	NM_001767.3	CD7	NM_006137.6	CLEC4A	NM_194448.2
CD209	NM_021155.2	CD70	NM_001252.2	CLEC4E	NM_014358.2
CD22	NM_001771.2	CD74	NM_001025159.1	CLEC5A	NM_013252.2

CD24	NM_013230.2
CD244	NM_016382.2
CD247	NM_198053.1
CD27	NM_001242.4
CD274	NM_014143.3
CD276	NM_001024736.1
CD28	NM_001243078.1
CD34	NM_001025109.1
CD36	NM_001001548.2
CD3D	NM_000732.4
CD3E	NM_000733.2
CD3EAP	NM_012099.1
CD4	NM_000616.4
CD40	NM_001250.4
CD40LG	NM_000074.2
CD44	NM_001001392.1
CD45R0	NM_080921.3
CD45RA	NM_002838.4
CD45RB	ENST00000367367.1
CD46	NM_172350.1
CD48	NM_001778.2
CD5	NM_014207.2
CD53	NM_001040033.1
CD55	NM_000574.3
CD58	NM_001779.2
CXCL13	NM_006419.2
CXCL2	NM_002089.3
CXCL9	NM_002416.1
CXCR1	NM_000634.2
CXCR2	NM_001557.2
CXCR3	NM_001504.1
CXCR4	NM_003467.2
CXCR6	NM_006564.1
CYBB	NM_000397.3

CD79A	NM_001783.3
CD79B	NM_021602.2
CD80	NM_005191.3
CD81	NM_004356.3
CD82	NM_002231.3
CD83	NM_004233.3
CD86	NM_175862.3
CD8A	NM_001768.5
CD8B	NM_004931.3
CD9	NM_001769.2
CD96	NM_005816.4
CD97	NM_078481.2
CD99	NM_002414.3
CDH5	NM_001795.3
CDKN1A	NM_000389.2
CEACAM1	NM_001712.3
CEACAM6	NM_002483.4
CEACAM8	NM_001816.3
CEBPB	NM_005194.2
CFB	NM_001710.5
CFD	NM_001928.2
CFH	NM_001014975.2
CFI	NM_000204.3
CFP	NM_002621.2
CHUK	NM_001278.3
FCGR2B	NM_001002273.1
FCGR3A/B	NM_000570.4
FCGRT	NM_004107.4
FKBP5	NM_001145775.1
FN1	NM_212482.1
FOXP3	NM_014009.3
FYN	NM_002037.3
GATA3	NM_001002295.1
GBP1	NM_002053.1

CLEC6A	NM_001007033.1
CLEC7A	NM_197954.2
CLU	NM_001831.2
CMKLR1	NM_004072.1
CR1	NM_000651.4
CR2	NM_001006658.1
CRADD	NM_003805.3
CSF1	NM_000757.4
CSF1R	NM_005211.2
CSF2	NM_000758.2
CSF2RB	NM_000395.2
CSF3R	NM_156038.2
CTLA4-TM	NM_005214.3
CTLA4_all	NM_005214.3
CTNNB1	NM_001098210.1
CTSC	NM_001814.4
CTSG	NM_001911.2
CTSS	NM_004079.3
CUL9	NM_015089.2
CX3CL1	NM_002996.3
CX3CR1	NM_001337.3
CXCL1	NM_001511.1
CXCL10	NM_001565.1
CXCL11	NM_005409.4
CXCL12	NM_000609.5
HLA-DQB1	NM_002123.3
HLA-DRA	NM_019111.3
HLA-DRB1	NM_002124.2
HLA-DRB3	NM_022555.3
HRAS	NM_005343.2
ICAM1	NM_000201.2
ICAM2	NM_000873.3
ICAM3	NM_002162.3
ICAM4	NM_001039132.1

DEFB1	NM_005218.3
DEFB103A	NM_001081551.2
DEFB103B	NM_018661.3
DEFB4A	NM_004942.2
DPP4	NM_001935.3
DUSP4	NM_057158.2
EBI3	NM_005755.2
EDNRB	NM_003991.2
EGR1	NM_001964.2
EGR2	NM_000399.3
ENTPD1	NM_001098175.1
EOMES	NM_005442.2
ETS1	NM_005238.3
FADD	NM_003824.2
FAS	NM_000043.3
FCAR	NM_133280.1
FCER1A	NM_002001.2
FCER1G	NM_004106.1
FCGR1A/B	NM_000566.3
FCGR2A	NM_021642.3
FCGR2A/C	NM_201563.4
IKZF1	NM_006060.3
IKZF2	NM_016260.2
IKZF3	NM_183232.2
IL10	NM_000572.2
IL10RA	NM_001558.2
IL11RA	NM_147162.1
IL12A	NM_000882.2
IL12B	NM_002187.2
IL12RB1	NM_005535.1
IL13	NM_002188.2
IL13RA1	NM_001560.2
IL15	NM_172174.1
IL16	NM_004513.4
IL17A	NM_002190.2
IL17B	NM_014443.2
IL17F	NM_052872.3
IL18	NM_001562.2

GBP5	NM_052942.3
GFI1	NM_005263.2
GNLY	NM_006433.2
GP1BB	NM_000407.4
GPI	NM_000175.2
GPR183	NM_004951.3
GZMA	NM_006144.2
GZMB	NM_004131.3
GZMK	NM_002104.2
HAMP	NM_021175.2
HAVCR2	NM_032782.3
HFE	NM_139011.2
HLA-A	NM_002116.5
HLA-B	NM_005514.6
HLA-C	NM_002117.4
HLA-DMA	NM_006120.3
HLA-DMB	NM_002118.3
HLA-DOB	NM_002120.3
HLA-DPA1	NM_033554.2
HLA-DPB1	NM_002121.4
HLA-DQA1	NM_002122.3
IL21	NM_021803.2
IL21R	NM_021798.2
IL22	NM_020525.4
IL22RA2	NM_181310.1
IL23A	NM_016584.2
IL23R	NM_144701.2
IL26	NM_018402.1
IL27	NM_145659.3
IL28A	NM_172138.1
IL28A/B	NM_172139.2
IL29	NM_172140.1
IL2RA	NM_000417.1
IL2RB	NM_000878.2
IL2RG	NM_000206.1
IL3	NM_000588.3
IL32	NM_001012633.1
IL4	NM_000589.2

ICAM5	NM_003259.3
ICOS	NM_012092.2
ICOSLG	NM_015259.4
IDO1	NM_002164.3
IFI16	NM_005531.1
IFI35	NM_005533.3
IFIH1	NM_022168.2
IFIT2	NM_001547.4
IFITM1	NM_003641.3
IFNA1/13	NM_024013.1
IFNA2	NM_000605.3
IFNAR1	NM_000629.2
IFNAR2	NM_000874.3
IFNB1	NM_002176.2
IFNG	NM_000619.2
IFNGR1	NM_000416.1
IGF2R	NM_000876.1
IKBKAP	NM_003640.3
IKBKB	NM_001556.1
IKBKE	NM_014002.2
IKBKG	NM_003639.2
IRAK4	NM_016123.1
IRF1	NM_002198.1
IRF3	NM_001571.5
IRF4	NM_002460.1
IRF5	NM_002200.3
IRF7	NM_001572.3
IRF8	NM_002163.2
IRGM	NM_001145805.1
ITGA2B	NM_000419.3
ITGA4	NM_000885.4
ITGA5	NM_002205.2
ITGA6	NM_000210.1
ITGAE	NM_002208.4
ITGAL	NM_002209.2
ITGAM	NM_000632.3
ITGAX	NM_000887.3
ITGB1	NM_033666.2

IL18R1	NM_003855.2
IL18RAP	NM_003853.2
IL19	NM_013371.3
IL1A	NM_000575.3
IL1B	NM_000576.2
IL1R1	NM_000877.2
IL1R2	NM_173343.1
IL1RAP	NM_002182.2
IL1RL1	NM_016232.4
IL1RL2	NM_003854.2
IL1RN	NM_000577.3
IL2	NM_000586.2
IL20	NM_018724.3
KIR_Inhibiting_Subgroup_2	NM_014511.3
KIT	NM_000222.2
KLRAP1	NR_028045.1
KLRB1	NM_002258.2
KLRC1	NM_002259.3
KLRC2	NM_002260.3
KLRC3	NM_007333.2
KLRC4	NM_013431.2
KLRD1	NM_002262.3
KLRF1	NM_016523.1
KLRF2	NM_001190765.1
KLRG1	NM_005810.3
KLRG2	NM_198508.2
KLRK1	NM_007360.1
LAG3	NM_002286.5
LAIR1	NM_002287.3
LAMP3	NM_014398.3
LCK	NM_005356.2
LCP2	NM_005565.3

IL4R	NM_000418.2
IL5	NM_000879.2
IL6	NM_000600.1
IL6R	NM_000565.2
IL6ST	NM_002184.2
IL7	NM_000880.2
IL7R	NM_002185.2
IL8	NM_000584.2
IL9	NM_000590.1
ILF3	NM_001137673.1
IRAK1	NM_001569.3
IRAK2	NM_001570.3
IRAK3	NM_007199.1
LILRB3	NM_006864.2
LILRB4	NM_001081438.1
LILRB5	NM_001081442.1
LITAF	NM_004862.3
LTA	NM_000595.2
LTB4R	NM_181657.3
LTB4R2	NM_019839.4
LTBR	NM_002342.1
LTF	NM_002343.2
LY96	NM_015364.2
MAF	NM_005360.4
MALT1	NM_006785.2
MAP4K1	NM_007181.3
MAP4K2	NM_004579.2
MAP4K4	NM_004834.3
MAPK1	NM_138957.2
MAPK11	NM_002751.5
MAPK14	NM_001315.1
MAPKAPK2	NM_004759.3

ITGB2	NM_000211.2
ITLN1	NM_017625.2
ITLN2	NM_080878.2
JAK1	NM_002227.1
JAK2	NM_004972.2
JAK3	NM_000215.2
KCNJ2	NM_000891.2
KIR3DL1	NM_013289.2
KIR3DL2	NM_006737.2
KIR3DL3	NM_153443.3
KIR_Activating_Subgroup_1	NM_001083539.1
KIR_Activating_Subgroup_2	NM_014512.1
KIR_Inhibiting_Subgroup_1	NM_014218.2
MSR1	NM_002445.3
MUC1	NM_001018017.1
MX1	NM_002462.2
MYD88	NM_002468.3
NCAM1	NM_000615.5
NCF4	NM_000631.4
NCR1	NM_004829.5
NFATC1	NM_172389.1
NFATC2	NM_012340.3
NFATC3	NM_004555.2
NFIL3	NM_005384.2
NFKB1	NM_003998.2
NFKB2	NM_002502.2
NFKBIA	NM_020529.1
NFKBIZ	NM_001005474.1
NLRP3	NM_001079821.2
NOD1	NM_006092.1
NOD2	NM_022162.1
NOS2	NM_000625.4

LEF1	NM_016269.3
LGALS3	NM_001177388.1
LIF	NM_002309.3
LILRA1	NM_006863.1
LILRA2	NM_006866.2
LILRA3	NM_006865.3
LILRA4	NM_012276.3
LILRA5	NM_181879.2
LILRA6	NM_024318.2
LILRB1	NM_001081637.1
LILRB2	NM_005874.1
PLA2G2A	NM_000300.2
PLA2G2E	NM_014589.1
PLAU	NM_002658.2
PLAUR	NM_001005376.1
PML	NM_002675.3
POU2F2	NM_002698.2
PPARG	NM_015869.3
PPBP	NM_002704.2
PRDM1	NM_001198.3
PRF1	NM_005041.3
PRKCD	NM_006254.3
PSMB10	NM_002801.2
PSMB5	NM_001130725.1
PSMB7	NM_002799.2
PSMB8	NM_004159.4
PSMB9	NM_002800.4
PSMC2	NM_002803.3
PSMD7	NM_002811.3
PTAFR	NM_000952.3
PTGER4	NM_000958.2
PTGS2	NM_000963.1
PTK2	NM_005607.3
PTPN2	NM_002828.2
PTPN22	NM_015967.4
PTPN6	NM_002831.5
PTPRC_all	NM_080921.2

MARCO	NM_006770.3
MASP1	NM_139125.3
MASP2	NM_139208.1
MBL2	NM_000242.2
MBP	NM_002385.2
MCL1	NM_021960.3
MIF	NM_002415.1
MME	NM_000902.2
MR1	NM_001531.2
MRC1	NM_002438.2
MS4A1	NM_152866.2
RARRES3	NM_004585.3
RELA	NM_021975.2
RELB	NM_006509.2
RORC	NM_001001523.1
RUNX1	NM_001754.4
S100A8	NM_002964.3
S100A9	NM_002965.2
S1PR1	NM_001400.3
SELE	NM_000450.2
SELL	NR_029467.1
SELPLG	NM_003006.3
SERPING1	NM_000062.2
SH2D1A	NM_001114937.2
SIGIRR	NM_021805.2
SKI	NM_003036.2
SLAMF1	NM_003037.2
SLAMF6	NM_001184714.1
SLAMF7	NM_021181.3
SLC2A1	NM_006516.2
SMAD3	NM_005902.3
SMAD5	NM_005903.5
SOCS1	NM_003745.1
SOCS3	NM_003955.3
SPP1	NM_000582.2
SRC	NM_005417.3
STAT1	NM_007315.2

NOTCH1	NM_017617.3
NOTCH2	NM_024408.3
NT5E	NM_002526.2
PAX5	NM_016734.1
PDCD1	NM_005018.1
PDCD1LG2	NM_025239.3
PDCD2	NM_144781.2
PDGFB	NM_033016.2
PDGFRB	NM_002609.3
PECAM1	NM_000442.3
PIGR	NM_002644.2
STAT5B	NM_012448.3
STAT6	NM_003153.3
SYK	NM_003177.3
TAGAP	NM_054114.3
TAL1	NM_003189.2
TAP1	NM_000593.5
TAP2	NM_000544.3
TAPBP	NM_003190.4
TBK1	NM_013254.2
TBX21	NM_013351.1
TCF4	NM_003199.1
TCF7	NM_003202.2
TFRC	NM_003234.1
TGFB1	NM_000660.3
TGFBI	NM_000358.2
TGFBR1	NM_004612.2
TGFBR2	NM_001024847.1
THY1	NM_006288.2
TICAM1	NM_014261.1
TIGIT	NM_173799.2
TIRAP	NM_148910.2
TLR1	NM_003263.3
TLR2	NM_003264.3
TLR3	NM_003265.2
TLR4	NM_138554.2
TLR5	NM_003268.3

PYCARD	NM_013258.3
RAF1	NM_002880.2
RAG1	NM_000448.2
RAG2	NM_000536.3

STAT2	NM_005419.2
STAT3	NM_139276.2
STAT4	NM_003151.2
STAT5A	NM_003152.2

TLR7	NM_016562.3
TLR8	NM_016610.2
TLR9	NM_017442.2
TMEM173	NM_198282.1

Gen-Name	Beitritt #
TNF	NM_000594.2
TNFAIP3	NM_006290.2
TNFAIP6	NM_007115.2
TNFRSF10C	NM_003841.3
TNFRSF11A	NM_003839.2
TNFRSF13B	NM_012452.2
TNFRSF13C	NM_052945.3
TNFRSF14	NM_003820.2
TNFRSF17	NM_001192.2
TNFRSF1B	NM_001066.2
TNFRSF4	NM_003327.2
TNFRSF8	NM_152942.2
TNFRSF9	NM_001561.4
TNFSF10	NM_003810.2
TNFSF11	NM_003701.2
TNFSF12	NM_003809.2
TNFSF13B	NM_006573.4
TNFSF15	NM_001204344.1
TNFSF4	NM_003326.2
TNFSF8	NM_001244.3
TOLLIP	NM_019009.2
TP53	NM_000546.2
TRAF1	NM_005658.3
TRAF2	NM_021138.3
TRAF3	NM_145725.1
TRAF4	NM_004295.2
TRAF5	NM_004619.3
TRAF6	NM_145803.1
TYK2	NM_003331.3
UBE2L3	NM_198157.1

Gen-Name	Beitritt #
VCAM1	NM_001078.3
VTN	NM_000638.3
XBP1	NM_005080.2
XCL1	NM_002995.1
XCR1	NM_005283.2
ZAP70	NM_001079.3
ZBTB16	NM_006006.4
ZEB1	NM_001128128.1
sCTLA4	NM_001037631.1
ABCF1	NM_001090.2
ALAS1	NM_000688.4
EEF1G	NM_001404.4
G6PD	NM_000402.2
GAPDH	NM_002046.3
GUSB	NM_000181.1
HPRT1	NM_000194.1
OAZ1	NM_004152.2
POLR1B	NM_019014.3
POLR2A	NM_000937.2
PPIA	NM_021130.2
RPL19	NM_000981.3
SDHA	NM_004168.1
TBP	NM_001172085.1
TUBB	NM_178014.2

2.5. Messung des Plasmaspiegels von Zytokinen und Chemokinen (LEGENDPlex)

Die Konzentrationen spezifischer Zytokine und Chemokine in gefrorenen Plasmaproben wurden mittels LEGENDPlex Inflammation Panel 1 und LEGENDPlex Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA) bestimmt. Die Proben wurden gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die Messung wurde das FACS Lyric (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet, und die Datenanalyse erfolgte mit der LEGENDPlex Data Analysis Software (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt.

2.6. Statistische Analyse

Es wurde eine statistische Analyse der klinischen und labortechnischen Ausgangscharakteristika aller Patienten in Bezug auf die gemessenen Thrombozyten- und Monozyten-Phänotypen, die Markerexpression und AK-Morphologie durchgeführt.

Nicht normalverteilte kontinuierliche Daten werden als Median mit Interquartilabstand (IQR) dargestellt, und normalverteilte kontinuierliche Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) dargestellt.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde für zwei Gruppenvergleiche für nicht normalverteilte kontinuierliche Variablen durchgeführt, und normalverteilte kontinuierliche Variablen wurden unter Verwendung des Student-T-Tests verglichen.

Kategoriale Variablen werden als Gesamtzahlen und Proportionen der Teilnehmer dargestellt, und der Vergleich wurde unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt.

Die Korrelationsanalyse wurde anhand des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet.

Die Nanostring®-Daten wurden mit JMP® Version 16.0.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) und dem darin implementierten Student's t-Test analysiert. Die Ergebnisse wurden Log²-transformiert, und der Standardfehler des Mittelwertes wurde in einem Streudiagramm und einem Vulkandiagramm aufgetragen, was die signifikanten ($p < 0,05$) Veränderungen zwischen Patienten mit schnell und langsam progredienter Aortenstenose zeigt. Zur Klassifizierung der signifikant regulierten Veränderungen wurde eine KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pfadanalyse mit RStudio Version 1.4.1717 (RStudio Inc. Boston, MA, USA; Paket "PathfindR") durchgeführt. Es wurde die Bonferroni-Methode ($p < 0,01$) und der Greedy-Algorithmus zur Suche nach aktiven Teilnetzen verwendet. Ein hierarchisches Clustering der 50 am stärksten differenziell exprimierten Gene wurde mit dem RStudio-Paket "pHeatmap" durchgeführt. Die Z-Scores der Mittelwerte wurden

entsprechend der Hochregulierung bei schnell (blau) oder langsam progredienter Aortenstenose (orange) eingefärbt. Außerdem wurde eine Heatmap mit zeilenweisen Vergleichen der Nanostring®-Daten erstellt. Die beobachteten z-Scores von Genen, die zum MIF-Signalweg (blau) und zum TGF- β 1-Signalweg (orange) gehören, wurden gemäß der PathCards-Online-Datenbank aufgetragen. Um die Korrelationen wichtiger Parameter bei Patienten mit schnell und langsam progredienter Aortenstenose zusammenzufassen, wurde mit Rstudio "Corrplot" eine Matrix erstellt, die die Korrelationen zwischen klinischen Parametern und Ex-vivo-Tests anzeigt. Spearman's ρ wird farbig dargestellt und Farbintensität und Größe sind proportional zu den Korrelationskoeffizienten. Wichtige Ergebnisse dieser Studie werden mit Hilfe des Rstudio-Pakets "Circlize" als Akkorddiagramm dargestellt. Signifikante ($p < 0,05$) Veränderungen der klinischen Parameter und Ex-vivo-Daten sowie differenziell exprimierte Genwege zwischen Patienten mit schnell (blau) und langsam (orange) fortschreitender Aortenstenose wurden dargestellt und entsprechend ihrer Untersuchung eingefärbt. Die Vergleiche galten als statistisch signifikant, wenn der zweiseitige p-Wert $\leq 0,050$ war.

Alle statistischen Analysen wurden mit der IBM SPSS Statistics Software Version 26 (SPSS, Inc.) und GraphPad Prism Version 8.4.0 (GraphPad Software) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Merkmale und Klappenpathologie von Patienten mit langsam und schnell progredienter Aortenstenose zeigen signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Um einen tieferen Einblick in die pathophysiologischen Mechanismen von schnell (SP-) und langsam progredienter (LP) AS zu erhalten, untersuchten wir prospektiv eine große konsekutive Kohorte von 475 Patienten, die in unsere Klinik wegen symptomatischer schwerer AS mit Indikation zum chirurgischen Klappenersatz stationär aufgenommen worden (**Tabelle 4**).

Wir identifizierten die 2 Untergruppen von Patienten durch wiederholte transthorakale Echokardiographien wie im Abschnitt "Materialien und Methoden" beschrieben - die annualisierte Änderung der maximalen transvalvulären Geschwindigkeit über die AK $\Delta V_{max} \geq 0,45$ m/s/Jahr und eine mittlere Symptombdauer von 14,4 Monaten (Bereich von 1 bis 98 Monaten) wurden als festgelegte Grenzwerte für das Fortschreiten der Krankheit verwendet (**Abbildung 3**).

Dabei wurden 237 (49,9 %) Patienten als SP-AS eingestuft, während 238 (50,1 %) durch den medianen $\Delta V_{max} < 0,45$ m/s/Jahr als LP-AS kategorisiert wurden.

Tabelle 4: Das Design der Patientenkohorte.

Parameter	Alle Patienten, N=475	LP-AS, N=238	SP-AS, N=237	p-Wert
Klinische Charakteristiken				
<i>Alter, Jahre</i>	77 (69-82)	79 (71.0-83.0)	75.0 (68.0-80.0)	<0.001
<i>Männliches Geschlecht</i>	287 (60.4)	152 (57.6)	135 (64)	0.156
<i>BMI (kg/m²)</i>	27.2 (24.3-31.2)	27.5 (24.3-31.2)	27.0 (24.3-31.1)	0.902
<i>RR sys (mmHg)</i>	135 (120-150)	140 (120-150)	130 (120-150)	0.241
<i>NYHA Klasse > II</i>	245 (51.6)	130 (49.2)	115 (54.5)	0.188
Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Komorbiditäten				
<i>Koronare Herzkrankheit</i>				
<i>1-Gefäß</i>	75 (15.8)	40 (15.2)	35 (16.6)	
<i>2- Gefäß</i>	66 (13.9)	37 (14.0)	29 (13.7)	0.844
<i>3- Gefäß</i>	89 (18.7)	47 (17.8)	42 (19.9)	
<i>ACVB</i>	23 (4.8)	15 (5.7)	8 (3.8)	
<i>Rauchen</i>	67 (14.1)	34 (12.9)	33 (15.6)	0.521
<i>Hyperlipidämie</i>	212 (44.6)	124 (47.0)	88 (41.7)	0.138
<i>Diabetes mellitus</i>	122 (25.7)	71 (26.9)	51 (24.2)	0.367
<i>Arterielle Hypertonie</i>	366 (77.1)	204 (77.3)	162 (76.8)	0.976
<i>Vorhofflimmern</i>	159 (33.5)	97 (36.7)	62 (29.4)	0.083
<i>Pulmonale Hypertonie (mm Hg)</i>	206 (43.4)	120 (45.5)	86 (40.1)	0.265
<i>Bikuspide Aortenklappe</i>	33 (6.9)	15 (5.7)	18 (8.5)	0.216
<i>STS-Score</i>	2.8 (1.57-6.7)	2.87 (1.64-9.88)	2.66 (1.43-4.76)	0.004
Elektro- und echokardiographische Parameter				
<i>LVEF, %</i>	60 (45-60)	60 (47-60)	60 (40-60)	0.218
<i>Schlagvolumen (ml)</i>	76,8 (60-96,5)	73,1 (60,5-91,9)	81,9 (58,9-100)	0,060
<i>Schlagvolumen (ml/m²)</i>	40,6 (31,7-52,5)	39,4 (32,2-49,5)	44 (30,8-57,2)	0,083
<i>Mean pressure Gradient (mmHg) AK</i>	42 (32.0-50.0)	43 (33.25-51.75)	41.0 (30-48.75)	0.027
<i>Peak pressure Gradient (mmHg) AK</i>	70 (55.75-84.0)	73 (59.75-85.25)	66 (52-80.75)	0.009
<i>KÖF (cm²)</i>	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.87)	0.7 (0.6-0.9)	0.693
<i>Herzfrequenz (bpm)</i>	72 (64-85)	72 (65-84)	73.5 (64-86.3)	0.706
Medikation				
<i>ASS</i>	229 (48.2)	131 (49.6)	98 (46.4)	0.812
<i>Thrombozytenhemmung</i>	82 (17.3)	50 (18.9)	32 (15.2)	0.457
<i>Orale Antikoagulation</i>	105 (22.1)	60 (22.7)	45 (21.3)	0.837
<i>Antihypertensive Therapie</i>	304 (64.0)	173 (65.5)	131 (62.1)	0.683
<i>Aldosteron Antagonisten</i>	76 (16.0)	38 (14.4)	38 (18.0)	0.232
<i>Diuretika</i>	234 (49.3)	129 (48.9)	105 (49.8)	0.589
<i>Beta Blocker</i>	229 (48.2)	127 (48.1)	102 (48.3)	0.751
<i>Statine</i>	256 (53.9)	151 (57.2)	105 (49.8)	0.147
Laborparameter				
<i>Leukozyten (1000/μL)</i>	7090 (6080-8393)	7050 (5955-8325)	7140 (6155-	0.563
<i>Hb (g/dL)</i>	12.7 (11.5-13.8)	12.5 (11.3-13.8)	12.9 (11.9-14)	0.071
<i>Thrombozyten (1000/μL)</i>	212 (181-259)	212.5 (181.8-	211.0 (180-264)	0.672
<i>GFR-MDRD (ml/m²)</i>	69.9 (52.8-85.1)	68.7 (52.6-84.6)	73.5 (53.2-87.0)	0.180
<i>CRP (mg/dL)</i>	0.28 (0.1-0.9)	0.26 (0.093-0.84)	0.32 (0.11-0.95)	0.263
<i>hs TNI (mg/L)</i>	0.06 (0.03-5.0)	0.05 (0.03-2.45)	0.07 (0.03-10.5)	0.359
<i>NT-pro-BNP (ng/L)</i>	429 (201-1165)	411.5 (203.8-	461.0 (187-	0.893
<i>Serum Kreatinine (mg/dL)</i>	1.0 (0.8-1.2)	1.0 (0.8-1.2)	1.0 (0.8-1.2)	0.801
<i>Gesamt Cholesterin (mg/dL)</i>	171 (141.5-203)	171.0 (142-202)	172.5 (139.8-	0.794
<i>LDL (mg/dL)</i>	95.0 (69-129)	91.0 (69.5-129)	99 (68-129)	0.638

Werte werden als Zahlen (n) und Prozent (%) oder als Median und Interquartilsbereich (IQB) angegeben. AS – Aortenstenose, ASS – Acetylsalicylsäure, AK – Aortenklappe, BMI – Body-Mass-Index, ACVB – aorto-koronare Venen-Bypass-Operation, CK – Kreatininkinase, CRP – C-reaktives Protein, GFR-MDRD – glomeruläre Filtrationsrate, Hb – Hämoglobin, HDL – High Density Lipoprotein, hs TNI – hoch sensitives Troponin I, KÖF – Klappenöffnungsfläche, LDL – Low Density Lipoprotein, LP-AS – langsam progrediente AS, LVEF – linksventrikuläre Pumpfunktion, NT-pro-BNP – N-terminales natriuretisches Peptid vom Typ B, SP-AS – schnell progrediente AS, STS - The Society of Thoracic Surgeons.

Patienten mit SP-AS waren jünger (LP-AS vs. SP-AS; Median, IQR; 79 (71 - 83) vs. 76 (69 - 81), $p < 0,001$), hatten einen etwas niedrigeren STS-Risikoscore (Vahanian et al., 2021, Otto et al., 2021) ($p = 0,021$) und zeigten eine geringere Inzidenz von Vorhofflimmern ($p = 0,012$).

Die transvalvuläre Flussgeschwindigkeit, angegeben durch den mittleren und maximalen Druckgradienten (P_{mean} , P_{max}), die Aortenklappenfläche und das Schlagvolumen waren in beiden Gruppen ähnlich (**Tabelle 4**).

Es gab keine statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen in Bezug auf Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI), NYHA-Klassifikation, kardiovaskuläre Komorbiditäten oder begleitende Medikation zum Zeitpunkt des Klappenersatzes (**Tabelle 4**).

In einer Subgruppe von $n = 134$ Patienten wurde eine Computertomographie (CT) der Aortenklappe und der Aorta vor dem Klappenersatz durchgeführt. Die CT-Bildgebung ergab jedoch keine signifikanten morphologischen Unterschiede zwischen SP-AS und LP-AS hinsichtlich des Ausmaßes der Klappenverkalkung oder der kalzifizierten Bereiche innerhalb der AK (**Abbildung 4 und 5**).

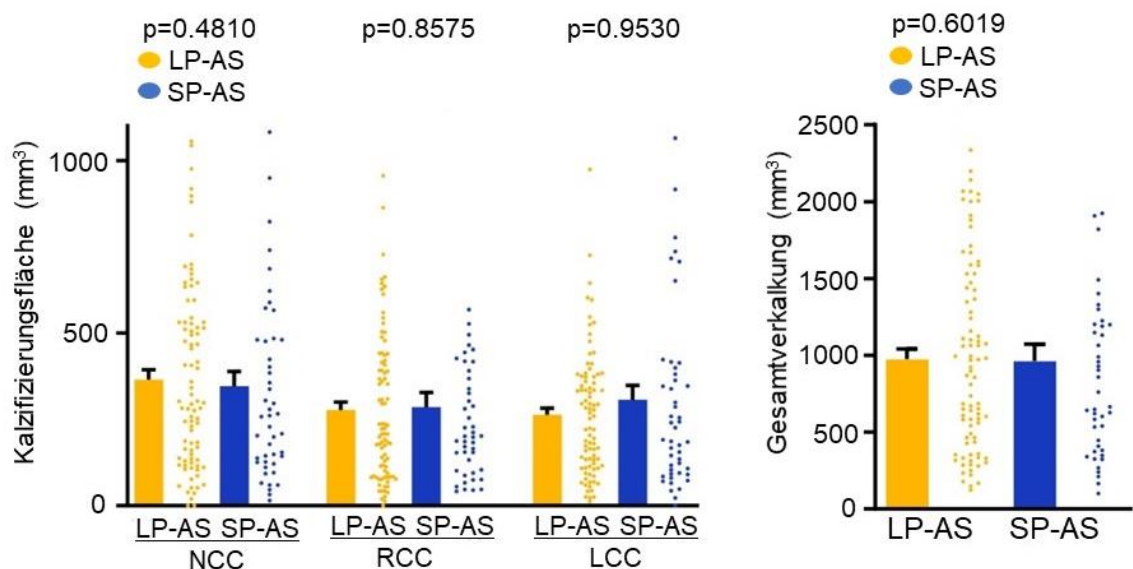


Abbildung 4: CT-Scans von Patienten mit langsam (n=65) und schnell (n=69) progredienter Aortenstenose. Es konnten keine signifikanten morphologischen Unterschiede festgestellt werden (weder hinsichtlich des Verkalkungsgrades in jeder einzelnen Klappentasche (rechtskoronare (RCC), nicht koronare (NCC) und linkskoronare (LCC), noch hinsichtlich des Grades der Gesamtmineralisierung der Aortenklappe). Dargestellt: Median \pm Interquartilsbereich (IQR); Statistik: Mann-Whitney-U-Test (Mueller et al., 2024).

3.1.1. Die Beurteilung der groben Pathologie

Die Beurteilung der groben Pathologie der explantierten Klappen ergab einen signifikant höheren Verkalkungsgrad der AK-Taschen bei LP-AS im Vergleich zu SP-AS (LP-AS vs. SP-AS; %; median, IQR; 0,62 (0,56-0,71) gegenüber 0,48 (0,36-0,54), $p < 0,0001$) (**Abbildung 6A**). Der Grad der makroskopischen Verkalkung korrelierte nicht mit den echokardiografischen Parametern Pmean oder Aortenklappenfläche, während das Alter war signifikant mit der Verkalkungsfläche in der Grobpathologie des AK-Gewebes verbunden ($p = 0,0045$) (**Abbildung 6B**).

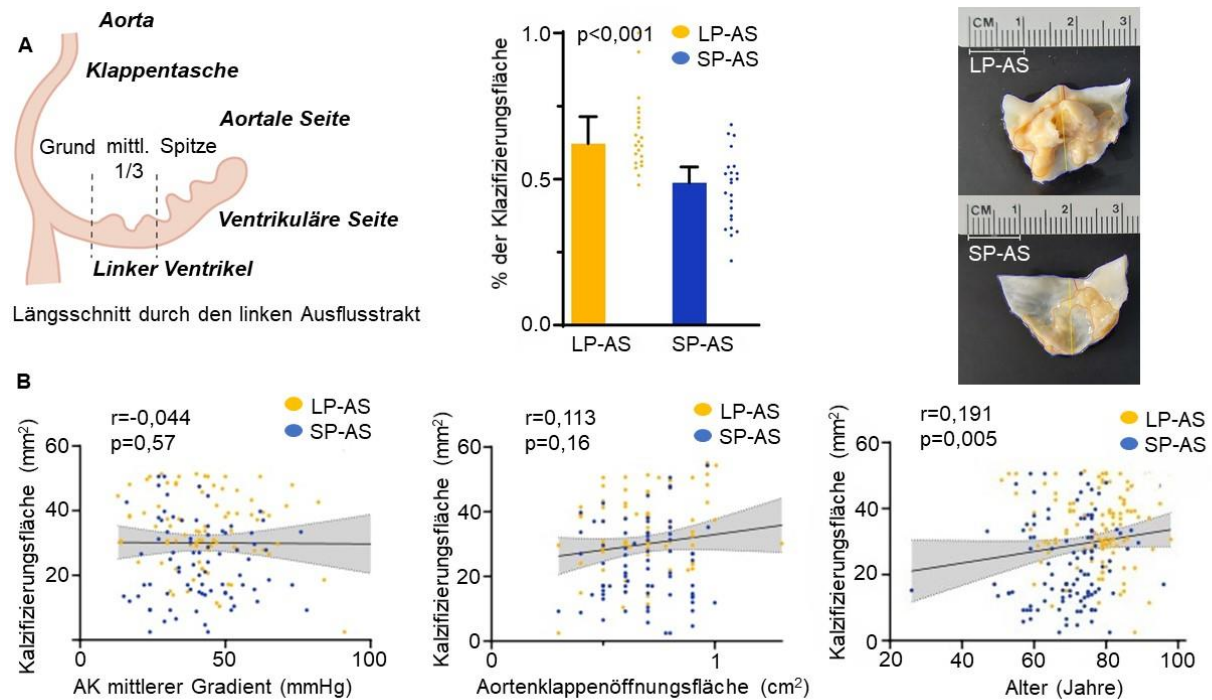


Abbildung 6: (A) Morphologische Analyse von Patienten mit entweder langsam (n=22) oder schnell (n=23) progredienter AS. Die linke Grafik zeigt ein Übersichtsdiagramm eines Längsschnitts des linken Ausflusstrakts. Die mittlere Grafik zeigt den Quotienten aus Kalzifizierungsfläche im Verhältnis zur Gesamtfläche (%). Dargestellt: Median \pm IQR; Statistik: Mann-Whitney-U-Test. Die rechte Tafel zeigt die repräsentative grobe Pathologie der explantierten AK-Taschen und die Analyse von LP-AS- und SP-AS-Patienten hinsichtlich des Mineralisierungs- und Kalzifizierungsgrades. (B) Spearman-Korrelationsanalyse von langsam (n=238) und schnell (n=237) progredienten AS-Patienten zur Bewertung der Zusammenhänge zwischen: Kalzifizierungsfläche (mm²) und mittlerem AK-Gradienten (mmHg) ($r = -0,04387$, $p = 0,5747$), Kalzifizierungsfläche (mm²) und Aortenklappenfläche (cm²) ($r = 0,1139$, $p = 0,1567$), und Kalzifizierungsfläche (mm²) und Alter (Jahre) ($r = 0,1916$, $p = 0,0045$). Statistik: Spearman's Korrelationskoeffizient r (Mueller et al., 2024).

Interessanterweise zeigte die histologische Analyse, dass der Kollagengehalt (visualisiert durch Pentachrom-Färbung) des AK-Gewebes von SP-AS signifikant erhöht war (LP-AS vs. SP-AS; mm²; Median, IQR; 16,91 (7,36-27,54) vs. 33,66 (21,24-55,2), $p < 0,0001$) (**Abbildung 7**).

Im Gegensatz dazu war die Mineralisierung (dargestellt durch die Von-Kossa-Färbung in der Histologie) der AK bei LP-AS im Vergleich zu SP-AS signifikant erhöht (LP-AS vs. SP-AS; mm²; Median, IQR; 33,74 (27,82-41,86) gegenüber 20,54 (13,52-33,41), p<0,0001) (**Abbildung 7**).

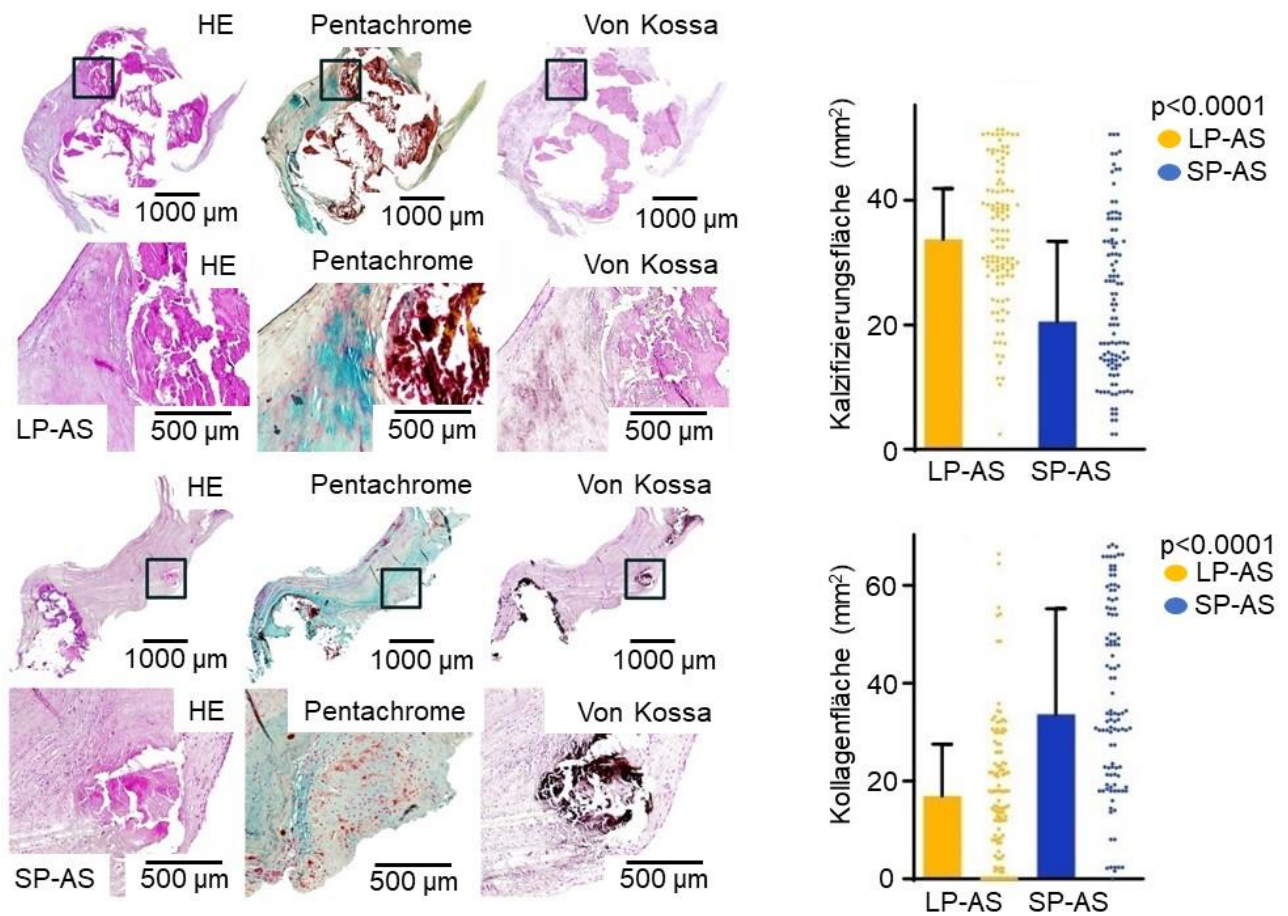


Abbildung 7: Repräsentative histologische Färbungen von Aortenklappen von Patienten mit langsam und schnell progredienten AS. Das obere Feld zeigt eine 4-fache Vergrößerung und das untere Feld eine 40-fache Vergrößerung der Aortenklappen. Es wurden Hämatoxylin-Eosin (HE), Movat-Pentachrom und von Kossa-Färbungen durchgeführt. Die Kalzifizierungsfläche (mm²) und die Kollagenfläche (mm²) von langsamen (n=110) und schnellen (n=108) AS-Patienten wurden berechnet. Dargestellt: Median \pm IQR; Statistik: Mann-Whitney-U-Test (Mueller et al., 2024).

3.1.2. Die Beurteilung der Lipidakkumulation

Wir haben eine zusätzliche Analyse der Lipidakkumulation in einer Untergruppe von n=64 Patienten (n=32 mit SP-AS und n=32 mit LP-AS) mit Hilfe der Ölrot-Färbetechnik durchgeführt - die Lipidakkumulation zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (**Abbildung 8**).

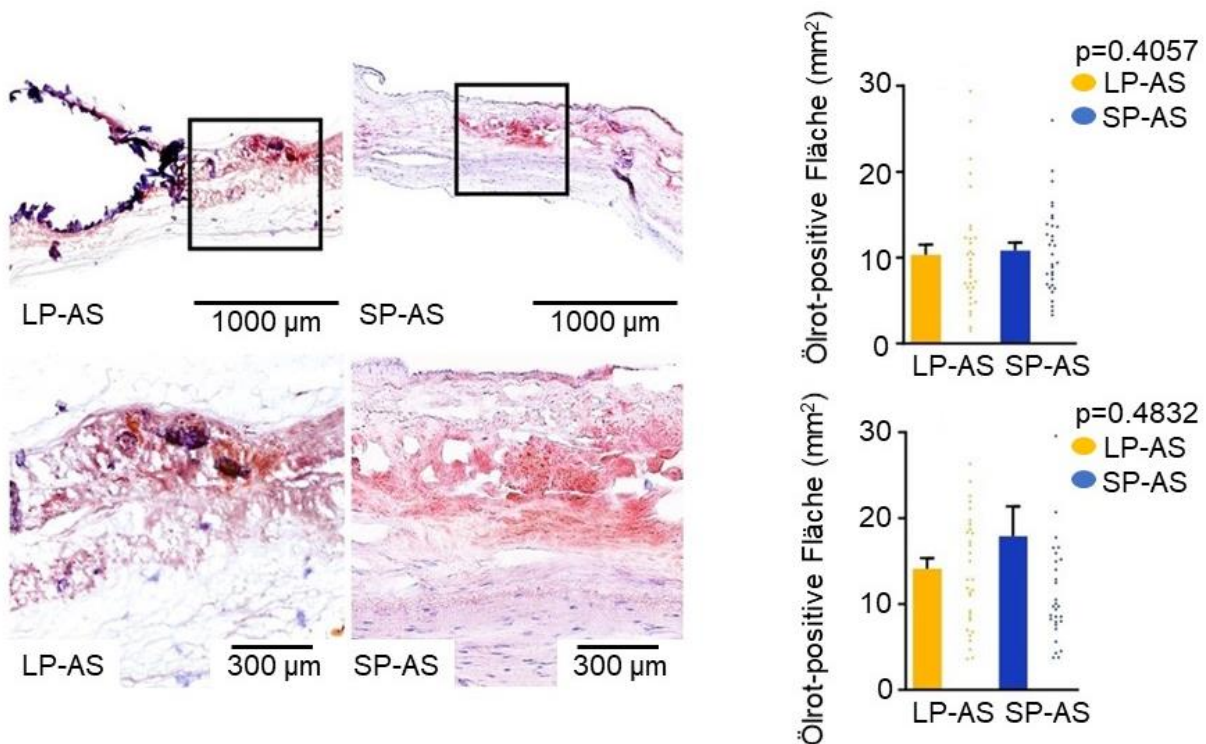


Abbildung 8: Repräsentative histologische Färbungen von Aortenklappen von Patienten mit langsam (n=32) und schnell 21 (n=32) progredienter AS. Das obere Feld zeigt eine 10-fache Vergrößerung und das untere Feld eine 40-fache Vergrößerung der Aortenklappen. Es wurde eine Ölrotfärbung durchgeführt. Die ölrot-positive Fläche (% , mm²) wurde berechnet. Die Lipidakkumulation zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Dargestellt: Median ± IQR; Statistik: Mann-Whitney U Test (Mueller et al., 2024).

3.1.3. Die Beurteilung der Immunzelleninfiltration

Eine weitere immunhistochemische Beurteilung des AK-Gewebes zeigte, dass die Zellularität bei SP-AS signifikant erhöht war (LP-AS vs. SP-AS; n; Median, IQR; 247 (142,3-504) vs. 717,5 (360,5-1234), 13 p<0,0001) (**Abbildung 9**), was auf eine Extravasation und Infiltration von Immunzellen ins AK Gewebe hindeutet. Die Immunfärbung zeigte auch einen bemerkenswert höheren Gehalt an CD16⁺ Monozyten (LP-AS vs SP-AS; Zellen/mm²; Median, IQR; 1 (0-6) vs 10 (2-12), p<0,0001) und CD68⁺ Makrophagen (LP-AS vs SP-AS; Zellen/mm², Median, IQR; 51 (32-76,25) vs 128,5 (75-147,8), p<0,0001) in explantierten Klappen von Patienten mit SP-AS (**Abbildung 9**). Am auffälligsten, die Thrombozytenakkumulation (CD42b⁺ Fläche) war bei SP-AS deutlich erhöht (LP-AS vs. SP-AS; 19 mm²; Median, IQR; 0,78 (0-1,54) vs. 1,7 (0,77-2,66), p<0,0001) (**Abbildung 9**).

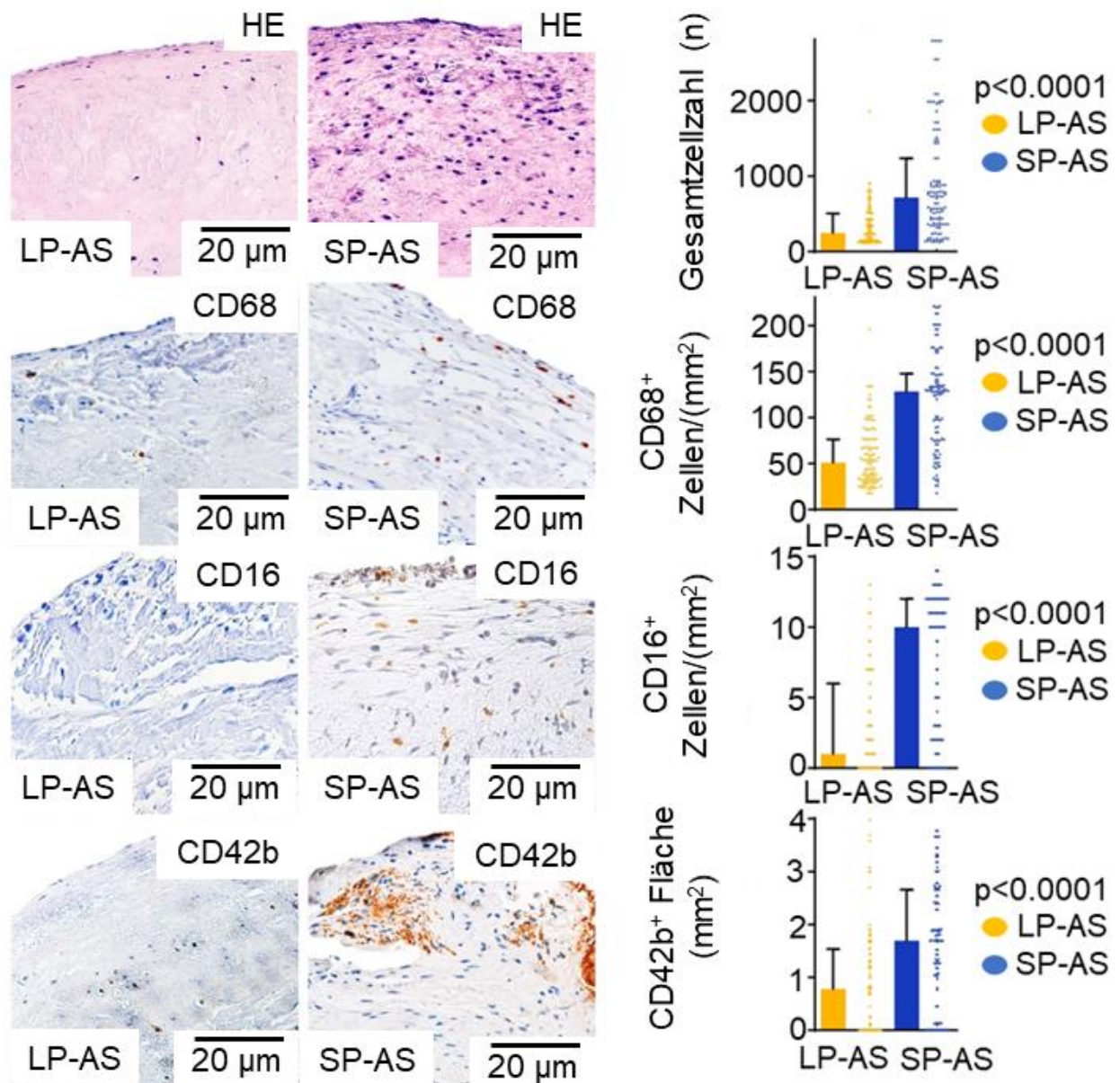


Abbildung 9: Repräsentative immunhistologische Färbungen von Aortenklappen von Patienten mit langsam (n=110) und schnell (n=108) progredienter AS. Das obere Feld zeigt die HE-Färbung zur Berechnung der Gesamtzahl der Aortenklappenzellen (n) bei langsam und schnell progredienter AS. Das zweite Feld zeigt die Färbung von CD68⁺ Makrophagen und Berechnung der CD68⁺ Zellen /mm². Das dritte Feld zeigt die Färbung von CD16⁺ Monozyten und Berechnung der CD16⁺ Zellen/mm². Das letzte Feld zeigt die Färbung von CD42b⁺ Thrombozyten und Berechnung der CD42b⁺ Fläche (mm²). Dargestellt: 1 Median ± IQR; Statistik: Mann-Whitney-U-Test (Mueller et al., 2024).

Die topische Analyse ergab, dass die Thrombozyten- und Zellinfiltration vorwiegend auf der Aorta (Lamina fibrosa) und wesentlich weniger auf der Ventrikelseite (Lamina ventricularis) der AK von SP-AS auftritt (Zellularität aortal: LP-AS vs SP-AS; n; Median, IQR; 111 (77-133) vs 183 (135,8-258,5), p=0,0005; Zellularität ventrikulär: LP-AS vs SP-AS; n; Median, IQR; 23 (18-27) vs 76 (52,25 93,5), p<0,0001; CD42b⁺ Fläche aortal: LP-AS vs SP-AS; mm²; Median, IQR; 0,07 (0,02-0,12) vs 1,33 (0,92-1,7), p<0,0001; CD42b⁺ Fläche ventrikulär: LP-AS vs SP-AS; mm²; Median, IQR; 0,02 (0-0,03) vs 0,09 (0-0,24), p=0,1105) (**Abbildung 10**). Die histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse zeigen, dass SP-AS-

Klappengewebe im Vergleich zu LP-AS durch eine wesentlich stärkere Infiltration von Entzündungszellen und Blutplättchen sowie eine geringere Verkalkung gekennzeichnet ist.

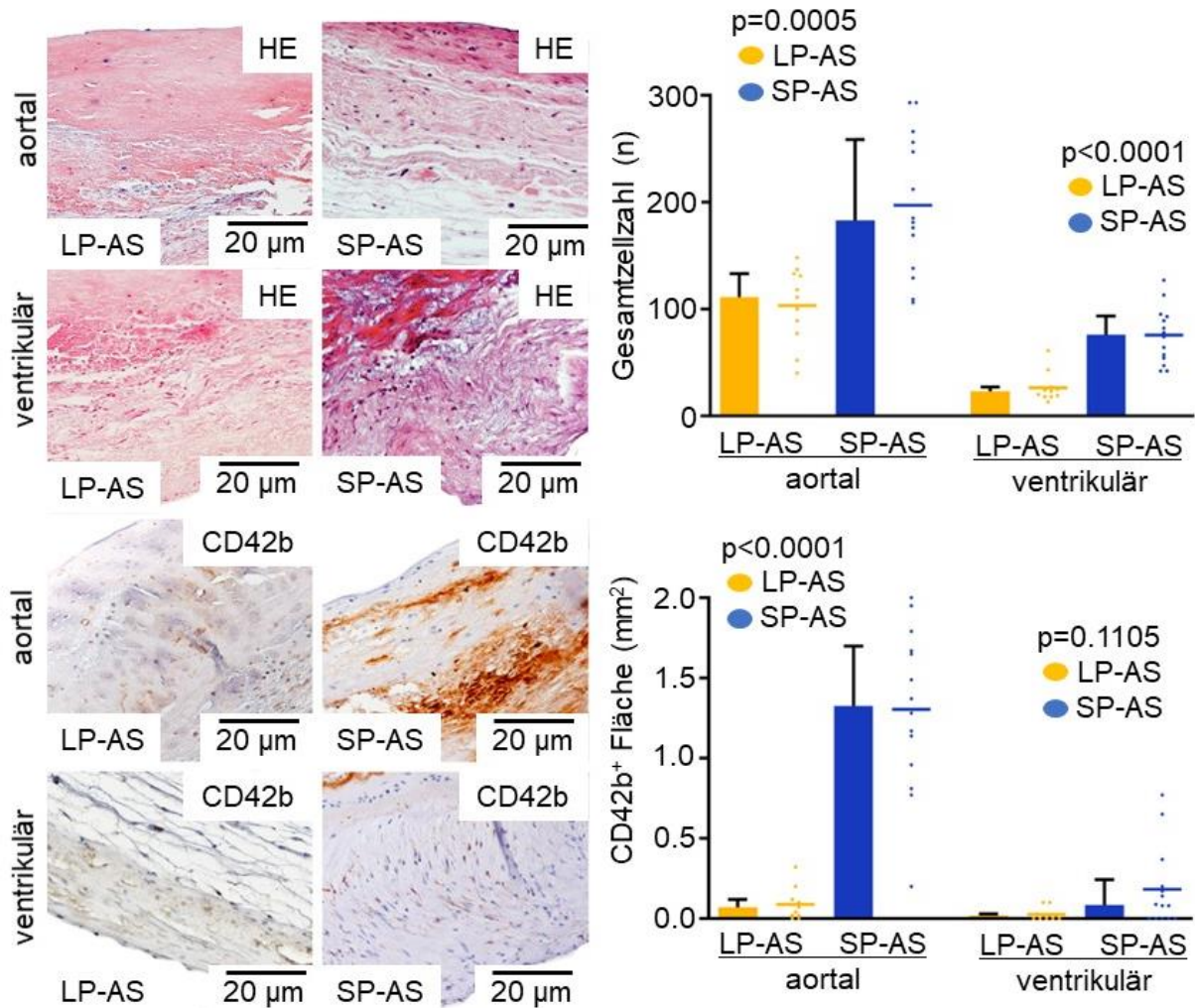


Abbildung 10: Repräsentative immunhistologische Färbungen von Aortenklappen im Vergleich zwischen aortaler und ventrikulärer Aortenklappenseite von Patienten mit langsam (n=11) und schnell (n=14) progredienter AS. Die oberen Felder zeigen HE-Färbungen zur Analyse der Zellzahl (n) auf der aortalen und ventrikulären Seite der AK bei langsam und schnell progredienter AS. Das untere Feld zeigt die Färbung der CD42b⁺ positiven Bereiche, die auf Thrombozyten hinweisen. Die Verteilung der CD42b⁺-positiven Fläche (mm²) in der Aorta und auf der ventrikulären Seite der AK ist in der rechten Grafik dargestellt und verdeutlicht die unterschiedliche Expression bei LP-AS im Vergleich zu SP-AS. Dargestellt sind: Median ± IQR; Statistik: Mann-Whitney-U-Test (Mueller et al., 2024).

3.2. Die Charakterisierung der lokalen Gewebeentzündung in explantierten Aortenklappen von Patienten mit schnell und langsam progredienter Aortenstenose zeigt signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Um die Entzündung der explantierten Klappen von Patienten mit SP-AS und LP-AS weiter zu beurteilen, führten wir eine Genexpressionsanalyse von 594 vordefinierten Genen mit dem nCounter Human Immunology v2 Panel der NanoString-Technologie durch (**Tabelle 3**). Die Ribonukleinsäure (RNA)-Profilierung wurde nach der Extraktion der Gesamt-RNA aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Klappengewebe ausgewertet. Die hierarchische

Clusteranalyse der 50 wichtigsten unterschiedlich exprimierten Gene zeigte signifikant unterschiedliche RNA-Expressionsniveaus in Klappengewebe von SP- und LP-AS-Patienten (**Abbildung 11**).

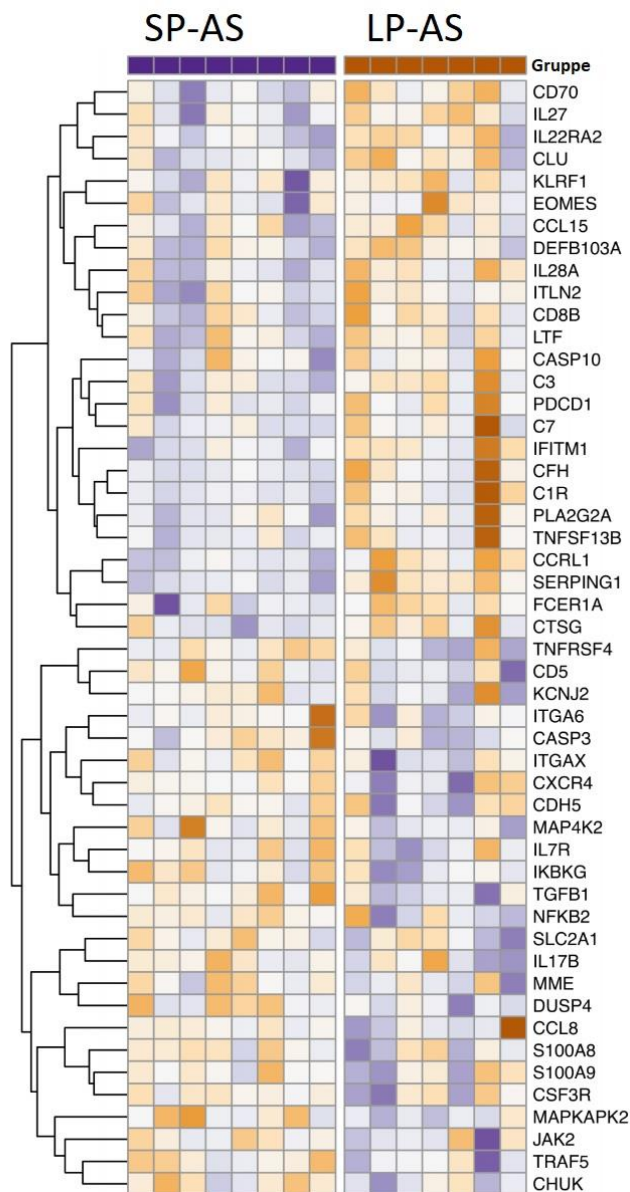


Abbildung 11: Hierarchische Clustering-Analyse der 50 am stärksten differenziell exprimierten Gene aus dem Nano-String-mRNA-Profilung. Die Z-Scores der Mittelwerte wurden entsprechend der Hochregulierung bei schnell (SP-AS, blau) oder langsam progredienter Aortenstenose (LP-AS, orange) gefärbt (Mueller et al., 2024).

Von den 594 getesteten Genen waren 23, vor allem Entzündungsgene, signifikant hochreguliert ($p < 0,05$), während zwei Gene in den Aortenklappen von SP-AS im Vergleich zu LP-AS-Patienten herunterreguliert waren ($p < 0,05$), wie aus dem Scatter- und dem Volcano-Plot hervorgeht (**Abbildung 12 A**).

Die am stärksten herunterregulierten Genexpressionssignale betrafen Schlüsselregulatoren des Toll-like-Rezeptor/Inflammasom-Signalwegs (transformierender Wachstumsfaktor- β 1 (TGF- β 1) und MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPK2)), während pro-

inflammatorische und/oder apoptotische Signale, die z. B. durch Nuklearfaktor-kappa-B (NF- κ B) oder MIF vermittelt werden, bei SP-AS hochreguliert werden (**Abbildung 12 B**).

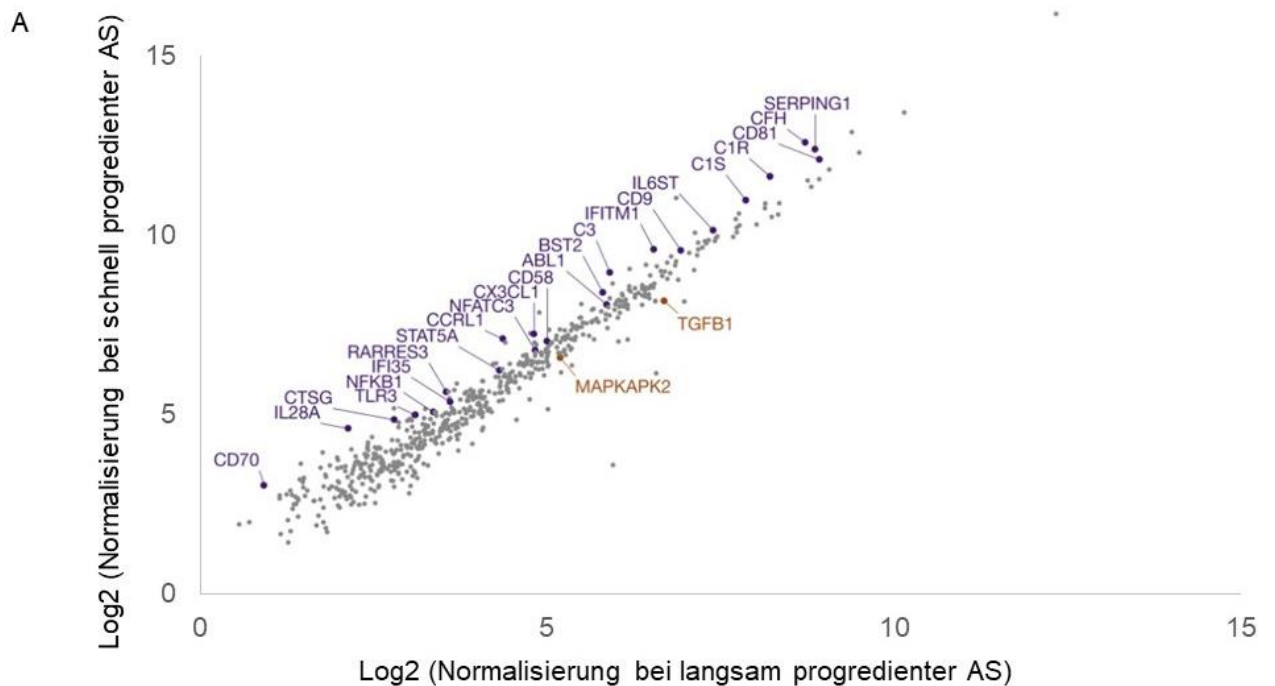


Abbildung 12: (A) Die Ergebnisse der Nanostring®-Daten. Die Ergebnisse wurden Log2-transformiert und der Standardfehler des Mittelwertes wurde in einem Streudiagramm dargestellt, was signifikante ($p < 0,05$) Veränderungen zwischen Patienten mit schnell und langsam progredienter Aortenstenose zeigt. Um festzustellen, ob die Genexpression vom Fortschreiten der Krankheit abhängt, wurden die normalisierten Mittelwerte der einzelnen Gene zwischen Patienten mit schnell und langsam fortschreitender Aortenstenose verglichen. Um festzustellen, ob die Genexpression vom Fortschreiten der Erkrankung abhängt, wurden die normalisierten Mittelwerte der einzelnen Gene zwischen Patienten mit schnell und langsam progredienter Aortenstenose verglichen. Der Test wurde mit JMP Version 15.0 durchgeführt. Statistik: Student's Test (Mueller et al., 2024).

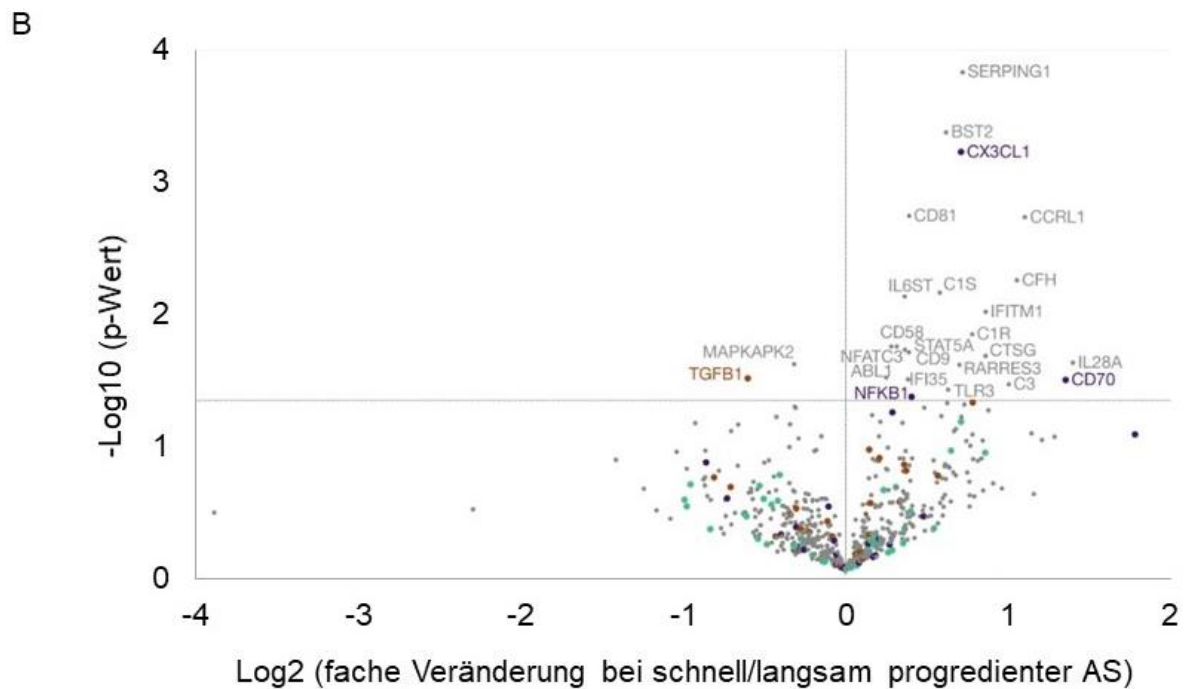


Abbildung 12: (B) Die Ergebnisse der Nanostring®-Daten. Die Ergebnisse wurden Log₂-transformiert, und der Standardfehler des Mittelwertes wurde in einem Vulcano-Diagramm dargestellt, was die signifikanten ($p < 0,05$) Veränderungen zwischen Patienten mit schnell und langsam fortschreitender Aortenstenose anzeigt. Um festzustellen, ob die Genexpression vom Fortschreiten der Erkrankung abhängt, wurden die normalisierten Mittelwerte der einzelnen Gene zwischen Patienten mit schnell und langsam progredienter Aortenstenose verglichen. Der Test wurde mit JMP Version 15.0 durchgeführt. Statistik: Student's Test (Mueller et al., 2024).

Eine Heatmap-Analyse mit zeilenweisem Vergleich der Nanostring®-Daten ergab zudem bemerkenswerte Unterschiede in den TGF- β 1- und MIF-abhängigen Signalwegen zwischen den beiden Patientengruppen (**Abbildung 13**). Im Vergleich zu AK-Gewebe von LP-AS-Patienten war die Expression von MIF-assoziierten Genen bei SP-AS signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu war die TGF- β 1-assoziierte Genregulation ein herausragendes Merkmal bei LP-AS (**Abbildung 13**).

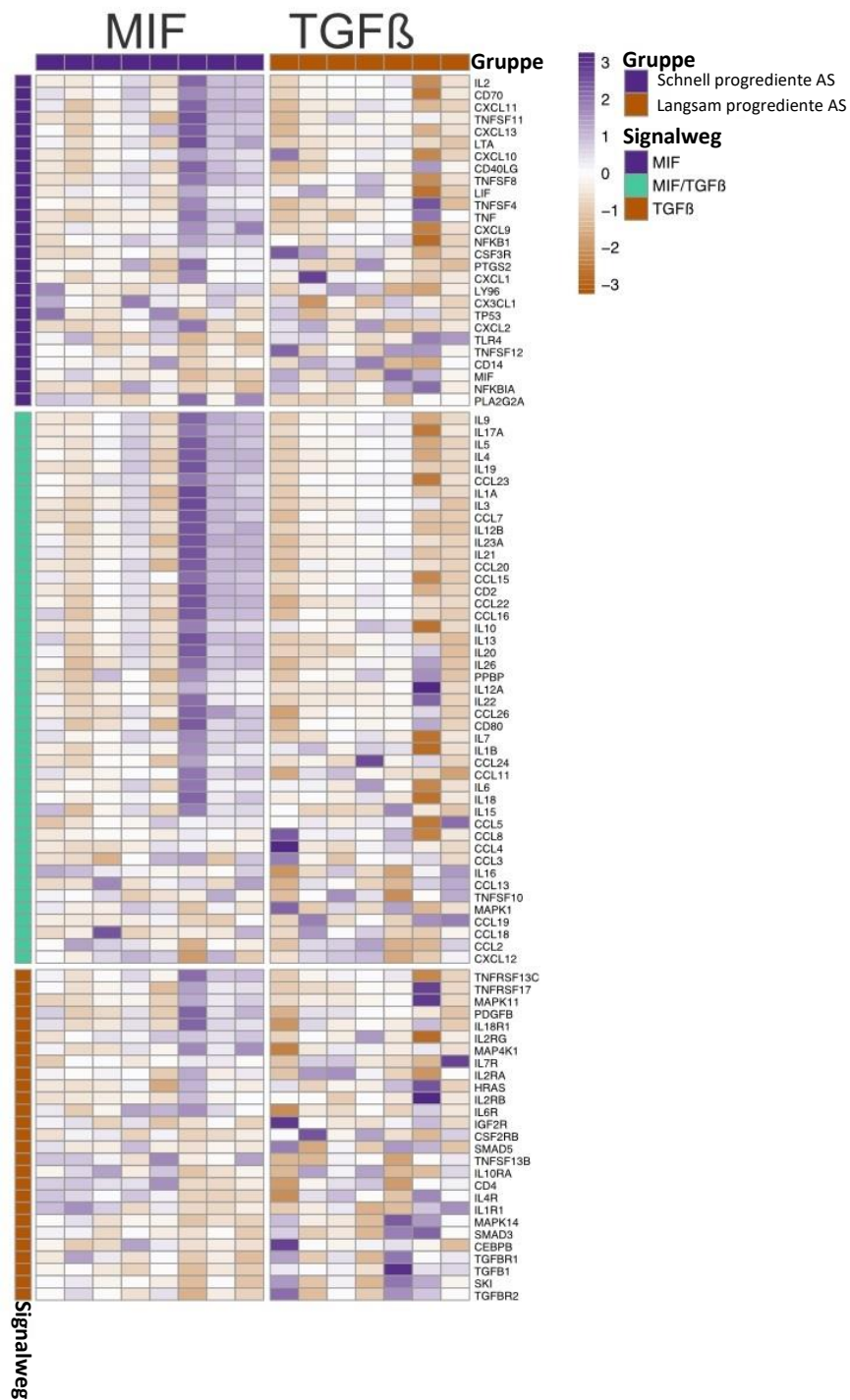


Abbildung 13: Heatmap mit zeilenweisem Vergleich der Nanostring®-Daten. Beobachtete z-Scores von Genen, die zum MIF-Signalweg (violett) und zum TGF-β1-Signalweg (orange) gehören, wurden gemäß der PathCards-Online-Datenbank aufgetragen (Mueller et al., 2024).

Die Analyse der Anreicherung von Signalwegen (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-Signalwege Datenbank) der hochregulierten Gene im SP-AS-Klappengewebe identifizierte die mit der Proteintranslation verbundenen Kategorien "Komplement- und Gerinnungskaskade", "Toll-like-Rezeptor-Signalisierung", "Th17-Zelldifferenzierung" und "B-Zell-Rezeptor-Signalweg" (**Abbildung 14**).

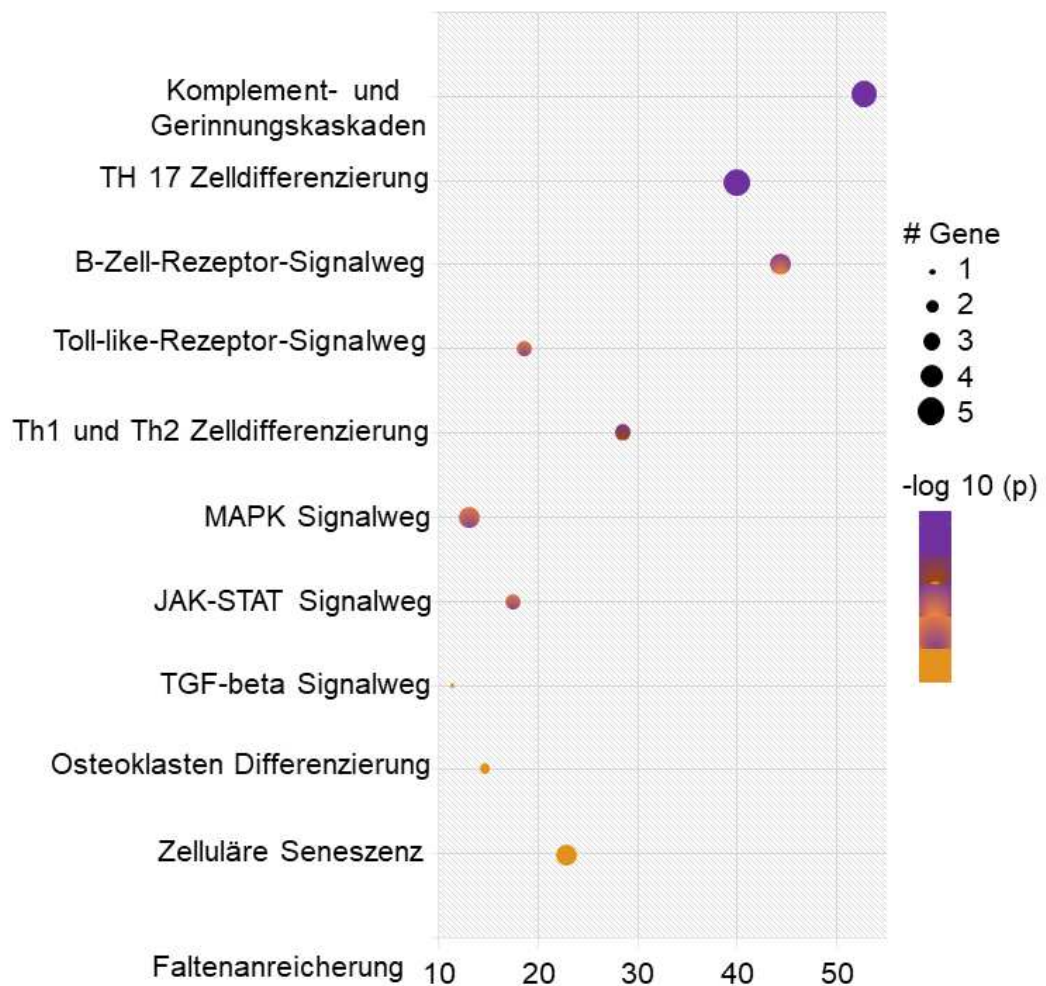


Abbildung 14: KEGG-Signalwege-Analyse (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Die zehn am stärksten angereicherten KEGG-Signalwege, die die signifikant regulierten Gene bei schnell fortschreitender AS zusammenfassen, wurden grafisch dargestellt. Log₁₀-transformierte p-Werte der angereicherten Terme wurden eingefärbt und die Größe der einzelnen Terme wurde an die Anzahl der Gene angepasst. Aufgetragen: Log₁₀-transformierte p-Werte; Statistik: Bonferroni p<0,01, Greedy-Algorithmus aktive Subnetz-Suchmethode (Mueller et al., 2024).

3.3. Die Bedeutung der durch MIF regulierten Signalübertragung bei Patienten mit SP-AS

Um die Bedeutung der durch MIF regulierten Signalübertragung bei Patienten mit SP-AS weiter hervorzuheben, wurde MIF der Netzwerkanalyse hinzugefügt, die seine Interaktionen mit signifikant angereicherten GeneOntology-Signalwegen (p<0,01) anzeigt (**Abbildung 15**). Diese Beobachtung wird durch immunhistochemische Untersuchungen des AK-Gewebes auf der Ebene der Proteinexpression weiter untermauert.

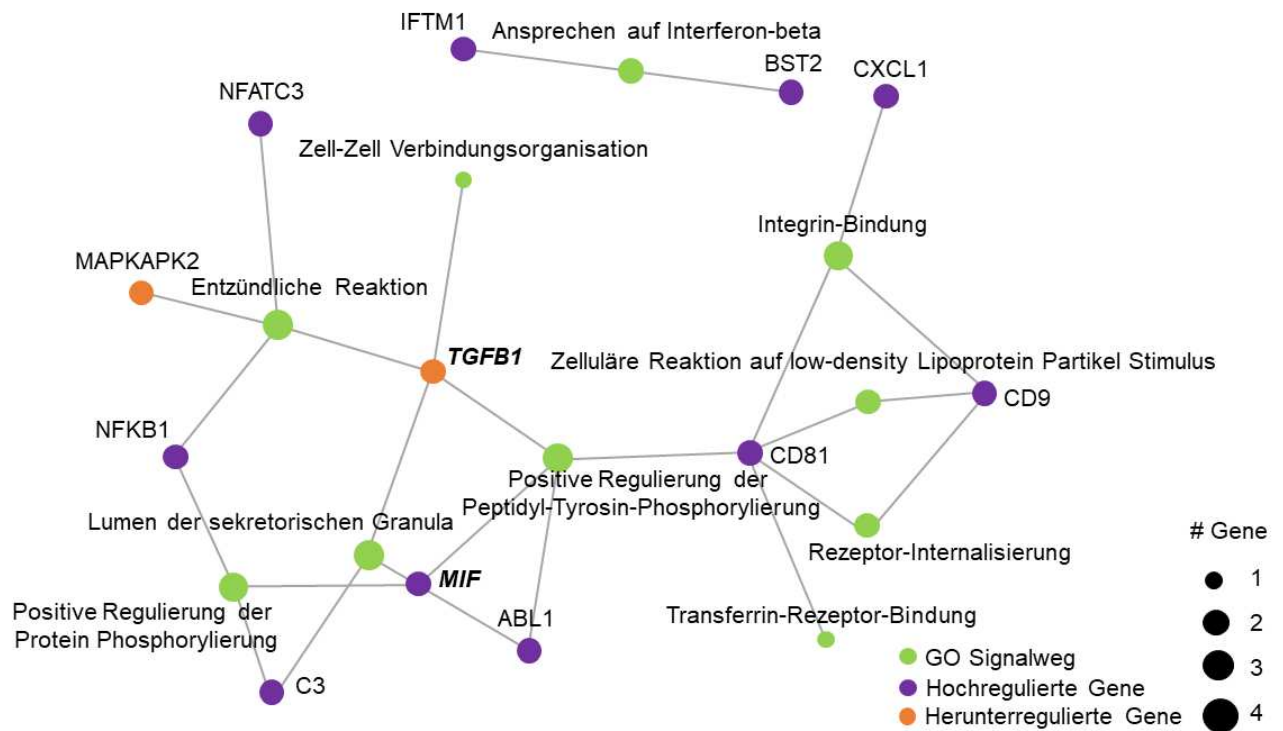


Abbildung 15: Term-Gene-Diagramm. Das Diagramm hebt Subnetze und Regulierungen von signifikant regulierten Genen und den zugehörigen KEGG-Signalwegen bei schnell progredienter AS hervor. Um die Bedeutung von MIF bei Patienten mit schnell progredienter AS weiter hervorzuheben, wurde MIF der Netzwerkanalyse hinzugefügt, die seine Interaktionen mit signifikant ($p < 0,01$) angereicherten GeneOntology-Signalwegen zeigt (Mueller et al., 2024).

Die MIF-Immunfärbung ist in den AK von SP-AS signifikant erhöht (**Abbildung 16, A**). Interessanterweise war nicht nur die allgemeine MIF-Expression in den klappenansässigen Zellen von SP-AS-Patienten erhöht (LP-AS vs. SP-AS; Zellen/mm²; Median, IQR; 30 (24,75-36,25) vs. 37 (29-50,75), $p < 0,0001$), sondern die stärkste MIF-Expression wurde in den Zellen der Lamina fibrosa auf der aortalen Seite der AK-Taschen festgestellt (MIF-Expression, aortal: LP-AS vs SP-AS; Zellen/mm²; Median, IQR; 13 (7-21) vs 23,5 (20,25-32), $p = 0,0058$; MIF-Expression, ventrikulär: LP-AS vs. SP-AS; Zellen/mm²; Median, IQR; 1 (0-7) vs. 1,5 (0-7), $p = 0,7483$) (**Abbildung 16, A+B**).

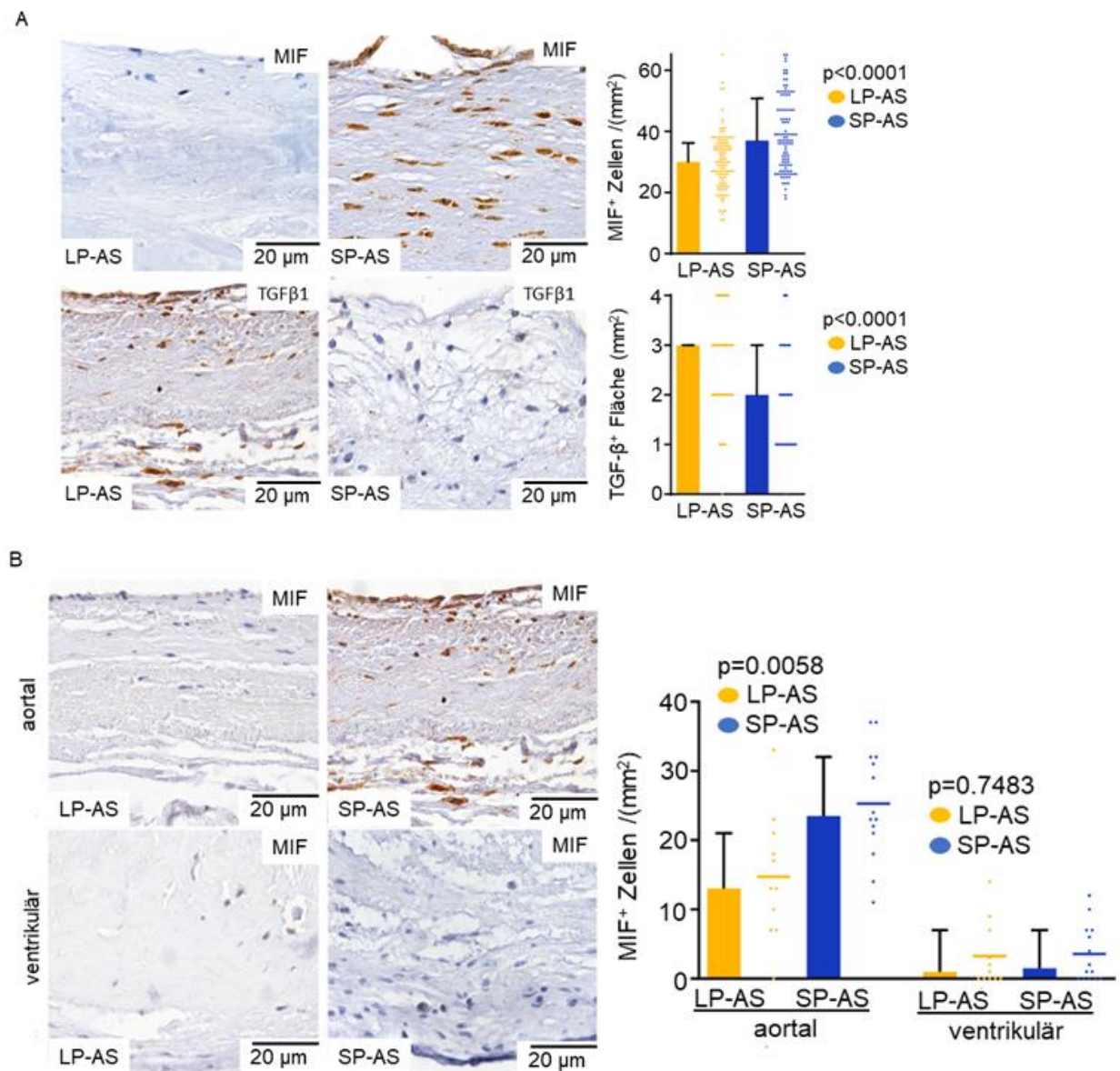


Abbildung 16: (A) Repräsentative immunhistologische Färbungen von Aortenklappen von Patienten mit langsam (n=122) und schnell (n=96) progredienter AS. Die obere Tafel zeigt die Färbung der MIF⁺-Zellen und die Berechnung der MIF⁺-Zellen/mm². Das untere Feld zeigt die Färbung der TGFβ-1⁺ Fläche und die Berechnung der TGFβ-1⁺ Fläche (mm²). **(B)** Repräsentative immunhistologische Färbungen von Aortenklappen zum Vergleich der aortalen und ventrikulären Aortenklappenseite von Patienten mit langsam (n=11) und schnell (n=14) progredienter AS. Die obere Tafel zeigt die Färbung der MIF⁺-Zellen und die Berechnung der MIF⁺-Zellen/mm². Dargestellt: Median ± Interquartilsbereich (IQR); Statistik: Mann-Whitney-U-Test (Mueller et al., 2024).

Außerdem korrelierte die Gewebeexpression von MIF mit der Gewebezellinfiltration von Makrophagen (CD68⁺; $r=0,1445$, $p=0,0330$), Monozyten (CD16⁺, $r=0,1751$, $p=0,0096$), und Thrombozyten (CD42b⁺, $r=0,2684$, $p<0,0001$) (**Abbildung 17**). Unsere Ergebnisse deuten also darauf hin, dass MIF und die damit zusammenhängenden Signalwege bei Patienten mit SP-AS ein vorherrschender Regulator der lokalen Entzündung des Klappengewebes sind.

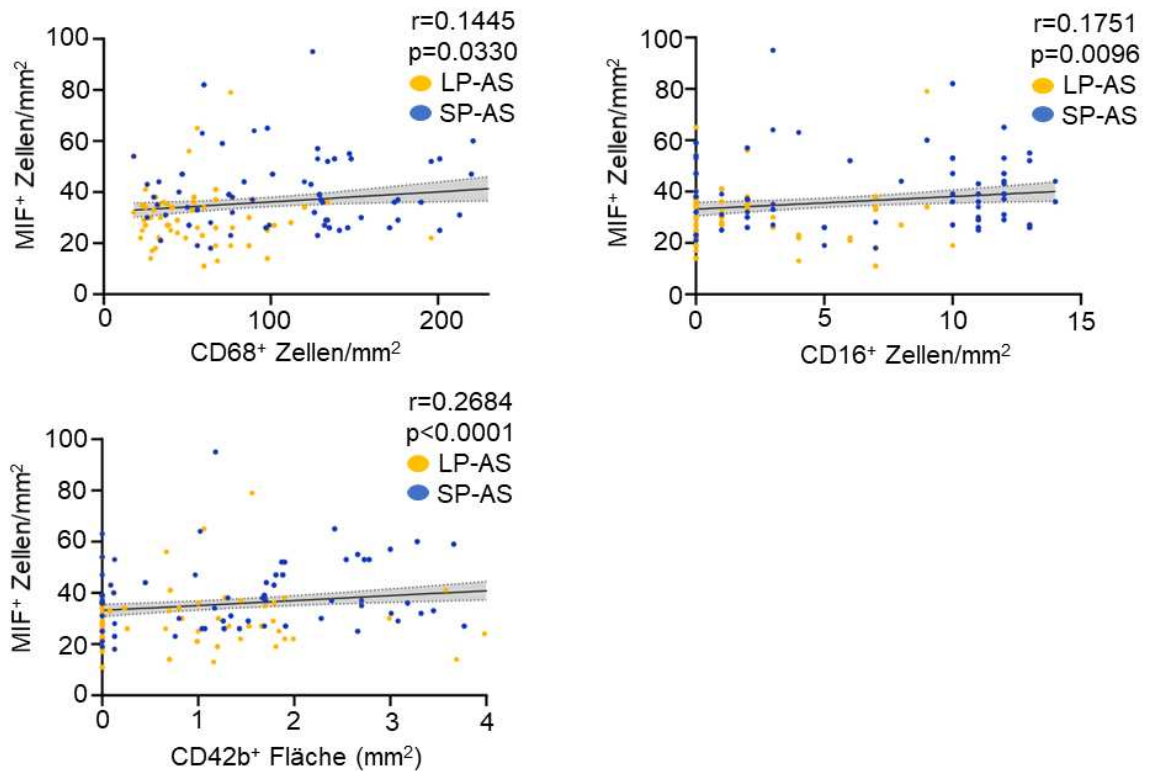


Abbildung 17: Spearman-Korrelationsanalyse von langsam (n=122) und schnell (n=96) progredienten AS-Patienten. Der Zusammenhang zwischen: MIF⁺ Zellen /mm² und CD68⁺ Zellen /mm² ($r=0,1445$, p -value=0,0330), MIF⁺ Zellen /mm² und CD16⁺ Zellen /mm² ($r=0,1751$, p -value=0,0096), MIF⁺ Zellen /mm² und CD42b⁺ Fläche (mm²) ($r=0,2684$, p -value<0,0001) wurde bewertet. Statistik: Spearman's Korrelationskoeffizient r (Mueller et al., 2024).

3.4. Die Bedeutung der kardiovaskulären Risikofaktoren sowie Komorbiditäten bei Patienten mit SP-AS

Darüber hinaus haben wir getestet, ob kardiovaskuläre Risikofaktoren (Diabetes mellitus Typ 2, Raucherstatus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie), Komedikation (P2Y12-Hemmer) und Komorbiditäten (Herzinsuffizienz nach NYHA-Klasse, symptomatische koronare Herzkrankheit, chronische Nierenerkrankung, Vorhofflimmern) die Progressionsrate von AS beeinflussen können. Hier bestätigten wir, dass keiner der getesteten klinischen Parameter einen signifikanten Einfluss auf die Progressionsrate von AS zeigte (**Abbildung 18**).

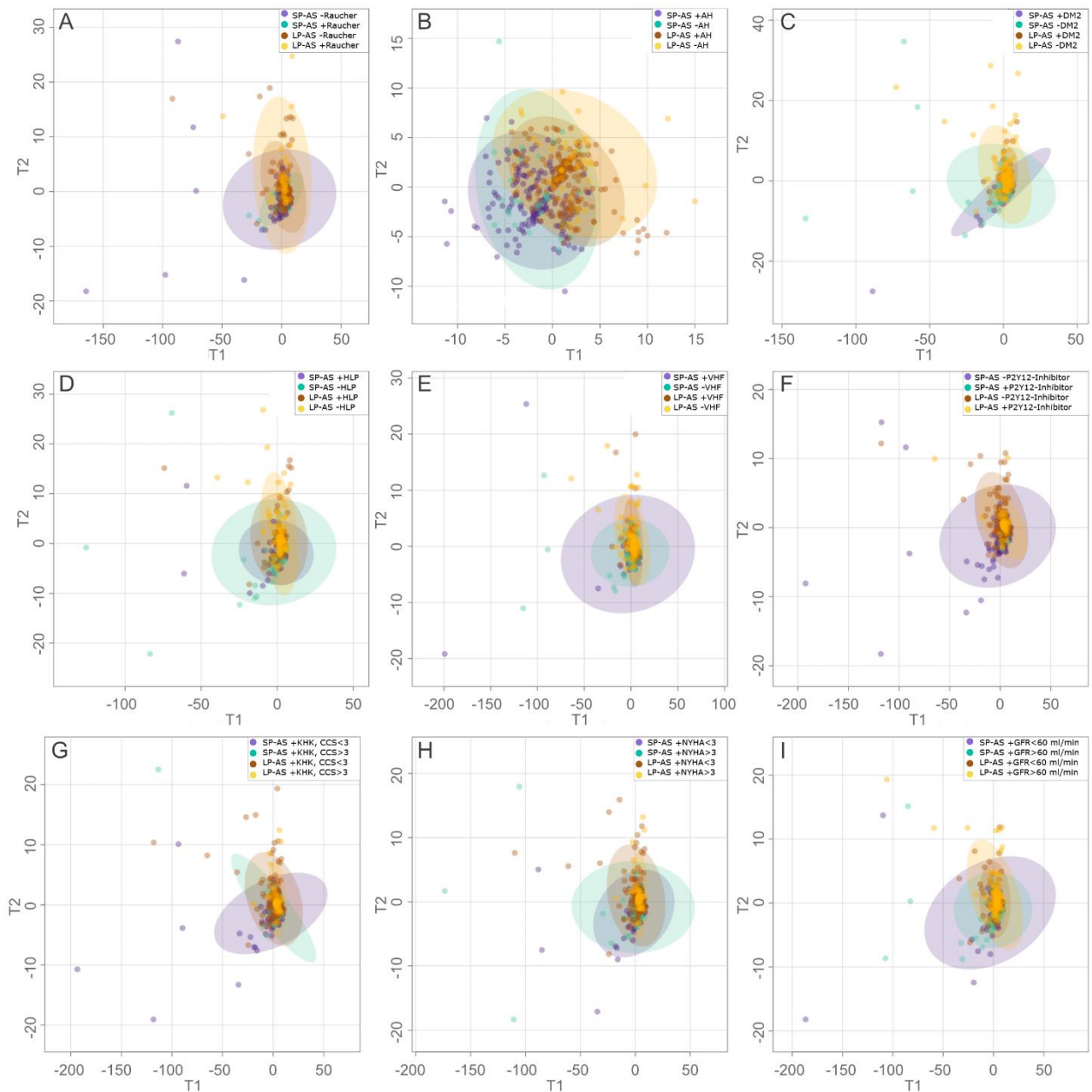


Abbildung 18: Auswirkung von kardiovaskulären Risikofaktoren (Diabetes mellitus Typ 2, Raucherstatus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie), Komedikation (P2Y12-Hemmer) und Begleiterkrankungen (Herzinsuffizienz definiert durch NYHA-Klasse, symptomatische koronare Herzkrankheit, chronische Nierenerkrankung, Vorhofflimmern) auf die Progressionsrate der Aortenklappenstenose. Die PLS-DA- und OPLS-DA-Analyse wurden durchgeführt, um den Einfluss der klinischen Parameter auf das Fortschreiten der Aortenstenose zu bewerten, die als schnell ($\Delta V_{max} \geq 0,45$ m/sec/Jahr) und langsam ($\Delta V_{max} < 0,45$ m/sec/Jahr) progrediente AS definiert wurde. Die vier Untergruppen (schnell progrediente AS \pm möglicher Störfaktor / langsam progrediente AS \pm möglicher Störfaktor) sind farblich gekennzeichnet. Eine homogene Verteilung der Untergruppen **(A-I)** zeigt einen geringen Einfluss der untersuchten Risikofaktoren, der Behandlung und der Komorbiditäten auf die Progressionsrate der AS. Der Vergleich von schnell und langsam progredienter AS wird für jeden analysierten Parameter dargestellt. **(A)** Die PLS-DA-Analyse des Raucherstatus zeigt, dass aktuelles Rauchen keinen signifikanten Einfluss auf das Fortschreiten von AS hat [$R^2 = 0,35244$, $Q^2 = 0,18432$]. **(B)** Das Vorhandensein einer arteriellen Hypertonie hat in der PLS-DA-Analyse keinen signifikanten Einfluss auf die Progressionsrate der AS [$R^2 = 0,43604$, $Q^2 = 0,22725$]. **(C)** Die PLS-DA-Analyse zeigt, dass Diabetes mellitus Typ 2 keinen signifikanten Einfluss auf die Progressionsrate der Aortenstenose in allen vier Untergruppen hat [$R^2 = 0,19158$, $Q^2 = 0,042751$]. **(D)** Erhöhte Gesamtcholesterin- und LDL-Werte, definiert als Hyperlipidämie, waren in unserer Kohorte nicht mit dem Fortschreiten der Aortenstenose assoziiert, wie die PLS-DA-Analyse zeigt [$R^2 = 0,35257$, $Q^2 = 0,11481$]. **(E)** Das Vorhandensein von Vorhofflimmern war nicht mit den Veränderungen der Spitzengeschwindigkeit ΔV_{max} und der

Progressionsrate der AS verbunden, die mit OPLS-DA analysiert wurden [R2= 0,33388, Q2= 0,056363]. **(F)** Eine Thrombozytenaggregationshemmer-Therapie mit P2Y12-Inhibitoren hatte in der OPLS-DA-Analyse keinen signifikanten Einfluss auf die Progressionsrate der AS [R2= 0,32092, Q2= 0,16966]. **(G)** Das Vorhandensein einer symptomatischen koronaren Herzkrankheit, definiert durch eine leichte bis mäßige (CCS<3) oder schwere Angina pectoris (CCS≥3), hatte in der PLS-DA-Analyse keinen signifikanten Einfluss auf die Progressionsrate der AS [R2= 0,3304, Q2= 0,16101]. **(H)** Die PLS-DA-Analyse der NYHA-Klasse war aufgrund einer gleichzeitig eingeschränkten linksventrikulären Funktion und Herzinsuffizienz nicht mit Änderungen der Spitzengeschwindigkeit ΔV_{max} und der Progressionsrate der AS assoziiert [R2= 0,34989, Q2= 0,18144]. **(I)** Eine chronische Nierenerkrankung, definiert durch eine eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate (GFR< 60mL/min), war in der PLS-DA-Analyse nicht signifikant mit der Progressionsrate der AS assoziiert [R2= 0,30152, Q2= 0,17472] (Mueller et al., 2024).

4. Diskussion.

Das Fortschreiten einer AS variiert interindividuell in hohem Maße, wobei die dahinterliegenden Mechanismen bislang nicht hinreichend aufgeklärt sind. Zudem besteht keine exakte Definition von Patienten, die ein hohes Risiko für eine schnelle Progression aufweisen (Mateos et al., 2022, Otto and Prendergast, 2014).

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die Analyse der Variabilität des Verlaufs der AS und strebt eine Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen dieser Erkrankung an. Wir haben versucht, die Thrombozytenaktivität bei verschiedenen Krankheitsphänotypen zu charakterisieren. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Thrombozytenaktivität eine prognostische Bedeutung für die Vorhersage eines raschen Krankheitsverlaufs im Zusammenhang mit SP-AS hat. Die zentralen Forschungsziele umfassten die Analyse der Rolle von Thromboinflammation, thrombozytenvermittelten Mediatoren sowie thrombozyten-monozytären Interaktionen bei der Differenzierung zwischen entzündlichen und verkalkten pathologischen Phänotypen der Aortenklappe.

Die durchgeführte Studie konnte einige wesentliche Beobachtungen zur Progression der AS identifizieren. Im Vergleich zu LP-AS-Patienten manifestiert sich bei SP-AS-Patienten ein deutlich entzündlicher Phänotyp der AK. Hierbei spielen Verkalkungen und pro-osteogene Pathologien eine untergeordnete Rolle. Die Regulation von MIF-verwandten Signalwegen erfolgt primär im Herzklappengewebe von SP-AS-Patienten. Die Thrombozytenaktivität korreliert mit einer lokalen Klappenentzündung und erlaubt somit eine Differenzierung zwischen einem "beschleunigten entzündlichen" und einem "verkalkenden" pathologischen Phänotyp der Klappe. Diese Erkenntnisse tragen zum besseren Verständnis der AS-Pathophysiologie bei und könnten neue Ansätze für Prognose und Behandlung liefern.

4.1. Progressionsgeschwindigkeit der Aortenstenose

Die vorliegende Arbeit stellt eine große Kohorte von Patienten mit schwerer AS vor und untersucht die grundlegenden Risikofaktoren, die mit einem raschen Fortschreiten der AS assoziiert sind. Die durchschnittliche Progressionsrate der Aortenstenose in unserer Kohorte entsprach den Angaben der ähnlichen Studien, wobei der Anstieg der maximalen transvalvulären Geschwindigkeit zwischen 0,15 und 0,40 m/s pro Jahr lag (Faggiano et al., 1992, Brener et al., 1995, Amanullah et al., 2022). In ähnlicher Weise wurde die Differenz zwischen dem ersten und dem letzten verfügbaren Echokardiogramm berechnet, um die Progressionsrate zu bestimmen (Amanullah et al., 2022). In unserer Studie entwickelte sich der Übergang von der ersten dokumentierten AS bis zum Auftreten von AS-bezogenen Symptomen, die einen AK-Ersatz rechtfertigten über einen mittleren Zeitraum von 39 Monaten (Spanne von 0,17-329,2 Monaten). Eine rasche Progression der AS in Form einer Zunahme der maximalen transvalvulären Geschwindigkeit war ein unabhängiger Prädiktor für die Gesamtmortalität oder kombinierte Ereignisse (Mortalität und AKE) auch bei asymptomatischen Patienten in der Studie von Nistri et al (Nistri et al., 2012).

Wir konnten keine klinischen Faktoren, einschließlich Geschlecht, Auswirkung von kardiovaskulären Risikofaktoren (Diabetes mellitus Typ 2, Raucherstatus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie), Komedikation (P2Y12-Hemmer) und Begleiterkrankungen (Herzinsuffizienz, KHK, chronische Nierenerkrankung, Vorhofflimmern) identifizieren, die mit einer schnelleren Progression einer AS assoziiert sind.

Es gibt widersprüchliche Daten bezüglich des Alters und des Risikos einer AS-Progression. In einer kleineren Studie mit 49 Patienten, Peter et al. stellten fest, dass ein höheres Alter und das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit mit einem schnelleren Anstieg des AS-Gradienten verbunden sind (Peter et al., 1993). Zur gleichen Zeit fanden Roger et al. in ihrer Studie mit 112 Patienten keinen Zusammenhang zwischen Alter, Geschlecht, EF oder dem Vorliegen einer KHK und der Erhöhung der transvalvulären Geschwindigkeit (Roger et al., 1990). In unserer Kohorte waren die Patienten mit SP-AS jünger (LP-AS vs. SP-AS; Median, IQR; 79 (71 - 83) vs. 76 (69 - 81), $p < 0,001$).

Patienten mit einem hohen Risiko für eine schnelle Progression sollten daher regelmäßig überwacht werden. In zukünftigen Studien muss untersucht werden, ob Patienten mit den echokardiographischen Kriterien für eine schnelle Progression von einem früheren Zeitpunkt der Intervention profitieren könnten.

4.2. Proinflammatorische Rolle von Thrombozyten bei Aortenstenose

Sowohl in vivo als auch in vitro Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte Thrombozytenaktivität ein Faktor in der Pathogenese der AS ist (Bouchareb et al., 2019). In unserer Arbeit wurde eine starke Anreicherung von Thrombozyten in den AK von Personen mit SP-AS nachgewiesen. Die Wandschubspannung und der turbulente Blutfluss durch eine stenosierte AK aktivieren das Endothel was wiederum die Blutplättchen aktiviert und ihre Adhäsion an den Klappentaschen stimuliert (Bouchareb et al., 2019). Aktivierte Thrombozyten setzen Faktoren wie den transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TGF- β 1) frei, der die Fibrose und Verkalkung des Klappengewebes fördert. Obwohl alle Zellen zur Produktion von TGF- β 1 in der Lage sind, sind die Blutplättchen für die Produktion von 40 bis 50 % des zirkulierenden TGF- β 1 verantwortlich (Varshney et al., 2019). TGF- β 1 fördert die Umwandlung von VECs und VICs in kollagenproduzierende Myofibroblasten und dadurch Verstärkung der Fibrose und Mineralisierung (Varshney et al., 2019). Außerdem wird die Dehnung von Glykosaminoglykanen (GAGs) durch TGF- β 1 stimuliert, insbesondere in der Spongiosaschicht der AK, was die Lipidbindung in der ECM erhöht (Mathieu et al., 2015). In Mausmodellen beschleunigte die Gabe von aktivierten Thrombozyten die Entwicklung einer kalzifizierten AS um das 2,1-fache (Bouchareb et al., 2019). Die Infiltration von Immunzellen und die Differenzierung von VICs in myofibroblastische und osteoblastische Phänotypen ist ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung von DAVK und wird durch Zytokine und extrazelluläre Vesikel reguliert, die von Thrombozyten und Immunzellen sekretiert werden (Jansen et al., 2017). Unsere Ergebnisse erweitern den aktuellen Wissensstand, da wir zeigen, dass die lokale Ansammlung von Thrombozyten mit einem entzündlichen Klappenphänotyp verbunden ist, der eine erhöhte Anzahl der infiltrierenden Makrophagen und Monozyten aufweist. Dies deutet darauf hin, dass sowohl Blutplättchen als auch Immunzellen die Differenzierung von VICs und VECs beeinflussen könnten, was letztendlich zu Fibrose und Kalzifizierung führt. Eine lokale Entzündung, die durch Blutplättchen ausgelöst wird, könnte eine weitere wichtige Komponente in den komplexen Mechanismen der DAVK sein. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die eine durch Blutplättchen vermittelte osteogene Differenzierung von AS (Bouchareb et al., 2019) beschreiben und einen tieferen Einblick in durch die Blutplättchen regulierte Prozesse sowie deren Zusammenhänge mit dem Fortschreiten der Krankheit bieten. An der Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen sind verschiedene Mediatoren beteiligt. Die Hemmung der Thrombozytenadhäsion mildert bei Menschen und in Tiermodellen die Gefäßentzündung und Plaquebildung (Massberg et al., 2002). So führte die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Glykoprotein (GP) Iba zu einer

deutlichen Verringerung der Leukozytenakkumulation und zur Abschwächung der Bildung der atherosklerotischen Läsionen an Aortensinus und -taschen in ApoE^{-/-} Mäusen (Massberg et al., 2002), was auf eine wichtige Rolle bei der lokalen Entzündung/Kalkbildung schließen lässt. Diese Ergebnisse belegen, dass die Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Auslösung proinflammatorischer und atherogener Prozesse spielen, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt.

4.3. Das Vorhandensein von aktivierten Thrombozyten kann als Biomarker verwendet werden, um eine kalzifizierte Aortenklappenstenose frühzeitig zu erkennen.

Das Vorhandensein aktivierter Blutplättchen kann das Fortschreiten einer kalzifizierten AS anzeigen, aber seine Eignung als Biomarker für die Früherkennung wird noch untersucht und ist noch nicht abschließend geklärt. Aktivierte Thrombozyten werden mit dem Fortschreiten der DAVK in Verbindung gebracht, da sie das osteogene Programm und die Mineralisierung der Aortenklappe fördern (Bouchareb et al., 2019). Es ist jedoch unklar, ob ihr Vorhandensein ein Prädiktor für das Auftreten einer DAVK ist, bevor es zu einer signifikanten Verkalkung der Aortenklappe kommt. Spezifische Biomarker, die mit der Thrombozytenaktivierung in Zusammenhang stehen, wie CD40L und Plättchenfaktor 4, wurden in anderen Kontexten untersucht, wie z. B. bei der Sepsis-assoziierten disseminierten intravasalen Gerinnung, jedoch nicht speziell für die Früherkennung von DAVK (Wegrzyn et al., 2021). In der Studie von Tzolos et al. wurde ein neuartiger Radiotracer, 18F-GP1, zum Nachweis aktivierter Thrombozyten auf bioprothetischen Aortenklappen verwendet (Tzolos et al., 2022). Der Schwerpunkt dieser Studie lag jedoch auf bioprothetischen Klappen und nicht auf nativen Klappen mit DAVK. In ähnlicher Weise haben die Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop gezeigt, dass auf der Oberfläche von verkalkten Aortenklappen aktivierte Blutplättchen vorhanden sind (Bouchareb et al., 2019). Diese Methode erfordert jedoch eine invasive Probenahme und ist unter Umständen für den Einsatz in der Früherkennung nicht geeignet. Nach derzeitigem Kenntnisstand deuten aktivierte Blutplättchen eher auf ein Fortschreiten der Erkrankung als auf eine Früherkennung hin. Eine frühzeitige Erkennung würde die Identifizierung spezifischer Marker für die Thrombozytenaktivierung erfordern, die eindeutig mit den frühen Stadien von DAVK in Verbindung stehen. Die Untersuchung des zeitlichen Zusammenhangs zwischen Thrombozytenaktivierung und der Entwicklung von CAVD könnte Aufschluss über den möglichen Einsatz von Thrombozytenmarkern zur Früherkennung und Überwachungsstrategien geben.

4.4. Die Rolle von MIF bei der Progression der Aortenstenose

MIF ist ein multifunktionelles Zytokin, das als wichtiger Regulator von Entzündungs- und Immunreaktionen fungiert und sowohl bei akuten als auch bei chronischen Entzündungszuständen, unter allem bei kardiovaskulären Erkrankungen, eine wichtige Rolle spielt. Zytokine und Chemokine, die den Transport von Immunzellen zum entzündeten Gewebe koordinieren, werden von Thrombozyten und Monozyten gespeichert und freigesetzt (Noels et al., 2019, Weber and Noels, 2011). Eine Thrombozytenaktivierung könnte auch bei AS als Folge von Scherkräften auftreten, die durch turbulente Strömungsmuster an der Aortenklappe verursacht werden (Goody et al., 2020). Blutplättchen sind eine Hauptquelle für MIF und andere proinflammatorische Zytokine/Chemokine, die bei Aktivierung freigesetzt werden (Wirtz et al., 2015, Bernhagen et al., 2007). Die Thrombozyten sind in der Lage, eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren zu sezernieren, darunter MIF, was für die Verstärkung der Gefäßentzündung verantwortlich ist (Jin et al., 2021). MIF ist auch an der Entstehung und am Fortschreiten der Atherosklerose beteiligt, da ein Mangel an MIF die Atheroprogression bei LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen reduziert (Pan et al., 2004). Die Studie von Bernhagen et al. zeigt, dass MIF ein proinflammatorischer Immunmodulator ist, der über CXCR2/4/7 und CD74 weitreichende Auswirkungen auf die Entzündungsreaktion und die Signalgebung des Immunsystems hat, indem er die Rekrutierung von Entzündungszellen und die proinflammatorische Genexpression initiiert (Bernhagen et al., 2007). Unsere Studie deutet darauf hin, dass MIF eine wichtige Rolle in den regulatorischen Prozessen spielen könnte, die die lokale Thrombozytenentzündung im Verlauf der AS steuern. Die Genexpressionsanalyse von Aortenklappengewebe der Patienten mit SP-AS und LP-AS zeigte signifikante Unterschiede in der Expression von Genen, die wichtige Entzündungswege kodieren. Unter den 50 am stärksten exprimierten Genen haben wir auch mehrere Gene identifiziert, von denen bekannt ist, dass sie mit MIF in Verbindung stehen und Entzündungsprozesse antreiben. Unter anderem stellten wir fest, dass die Gene, die eine Schlüsselrolle in der MIF-vermittelten Glukokortikoidregulation spielen, die bei Entzündungen von großer Bedeutung ist, bei SP-AS signifikant hochreguliert sind. Hier zeigen wir, dass CX3CL1 (Chemokin (C-X3-C-motif) Ligand 1), TNFSF8 (Tumornekrosefaktor-Superfamilie-Mitglied 8) und TNFSF13B in SP-AS erhöht sind, während wir eine verstärkte Expression von NF- κ B, IL17B und JAK2 in LP-AS fanden. TNFSF13B, auch bekannt als B-Zell-aktivierender Faktor (BAFF), wurde unter anderem als Zytokin beschrieben, das hauptsächlich von Monozyten und Neutrophilen produziert wird und eine entscheidende Rolle in der Homöostase von B-Zellen spielt (Schneider et al.,

1999). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MIF-vermittelte Expression von TNFSF13B zu entzündlichen Prozessen bei SP-AS beitragen kann. Ein erhöhter TNFSF13B-Spiegel bei SP-AS ist ein interessantes Ergebnis, da er durch den monoklonalen Antikörper Belimumab therapeutisch beeinflusst werden kann (Gonzalez-Serna et al., 2018).

Außerdem zeigen unsere Nanostring-Ergebnisse eine unterschiedliche Expression regulatorischer Gene, die eine wichtige Rolle bei der Regulierung der angeborenen Immunität und Steuerung der Komplementkaskade spielen. Dazu gehört beispielsweise SERPING1 (Serinprotease-Inhibitor-Familie-G-Mitglied 1), ein Gen, das eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Entzündungen und der Blutgefäßfunktion spielt und ähnlich wie MIF die Komplementaktivierung und die angeborene Immunität reguliert. Seine Expression ist signifikant erhöht bei SP-AS.

CX3CL1, auch als Fraktalkin bekannt, ist ein einzigartiges Chemokin, das eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Zellmigration und Signaltransduktion spielt. MIF und Fraktalkin werden beide in Immunzellen, Blutplättchen und Endothelzellen exprimiert und sind an der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen an den Ort der lokalen Schädigung beteiligt. In unserer Kohorte fanden wir eine signifikant erhöhte CX3CL1-Expression bei SP-AS, was wiederum auf eine ausgeprägte Entzündungsreaktion im Klappengewebe dieses Phänotyps hinweist. Da CX3CL1 synergistische Effekte mit MIF zeigt, kann man davon ausgehen, dass beide Signalwege die Aktivierung von Thrombozyten und Monozyten/Makrophagen und damit die Entzündung des Klappengewebes regulieren.

Wir fanden auch Unterschiede in der Genexpression von NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), einem wichtigen Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Entzündungen, Immunreaktionen und dem Überleben von Zellen spielt und die Expression zahlreicher Chemokine, Zytokine, Transkriptionsfaktoren und regulatorischer Proteine reguliert. NF- κ B ist ein wichtiger Mediator bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose (Matsumori, 2023). Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Hochregulierung von NF- κ B bei den Patienten mit LP-AS, was darauf hindeuten könnte, dass die Aktivierung von NF- κ B eine wichtige Rolle bei entzündlichen und später bei kalzifizierenden Prozessen bei AS spielt. Es gibt Hinweise darauf, dass die MIF-Induktion bei Atherosklerose und Gefäßverkalkung tatsächlich NF- κ B-abhängig ist. Oxidierte LDL (oxLDL) aktivieren NF- κ B und der aktivierte NF- κ B bindet dann an die MIF-Promotorregion und induziert die MIF-Expression (Yurdagul et al., 2016). Dieser Prozess spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose und der damit verbundenen kardiovaskulären Erkrankungen. Unsere Ergebnisse stimmen mit früheren Studien über die Bildung von atherosklerotischen Plaques und die Atheroprogression

überein. Das lässt sich vermuten, dass auch MIF- und NF- κ B-vermittelte Signalwege zu zunächst schnellen und dann chronischen Entzündungsprozessen führen könnten, die eine osteogene Differenzierung und eine eher langsame Verkalkung des Klappengewebes zur Folge haben.

4.5. Klinische Relevanz der Thrombozytenaktivierung bei AS

Bislang wird bei allen Patienten mit AS in der Regel eine "watch-and-wait"-Strategie verfolgt, unabhängig von der Progressionsrate der Erkrankung (Dweck et al., 2013, Vahanian et al., 2021, Otto et al., 2021). Die Entwicklung einer wirksamen Präventionsstrategie für AS ist ein ungedeckter Bedarf in der modernen Patientenversorgung (Goody et al., 2020).

Die Interaktion zwischen MIF, Thrombozyten und Monozyten/Makrophagen scheint zu den Entzündungsprozessen beizutragen, die das Fortschreiten der AS begünstigen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die pharmakologische Beeinflussung der MIF-Sekretion und/oder der durch MIF regulierten Prozesse eine künftige Behandlungsoption sein könnte um das Fortschreiten von DAVK und AS zu verzögern/verhindern.

Derzeit gibt es keine therapeutischen Strategien, die spezifisch auf MIF bei Aortenstenose abzielen. Wir können jedoch einige mögliche Ansätze ableiten, die auf der breiteren Rolle von MIF bei kardiovaskulären Erkrankungen basieren:

- 1. Einfluss auf die Thrombozyten-MIF-Achse:** Aufgrund der Erkenntnisse, dass aktivierte Blutplättchen und ihre Interaktion mit MIF eine Rolle bei der Progression von AS spielen, könnte die gezielte Beeinflussung dieser Interaktion ein vielversprechender Therapieansatz sein.
- 2. MIF-Inhibition:** Die Neutralisierung von MIF durch Antikörper oder niedermolekulare Antagonisten hat in Tiermodellen verschiedener Krankheiten zu einer Verbesserung des Therapieerfolgs geführt (Tilstam et al., 2017).
- 3. Einfluss auf MIF-assoziierte Signalwege:** Die Hemmung der Interaktion zwischen MIF und seinen Rezeptoren (z.B. CD74, CXCR2, CXCR4) könnte ein potentieller Therapieansatzpunkt sein (Tilstam et al., 2017). Außerdem, es besteht die Möglichkeit, dass die Modulation der durch MIF aktivierten nachgeschalteten Signalwege, wie beispielsweise den NF- κ B, zukünftig eine therapeutische Relevanz erlangen könnte (Jin et al., 2021).
- 4. Kombinationstherapien:** Die Kombination der MIF-Hemmung mit anderen Ansätzen, wie beispielsweise lipidsenkende Therapie (z. B. PCSK9-Inhibitoren) könnte eine vielversprechende Behandlungsoption darstellen, da diese bei der Verlangsamung des Fortschreitens der AS vielversprechende Ergebnisse gezeigt hat

(Natorska et al., 2021).

- 5. MIF-basierte Biomarker:** Die Entwicklung von MIF-basierten Biomarkern könnte zukünftig eine beschleunigte Progression von Aortenstenose prognostizieren, was für die Implementierung von Frühinterventionsstrategien von Nutzen sein könnte.

Es sei darauf verwiesen, dass die hier vorgestellten Strategien in gewissem Maße spekulativ sind. Ihre Grundlage bildet ein erweitertes Verständnis der Rolle von MIF bei kardiovaskulären Erkrankungen. Um diese potenziellen therapeutischen Ansätze speziell für die Aortenstenose zu entwickeln und zu validieren, ist weitere Forschung erforderlich.

5. Zusammenfassung

Der Fokus der vorliegenden Arbeit wurde auf die Analyse von 475 Patienten mit schwerer symptomatischer AS und mit einer Indikation für einen Aortenklappenersatz gelegt. Die Patienten wurden anhand wiederholter Echokardiographie in zwei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe mit LP- und eine Gruppe mit SP-AS. Daneben erfolgte die Beurteilung der Krankheitsgeschichte zu Studienbeginn, die Erfassung der Begleitmedikation, Komorbiditäten und Blutentnahmen für routinemäßige Laborparameter, Marker-Expressionsanalysen auf Thrombozyten und Monozyten sowie Chemokin-Profilung. In einer Subgruppe von 134 Patienten wurde eine Computertomographie der Aortenklappe und der Aorta vor dem Klappenersatz durchgeführt. Außerdem wurden Gewebeproben von explantierten Klappen bei Z.n chirurgischem Klappenersatz entnommen und histologisch, immunhistochemisch und auf Genexpression untersucht. Des Weiteren wurden Patienten mit LP-AS und SP-AS hinsichtlich lokaler Klappengewebsveränderungen und Veränderungen des Profils der lokalen Thrombozytenaggregation und Infiltration von Immunzellen miteinander verglichen.

Die Beurteilung der groben Pathologie der explantierten Klappen ergab einen signifikant höheren Verkalkungsgrad der AK-Taschen bei LP-AS im Vergleich zu SP-AS. Die histologische Analyse belegt, dass der Kollagengehalt des AK-Gewebes von SP-AS im Vergleich zu LP-AS signifikant erhöht ist. Die Analyse der AK bei LP-AS im Vergleich zu SP-AS zeigt demgegenüber eine signifikant höhere Mineralisierung.

Die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen belegen, dass das SP-AS-Klappengewebe im Vergleich zum LP-AS durch eine deutlich stärkere Infiltration von Entzündungszellen und Blutplättchen sowie eine geringere Verkalkung gekennzeichnet ist.

Die Genexpressionsanalyse hat ergeben, dass die Genexpression des MIFs war bei SP-AS

signifikant erhöht. Die Gewebeexpression von MIF korrelierte mit der Gewebeinfiltration von Makrophagen, Monozyten und Thrombozyten.

Die Ergebnisse der Netzwerkanalyse lassen den Schluss zu, dass MIF und die damit zusammenhängenden Signalwege bei Patienten mit SP-AS einen maßgeblichen Einfluss auf die lokale Entzündung des Klappengewebes ausüben.

Die hier vorgelegte Arbeit liefert einen Beitrag zum besseren Verständnis der thrombo-inflammatorischen Prozesse im Rahmen der CAVD. Die Identifizierung von Biomarkern, die mit der Progressionsgeschwindigkeit der CAVD korrelieren, ist insbesondere in der klinischen Praxis von entscheidender Bedeutung. Dadurch können in Zukunft Maßnahmen ergriffen werden, um das Fortschreiten der Erkrankung in frühen Stadien abzuschwächen.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, D. H., POPMA, J. J., REARDON, M. J., YAKUBOV, S. J., COSELLI, J. S., DEEB, G. M., GLEASON, T. G., BUCHBINDER, M., HERMILLER, J., JR., KLEIMAN, N. S., CHETCUTI, S., HEISER, J., MERHI, W., ZORN, G., TADROS, P., ROBINSON, N., PETROSSIAN, G., HUGHES, G. C., HARRISON, J. K., CONTE, J., MAINI, B., MUMTAZ, M., CHENOWETH, S., OH, J. K. & INVESTIGATORS, U. S. C. C. 2014. Transcatheter aortic valve replacement with a self-expanding prosthesis. *N Engl J Med*, 370, 1790-8.
- AGMON, Y., KHANDHERIA, B. K., MEISSNER, I., SICKS, J. R., O'FALLON, W. M., WIEBERS, D. O., WHISNANT, J. P., SEWARD, J. B. & TAJIK, A. J. 2001. Aortic valve sclerosis and aortic atherosclerosis: different manifestations of the same disease? Insights from a population-based study. *J Am Coll Cardiol*, 38, 827-34.
- AIKAWA, E., NAHRENDORF, M., FIGUEIREDO, J. L., SWIRSKI, F. K., SHTATLAND, T., KOHLER, R. H., JAFFER, F. A., AIKAWA, M. & WEISSLEDER, R. 2007. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*, 116, 2841-50.
- AMANULLAH, M. R., PIO, S. M., SIN, K. Y. K., MARSAN, N. A., DING, Z. P., STASSEN, J., LEON, M. B., GENEREUX, P., DELGADO, V., EWE, S. H. & BAX, J. J. 2022. Factors Affecting Rate of Progression of Aortic Stenosis and Its Impact on Outcomes. *Am J Cardiol*, 185, 53-62.
- ASHIKHMINA, E. A., SCHAFF, H. V., DEARANI, J. A., SUNDT, T. M., 3RD, SURI, R. M., PARK, S. J., BURKHART, H. M., LI, Z. & DALY, R. C. 2011. Aortic valve replacement in the elderly: determinants of late outcome. *Circulation*, 124, 1070-8.
- BAUMGARTNER, H., FALK, V., BAX, J. J., DE BONIS, M., HAMM, C., HOLM, P. J., IUNG, B., LANCELLOTTI, P., LANSAC, E., RODRIGUEZ MUNOZ, D., ROSENHEK, R., SJOGREN, J., TORNOS MAS, P., VAHANIAN, A., WALTHER, T., WENDLER, O., WINDECKER, S., ZAMORANO, J. L. & GROUP, E. S. C. S. D. 2017. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*, 38, 2739-2791.
- BERNHAGEN, J., KROHN, R., LUE, H., GREGORY, J. L., ZERNECKE, A., KOENEN, R. R., DEWOR, M., GEORGIEV, I., SCHOBBER, A., LENG, L., KOOISTRA, T., FINGERLE-ROWSON, G., GHEZZI, P., KLEEMANN, R., MCCOLL, S. R., BUCALA, R., HICKEY, M. J. & WEBER, C. 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*, 13, 587-96.
- BLOOM, B. R. & BENNETT, B. 1966. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 153, 80-2.
- BOFFA, M. B. & KOSCHINSKY, M. L. 2019. Oxidized phospholipids as a unifying theory for lipoprotein(a) and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 16, 305-318.
- BOUCHAREB, R., BOULANGER, M. C., TASTET, L., MKANNEZ, G., NSAIBIA, M. J., HADJI, F., DAHOU, A., MESSADEQ, Y., ARSENAULT, B. J., PIBAROT, P., BOSSE, Y., MARETTE, A. & MATHIEU, P. 2019. Activated platelets promote an osteogenic programme and the progression of calcific aortic valve stenosis. *Eur Heart J*, 40, 1362-1373.
- BOZZA, F. A., GOMES, R. N., JAPIASSU, A. M., SOARES, M., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., BOZZA, P. T. & BOZZA, M. T. 2004. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock*, 22, 309-13.
- BREISCH, E. A., WHITE, F. C. & BLOOR, C. M. 1984. Myocardial characteristics of pressure overload hypertrophy. A structural and functional study. *Lab Invest*, 51, 333-42.
- BRENER, S. J., DUFFY, C. I., THOMAS, J. D. & STEWART, W. J. 1995. Progression of aortic stenosis in 394 patients: relation to changes in myocardial and mitral valve dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 25, 305-10.
- BURGER-KENTISCHER, A., GOEBEL, H., SEILER, R., FRAEDRICH, G., SCHAEFER, H. E., DIMMELER, S., KLEEMANN, R., BERNHAGEN, J. & IHLING, C. 2002. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1561-6.
- BUTTRICK, P. & SCHEUER, J. 1992. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation*, 86, 1336-8.
- CALANDRA, T. & ROGER, T. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3, 791-800.
- CARABELLO, B. A. 2013. Introduction to aortic stenosis. *Circ Res*, 113, 179-85.
- CHAN, K. L., TEO, K., DUMESNIL, J. G., NI, A., TAM, J. & INVESTIGATORS, A. 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.

- CHEN, Z., SAKUMA, M., ZAGO, A. C., ZHANG, X., SHI, C., LENG, L., MIZUE, Y., BUCALA, R. & SIMON, D. 2004. Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 709-14.
- CHUANG, Y. C., CHEN, H. R. & YEH, T. M. 2015. Pathogenic roles of macrophage migration inhibitory factor during dengue virus infection. *Mediators Inflamm*, 2015, 547094.
- CRIBIER, A., ELTCHANINOFF, H., BASH, A., BORENSTEIN, N., TRON, C., BAUER, F., DERUMEAUX, G., ANSELME, F., LABORDE, F. & LEON, M. B. 2002. Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*, 106, 3006-8.
- DAVID, J. R. 1966. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 56, 72-7.
- DE JONG, Y. P., ABADIA-MOLINA, A. C., SATOSKAR, A. R., CLARKE, K., RIETDIJK, S. T., FAUBION, W. A., MIZOGUCHI, E., METZ, C. N., ALSAHLI, M., TEN HOVE, T., KEATES, A. C., LUBETSKY, J. B., FARRELL, R. J., MICHETTI, P., VAN DEVENTER, S. J., LOLIS, E., DAVID, J. R., BHAN, A. K. & TERHORST, C. 2001. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol*, 2, 1061-6.
- DWECK, M. R., KHAW, H. J., SNG, G. K., LUO, E. L., BAIRD, A., WILLIAMS, M. C., MAKIELLO, P., MIRSDRAEE, S., JOSHI, N. V., VAN BEEK, E. J., BOON, N. A., RUDD, J. H. & NEWBY, D. E. 2013. Aortic stenosis, atherosclerosis, and skeletal bone: is there a common link with calcification and inflammation? *Eur Heart J*, 34, 1567-74.
- EVEBORN, G. W., SCHIRMER, H., HEGGELUND, G., LUNDE, P. & RASMUSSEN, K. 2013. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromso study. *Heart*, 99, 396-400.
- FAGGIANO, P., GHIZZONI, G., SORGATO, A., SABATINI, T., SIMONCELLI, U., GARDINI, A. & RUSCONI, C. 1992. Rate of progression of valvular aortic stenosis in adults. *Am J Cardiol*, 70, 229-33.
- GAHL, B., CELIK, M., HEAD, S. J., VANOVERSCHELDE, J. L., PIBAROT, P., REARDON, M. J., VAN MIEGHEM, N. M., KAPPETEIN, A. P., JUNI, P. & DA COSTA, B. R. 2020. Natural History of Asymptomatic Severe Aortic Stenosis and the Association of Early Intervention With Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Cardiol*, 5, 1102-1112.
- GALEONE, A., BRUNETTI, G., ORANGER, A., GRECO, G., DI BENEDETTO, A., MORI, G., COLUCCI, S., ZALLONE, A., PAPARELLA, D. & GRANO, M. 2013. Aortic valvular interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Int J Cardiol*, 169, 296-304.
- GHAISAS, N. K., FOLEY, J. B., O'BRIAIN, D. S., CREAN, P., KELLEHER, D. & WALSH, M. 2000. Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels and effects of valve replacement. *J Am Coll Cardiol*, 36, 2257-62.
- GOMEZ, M., BLE, M., CLADELLAS, M., MOLINA, L., COMIN-COLET, J., ENJUANES, C., ROQUETA, C., SOLER, C. & BRUGUERA, J. 2015. Effect of correction of anemia on echocardiographic and clinical parameters in patients with aortic stenosis involving a three-cuspid aortic valve and normal left ventricular ejection fraction. *Am J Cardiol*, 116, 270-4.
- GONZALEZ-SERNA, D., ORTIZ-FERNANDEZ, L., VARGAS, S., GARCIA, A., RAYA, E., FERNANDEZ-GUTIERREZ, B., LOPEZ-LONGO, F. J., Balsa, A., GONZALEZ-ALVARO, I., NARVAEZ, J., GOMEZ-VAQUERO, C., SABIO, J. M., GARCIA-PORTALES, R., GONZALEZ-ESCRIBANO, M. F., TOLOSA, C., CARREIRA, P., KIEMENEY, L., COENEN, M. J. H., WITTE, T., SCHNEIDER, M., GONZALEZ-GAY, M. A. & MARTIN, J. 2018. Association of a rare variant of the TNFSF13B gene with susceptibility to Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep*, 8, 8195.
- GOODY, P. R., HOSEN, M. R., CHRISTMANN, D., NIEPMANN, S. T., ZIETZER, A., ADAM, M., BONNER, 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.
- GORLIN, R. & GORLIN, S. G. 1951. Hydraulic formula for calculation of the area of the stenotic mitral valve, other cardiac valves, and central circulatory shunts. I. *Am Heart J*, 41, 1-29.
- GOULD, K. L. & CARABELLO, B. A. 2003. Why angina in aortic stenosis with normal coronary arteriograms? *Circulation*, 107, 3121-3.
- GROSSMAN, W., JONES, D. & MCLAURIN, L. P. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*, 56, 56-64.
- GUMMERT, J. F., FUNKAT, A. K., BECKMANN, A., ERNST, M., HEKMAT, K., BEYERSDORF, F. & SCHILLER, W. 2011. Cardiac surgery in Germany during 2010: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 59, 259-67.

- GUNTHER, S. & GROSSMAN, W. 1979. Determinants of ventricular function in pressure-overload hypertrophy in man. *Circulation*, 59, 679-88.
- HACHICHA, Z., DUMESNIL, J. G., BOGATY, P. & PIBAROT, P. 2007. Paradoxical low-flow, low-gradient severe aortic stenosis despite preserved ejection fraction is associated with higher afterload and reduced survival. *Circulation*, 115, 2856-64.
- HARKEN, D. E., SOROFF, H. S., TAYLOR, W. J., LEFEMINE, A. A., GUPTA, S. K. & LUNZER, S. 1960. Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 40, 744-62.
- HE, X. X., YANG, J., DING, Y. W., LIU, W., SHEN, Q. Y. & XIA, H. H. 2006. Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric carcinogenesis. *Gut*, 55, 797-802.
- HJORTNAES, J., NEW, S. E. P. & AIKAWA, E. 2013. Visualizing novel concepts of cardiovascular calcification. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23, 71-79.
- HUO, Y., SCHOBBER, A., FORLOW, S. B., SMITH, D. F., HYMAN, M. C., JUNG, S., LITTMAN, D. R., WEBER, C. & LEY, K. 2003. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med*, 9, 61-7.
- ISHIHARA, K., ZILE, M. R., NAGATSU, M., NAKANO, K., TOMITA, M., KANAZAWA, S., CLAMP, L., DEFREYTE, G. & CARABELLO, B. A. 1992. Coronary blood flow after the regression of pressure-overload left ventricular hypertrophy. *Circ Res*, 71, 1472-81.
- JANSEN, F., XIANG, X. & WERNER, N. 2017. Role and function of extracellular vesicles in calcific aortic valve disease. *Eur Heart J*, 38, 2714-2716.
- JIN, K., ZHENG, L., YE, L., XIE, Z., GAO, J., LOU, C., PAN, W., PAN, B., LIU, S., CHEN, Z. & HE, D. 2021. Chicago sky blue 6B (CSB6B), an allosteric inhibitor of macrophage migration inhibitory factor (MIF), suppresses osteoclastogenesis and promotes osteogenesis through the inhibition of the NF-kappaB signaling pathway. *Biochem Pharmacol*, 192, 114734.
- JUTTNER, S., BERNHAGEN, J., METZ, C. N., ROLLINGHOFF, M., BUCALA, R. & GESSNER, A. 1998. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J Immunol*, 161, 2383-90.
- KANDA, H., YAMAKUCHI, M., MATSUMOTO, K., MUKAIHARA, K., SHIGEHISA, Y., TACHIOKA, S., OKAWA, M., TAKENOUCHE, K., OYAMA, Y., HASHIGUCHI, T. & IMOTO, Y. 2021. Dynamic changes in platelets caused by shear stress in aortic valve stenosis. *Clin Hemorheol Microcirc*, 77, 71-81.
- KELLY, T. A., ROTHBART, R. M., COOPER, C. M., KAISER, D. L., SMUCKER, M. L. & GIBSON, R. S. 1988. Comparison of outcome of asymptomatic to symptomatic patients older than 20 years of age with valvular aortic stenosis. *Am J Cardiol*, 61, 123-30.
- KIM, K. M. 1976. Calcification of Matrix Vesicles in Human Aortic-Valve and Aortic Media. *Federation Proceedings*, 35, 156-162.
- KUPARI, M., TURTO, H. & LOMMI, J. 2005. Left ventricular hypertrophy in aortic valve stenosis: preventive or promotive of systolic dysfunction and heart failure? *Eur Heart J*, 26, 1790-6.
- LAN, H. Y., YANG, N., NIKOLIC-PATERSON, D. J., YU, X. Q., MU, W., ISBEL, N. M., METZ, C. N., BUCALA, R. & ATKINS, R. C. 2000. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int*, 57, 499-509.
- LEE, R., LI, S., RANKIN, J. S., O'BRIEN, S. M., GAMMIE, J. S., PETERSON, E. D., MCCARTHY, P. M., EDWARDS, F. H. & SOCIETY OF THORACIC SURGEONS ADULT CARDIAC SURGICAL, D. 2011. Fifteen-year outcome trends for valve surgery in North America. *Ann Thorac Surg*, 91, 677-84; discussion p 684.
- LEECH, M., METZ, C., HALL, P., HUTCHINSON, P., GIANIS, K., SMITH, M., WEEDON, H., HOLDSWORTH, S. R., BUCALA, R. & MORAND, E. F. 1999. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum*, 42, 1601-8.
- LESTER, S. J., HEILBRON, B., GIN, K., DODEK, A. & JUE, J. 1998. The natural history and rate of progression of aortic stenosis. *Chest*, 113, 1109-14.
- LI, F., ZHAO, Z., CAI, Z., DONG, N. & LIU, Y. 2015. Oxidized low-density lipoprotein promotes osteoblastic differentiation of valvular interstitial cells through RAGE/MAPK. *Cardiology*, 130, 55-61.
- LINCOLN, J., ALFIERI, C. M. & YUTZEY, K. E. 2004. Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos. *Dev Dyn*, 230, 239-50.
- 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.

- LUCAS, G. & TRIBOUILLOY, C. 2000. [Epidemiology and etiology of acquired heart valve diseases in adults]. *Rev Prat*, 50, 1642-5.
- MALOUF, J., LE TOURNEAU, T., PELLIKKA, P., SUNDT, T. M., SCOTT, C., SCHAFF, H. V. & ENRIQUEZ-SARANO, M. 2012. Aortic valve stenosis in community medical practice: determinants of outcome and implications for aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 144, 1421-7.
- MARCUS, M. L., DOTY, D. B., HIRATZKA, L. F., WRIGHT, C. B. & EASTHAM, C. L. 1982. Decreased coronary reserve: a mechanism for angina pectoris in patients with aortic stenosis and normal coronary arteries. *N Engl J Med*, 307, 1362-6.
- MARK, A. L., ABOUD, F. M., SCHMID, P. G. & HEISTAD, D. D. 1973a. Reflex vascular responses to left ventricular outflow obstruction and activation of ventricular baroreceptors in dogs. *J Clin Invest*, 52, 1147-53.
- MARK, A. L., KIOSCHOS, J. M., ABOUD, F. M., HEISTAD, D. D. & SCHMID, P. G. 1973b. Abnormal vascular responses to exercise in patients with aortic stenosis. *J Clin Invest*, 52, 1138-46.
- MARTINEY, J. A., SHERRY, B., METZ, C. N., ESPINOZA, M., FERRER, A. S., CALANDRA, T., BROXMEYER, H. E. & BUCALA, R. 2000. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun*, 68, 2259-67.
- MASSBERG, S., BRAND, K., GRUNER, S., PAGE, S., MULLER, E., MULLER, I., BERGMEIER, W., RICHTER, T., LORENZ, M., KONRAD, I., NIESWANDT, B. & GAWAZ, M. 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*, 196, 887-96.
- MATEOS, N., GOMEZ, M., HOMAR, A., GARCIA-ELIAS, A., YANEZ, L., TAJES, M., MOLINA, L., BLE, M., CLADELLAS, M., ROQUETA, C. & BENITO, B. 2022. Plasmatic PCSK9 Levels Are Associated with Very Fast Progression of Asymptomatic Degenerative Aortic Stenosis. *J Cardiovasc Transl Res*, 15, 5-14.
- MATHIEU, P., BOUCHARREB, R. & BOULANGER, M. C. 2015. Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease. *J Immunol Res*, 2015, 851945.
- MATSUMORI, A. 2023. Nuclear Factor-kappaB is a Prime Candidate for the Diagnosis and Control of Inflammatory Cardiovascular Disease. *Eur Cardiol*, 18, e40.
- MOSCH, J., GLEISSNER, C. A., BODY, S. & AIKAWA, E. 2017. Histopathological assessment of calcification and inflammation of calcific aortic valves from patients with and without diabetes mellitus. *Histol Histopathol*, 32, 293-306.
- MUELLER, K. A. L., LANGNAU, C., HARM, T., SIGLE, M., MOTT, K., DROPPA, M., BORST, O., ROHLFING, A. K., GEKELER, S., GUNTER, 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.
- MURAKAMI, H., AKBAR, S. M., MATSUI, H. & ONJI, M. 2001. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur J Clin Invest*, 31, 337-43.
- NATORSKA, J., BYKOWSKA, K., HLAWATY, M., MAREK, G., SADOWSKI, J. & UNDAS, A. 2011. Increased thrombin generation and platelet activation are associated with deficiency in high molecular weight multimers of von Willebrand factor in patients with moderate-to-severe aortic stenosis. *Heart*, 97, 2023-8.
- NATORSKA, J., KOPYTEK, M. & UNDAS, A. 2021. Aortic valvular stenosis: Novel therapeutic strategies. *Eur J Clin Invest*, 51, e13527.
- NEW, S. E. & AIKAWA, E. 2011. Cardiovascular calcification: an inflammatory disease. *Circ J*, 75, 1305-13.
- NISTRIS, S., FAGGIANO, P., OLIVOTTO, I., PAPPESO, B., BORDONALI, T., VESCOVO, G., DEI CAS, L., CECCHI, F. & BONOW, R. O. 2012. Hemodynamic progression and outcome of asymptomatic aortic stenosis in primary care. *Am J Cardiol*, 109, 718-23.
- NKOMOMO, 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.
- NOELS, H., WEBER, C. & KOENEN, R. R. 2019. Chemokines as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39, 583-592.
- NSAIBIA, M. J., BOULANGER, M. C., BOUCHARREB, R., MKANNEZ, G., LE QUANG, K., HADJI, F., ARGAUD, D., DAHOU, A., BOSSE, 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-kappaB pathway. *Cardiovasc Res*, 113, 1351-1363.
- O'BRIEN, J. R., ETHERINGTON, M. D., BRANT, J. & WATKINS, J. 1995. Decreased platelet function in aortic valve stenosis: high shear platelet activation then inactivation. *Br Heart J*, 74, 641-4.
- O'BRIEN, K. D., REICHENBACH, D. D., MARCOVINA, S. M., KUUSISTO, J., ALPERS, C. E. & OTTO, C. M. 1996. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16, 523-32.
- OLSSON, M., THYBERG, J. & NILSSON, J. 1999. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 1218-22.
- 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.
- OTTO, C. M., NISHIMURA, R. A., BONOW, R. O., CARABELLO, B. A., ERWIN, J. P., 3RD, GENTILE, F., JNEID, H., KRIEGER, E. V., MACK, M., MCLEOD, C., O'GARA, P. T., RIGOLIN, V. H., SUNDT, T. M., 3RD, THOMPSON, A. & TOLY, C. 2021. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 143, e72-e227.
- OTTO, C. M. & P. A. PELLIKKA, Y. S. B. 2022. Clinical manifestations and diagnosis of aortic stenosis in adults. https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-aortic-stenosis-in-adults?sectionName=Symptoms&topicRef=8165&anchor=H13&source=see_link#H112078599.
- OTTO, C. M. & PRENDERGAST, B. 2014. Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med*, 371, 744-56.
- P. A. PELLIKKA, O. C. M., YEON S B. 2022. Natural history, epidemiology, and prognosis of aortic stenosis. https://www.uptodate.com/contents/natural-history-epidemiology-and-prognosis-of-aortic-stenosis?topicRef=8115&source=see_link#H125740305 [Online].
- PAN, J. H., SUKHOVA, G. K., YANG, J. T., WANG, B., XIE, T., FU, H., ZHANG, Y., SATOSKAR, A. R., DAVID, J. R., METZ, C. N., BUCALA, R., FANG, K., SIMON, D. I., CHAPMAN, H. A., LIBBY, P. & SHI, G. P. 2004. Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*, 109, 3149-53.
- PANZER, S., BADR ESLAM, R., SCHNELLER, A., KAIDER, A., KOREN, D., EICHELBERGER, B., ROSENHEK, R., BUDDE, U. & LANG, I. M. 2010. Loss of high-molecular-weight von Willebrand factor multimers mainly affects platelet aggregation in patients with aortic stenosis. *Thromb Haemost*, 103, 408-14.
- PARK, C. W., KIM, K. S., BAE, S., SON, H. K., MYUNG, P. K., HONG, H. J. & KIM, H. 2009. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells*, 2, 59-68.
- PARK, S. J., ENRIQUEZ-SARANO, M., CHANG, S. A., CHOI, J. O., LEE, S. C., PARK, S. W., KIM, D. K., JEON, E. S. & OH, J. K. 2013. Hemodynamic patterns for symptomatic presentations of severe aortic stenosis. *JACC Cardiovasc Imaging*, 6, 137-46.
- PAWADE, T. A., NEWBY, D. E. & DWECK, M. R. 2015. Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key. *J Am Coll Cardiol*, 66, 561-77.
- PEETERS, F., MEEX, 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.
- PELLIKKA, P. A., NISHIMURA, R. A., BAILEY, K. R. & TAJIK, A. J. 1990. The natural history of adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*, 15, 1012-7.
- PELOWE, A. S., SAULER, M., HOU, Y., MEROLA, J., LIU, R., CALDERON, B., LAURIDSEN, H. M., HARRIS, M. R., LENG, L., ZHANG, Y., TILSTAM, P. V., POBER, J. S., BUCALA, R., LEE, P. J. & GONZALEZ, A. L. 2019. Endothelial cell-secreted MIF reduces pericyte contractility and enhances neutrophil extravasation. *FASEB J*, 33, 2171-2186.
- PETER, M., HOFFMANN, A., PARKER, C., LUSCHER, T. & BURCKHARDT, D. 1993. Progression of aortic stenosis. Role of age and concomitant coronary artery disease. *Chest*, 103, 1715-9.
- PROHASKA, W., ZITTERMANN, A., LUTH, J. U., INOUE, K., KOSTER-EISERFUNKE, W., BALLER, D., KORFER, R. & KLEESIEK, K. 2008. Prevalent platelet dysfunction in patients with aortic valve disease. *J Heart Valve Dis*, 17, 542-7.

- PROUDFOOT, D., SKEPPER, J. N., HEGYI, L., BENNETT, M. R., SHANAHAN, C. M. & WEISSBERG, P. L. 2000. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res*, 87, 1055-62.
- QIAO, C., LI, S., LU, H., MENG, F., FAN, Y., GUO, Y., CHEN, Y. E. & ZHANG, J. 2018. Laminar Flow Attenuates Macrophage Migration Inhibitory Factor Expression in Endothelial Cells. *Sci Rep*, 8, 2360.
- RAJAPPAN, K., RIMOLDI, O. E., CAMICI, P. G., BELLENGER, N. G., PENNELL, D. J. & SHERIDAN, D. J. 2003. Functional changes in coronary microcirculation after valve replacement in patients with aortic stenosis. *Circulation*, 107, 3170-5.
- ROGER, V. L., TAJIK, A. J., BAILEY, K. R., OH, J. K., TAYLOR, C. L. & SEWARD, J. B. 1990. Progression of aortic stenosis in adults: new appraisal using Doppler echocardiography. *Am Heart J*, 119, 331-8.
- ROSENHEK, R., BINDER, T., PORENTA, G., LANG, I., CHRIST, G., SCHEMPER, M., MAURER, G. & BAUMGARTNER, H. 2000. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med*, 343, 611-7.
- ROSENHEK, R., KLAAR, U., SCHEMPER, M., SCHOLTEN, C., HEGER, M., GABRIEL, H., BINDER, T., MAURER, G. & BAUMGARTNER, H. 2004. Mild and moderate aortic stenosis. Natural history and risk stratification by echocardiography. *Eur Heart J*, 25, 199-205.
- ROSS, D. N. 1962. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet*, 2, 487.
- ROSS, J., JR. 1976. Afterload mismatch and preload reserve: a conceptual framework for the analysis of ventricular function. *Prog Cardiovasc Dis*, 18, 255-64.
- ROSS, J., JR. & BRAUNWALD, E. 1968. Aortic stenosis. *Circulation*, 38, 61-7.
- RUTKOVSKIY, A., MALASHICHEVA, A., SULLIVAN, G., BOGDANOVA, M., KOSTAREVA, A., STENSLOKKEN, K. O., FIANE, A. & VAAGE, J. 2017. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc*, 6.
- SAIKRISHNAN, N., KUMAR, G., SAWAYA, F. J., LERAKIS, S. & YOGANATHAN, A. P. 2014. Accurate assessment of aortic stenosis: a review of diagnostic modalities and hemodynamics. *Circulation*, 129, 244-53.
- SCHNEIDER, P., MACKAY, F., STEINER, V., HOFMANN, K., BODMER, J. L., HOLLER, N., AMBROSE, C., LAWTON, P., BIXLER, S., ACHA-ORBEA, H., VALMORI, D., ROMERO, P., WERNER-FAVRE, C., ZUBLER, R. H., BROWNING, J. L. & TSCHOPP, J. 1999. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*, 189, 1747-56.
- SELZER, A. 1987. Changing aspects of the natural history of valvular aortic stenosis. *N Engl J Med*, 317, 91-8.
- SIMIONESCU, D. T., LOVEKAMP, J. J. & VYAVAHARE, N. R. 2003. Glycosaminoglycan-degrading enzymes in porcine aortic heart valves: implications for bioprosthetic heart valve degeneration. *J Heart Valve Dis*, 12, 217-25.
- SMITH, C. R., LEON, M. B., MACK, M. J., MILLER, D. C., MOSES, J. W., SVENSSON, L. G., TUZCU, E. M., WEBB, J. G., FONTANA, G. P., MAKKAR, R. R., WILLIAMS, M., DEWEY, T., KAPADIA, S., BABALIAROS, V., THOURANI, V. H., CORSO, P., PICHARD, A. D., BAVARIA, J. E., HERRMANN, H. C., AKIN, J. J., ANDERSON, W. N., WANG, D., POCOCCO, S. J. & INVESTIGATORS, P. T. 2011. Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients. *N Engl J Med*, 364, 2187-98.
- SURENDRAN, A., EDEL, A., CHANDRAN, M., BOGAERT, P., HASSAN-TASH, P., KUMAR ASOKAN, A., HIEBERT, B., SOLATI, Z., SANDHAWALIA, S., RAABE, M., KASS, M., SHAH, A., JASSAL, D. S., JALEEL, A. & RAVANDI, A. 2020. Metabolomic Signature of Human Aortic Valve Stenosis. *JACC Basic Transl Sci*, 5, 1163-1177.
- TILSTAM, P. V., QI, D., LENG, L., YOUNG, L. & BUCALA, R. 2017. MIF family cytokines in cardiovascular diseases and prospects for precision-based therapeutics. *Expert Opin Ther Targets*, 21, 671-683.
- TUTAR, E., EKICI, F., ATALAY, S. & NACAR, N. 2005. The prevalence of bicuspid aortic valve in newborns by echocardiographic screening. *Am Heart J*, 150, 513-5.
- TZOLOS, E., KWIECINSKI, J., BERMAN, D., SLOMKA, P., NEWBY, D. E. & DWECK, M. R. 2022. Latest Advances in Multimodality Imaging of Aortic Stenosis. *J Nucl Med*, 63, 353-358.
- VAHANIAN, A., BEYERSDORF, F., PRAZ, F., MILOJEVIC, M., BALDUS, S., BAUERSACHS, J., CAPODANNO, D., CONRADI, L., DE BONIS, M., DE PAULIS, R., DELGADO, V., FREEMANTLE, N., GILARD, M., HAUGAA, K. H., JEPPSSON, A., JUNI, P., PIERARD, L., PRENDERGAST, B. D., SADABA, J. R., TRIBOUILLOY, C., WOJAKOWSKI, W. & GROUP, E. E. S. D. 2021. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg*, 60, 727-800.
- VARSHNEY, R., MURPHY, B., WOOLINGTON, S., GHAFOORY, S., CHEN, S., ROBISON, T. & AHAMED, J. 2019. Inactivation of platelet-derived TGF-beta1 attenuates aortic stenosis progression in a robust murine model. *Blood Adv*, 3, 777-788.

- VESELY, I. 1998. The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech*, 31, 115-23.
- VINCENNELLI, A., SUSEN, S., LE TOURNEAU, T., SIX, I., FABRE, O., JUTHIER, F., BAUTERS, A., DECOENE, C., GOUDEMAMAND, J., PRAT, A. & JUDE, B. 2003. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med*, 349, 343-9.
- WEBER, C. & NOELS, H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, 17, 1410-22.
- WEGRZYN, G., WALBORN, A., RONDINA, M., FAREED, J. & HOPPENSTEADT, D. 2021. Biomarkers of Platelet Activation and Their Prognostic Value in Patients With Sepsis-Associated Disseminated Intravascular Coagulopathy. *Clin Appl Thromb Hemost*, 27, 1076029620943300.
- WEISER, W. Y., POZZI, L. M. & DAVID, J. R. 1991. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill *Leishmania donovani*. *J Immunol*, 147, 2006-11.
- WIRTZ, T. H., TILLMANN, S., STRUSSMANN, T., KRAEMER, S., HEEMSKERK, J. W., GROTTKE, O., GAWAZ, M., VON HUNDELSHAUSEN, P. & BERNHAGEN, J. 2015. Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis*, 239, 1-10.
- WU, B., WANG, Y., XIAO, F., BUTCHER, J. T., YUTZEY, K. E. & ZHOU, B. 2017. Developmental Mechanisms of Aortic Valve Malformation and Disease. *Annu Rev Physiol*, 79, 21-41.
- YABUNAKA, N., NISHIHARA, J., MIZUE, Y., TSUJI, M., KUMAGAI, M., OHTSUKA, Y., IMAMURA, M. & ASAKA, M. 2000. Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 23, 256-8.
- YAMAGUCHI, E., NISHIHARA, J., SHIMIZU, T., TAKAHASHI, T., KITASHIRO, N., HIZAWA, N., KAMISHIMA, K. & KAWAKAMI, Y. 2000. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy*, 30, 1244-9.
- YEARWOOD, T. L., MISBACH, G. A. & CHANDRAN, K. B. 1989. Experimental fluid dynamics of aortic stenosis in a model of the human aorta. *Clin Phys Physiol Meas*, 10, 11-24.
- 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.
- YURDAGUL, A., JR., SULZMAIER, F. J., CHEN, X. L., PATTILLO, C. B., SCHLAEPFER, D. D. & ORR, A. W. 2016. Oxidized LDL induces FAK-dependent RSK signaling to drive NF-kappaB activation and VCAM-1 expression. *J Cell Sci*, 129, 1580-91.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Abteilung für Kardiologie und Angiologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Frau PD Dr. med. Karin Müller durchgeführt. Im Rahmen meiner Promotionsarbeit habe ich die Aortenklappengewebe aus der Herzchirurgie gesammelt und in einer Biodatenbank dokumentiert. Dabei wurden auch die entsprechenden demografischen Daten erfasst. Im weiteren Verlauf habe ich die Schnitte der Aortenklappengewebe angefertigt und die histologischen Untersuchungen sowie deren Analysen unter Supervision von Frau PD Dr. med. Karin Müller durchgeführt. Die anschließenden histologischen Analysen habe ich selbstständig mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Hierbei habe ich selbstständig die Areale der Kalzifikationen und Fibrosierung detektiert und in einer Daten-Tabelle zur weiteren Analyse eingetragen. Im weiteren Anschluss habe ich die demographischen Daten aller eingeschlossenen Patienten erhoben. Ein besonderes Augenmerk habe ich auf die Echokardiografie-Daten verwendet und hier die langfristigen Verläufe zur Bestimmung der maximal ansteigenden Gradienten im Zeitintervall erhoben. Die statistischen Analysen habe ich unter der Anleitung von Frau PD Dr. med. Karin Müller soweit selbstständig durchgeführt, ebenso die Erstellung der Abbildungen. Die Analysen und Datentabellen habe ich ebenfalls selbstständig erhoben und in den vorgelegten Tabellen im Rahmen der Doktorarbeit bereitgestellt. Die genetischen Analysen des Aortenklappenmaterials wurden in Kooperation mit einem auswärtigen Labor in Martinsried, München, erhoben. Die Daten wurden nach der Genanalyse für die weitere Auswertung für mich zur Verfügung gestellt, hierbei hatte ich Unterstützung durch Herrn Dr. med. Tobias Harm und Frau PD Dr. med. Karin Müller für die weitere Erstellung von Histogramm und Abbildungen.

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

Tübingen, den 27.01.2025

(Serhii Shcherbyna)

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben, meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

In erster Linie möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. Karin Müller für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die kontinuierliche, sowohl fachlich als auch persönlich wunderbare Unterstützung über viele Jahre hinweg bedanken. Ohne die hervorragende Betreuung und die enorme zeitliche Verfügbarkeit von Frau PD Dr. med. Karin Müller wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Dissertation abzuschließen. Ein großes Dankeschön dafür!

Ich möchte außerdem Prof. Dr. Meinrad Gawaz meinen aufrichtigen Dank dafür aussprechen, dass er es mir ermöglicht hat, meine Forschung am Institut durchzuführen. Ich habe mich sehr über seine Ratschläge und sein Engagement gefreut und möchte mich auch weiterhin für seine Unterstützung in meiner beruflichen Entwicklung bedanken.

Besonders dankbar bin ich Frau Dr. sc. hum. Tatsiana Castor, die mich seit meiner Zeit in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie des Universitätsklinikums Tübingen stets mit großem Engagement zur Seite gestanden hat. Ihre wertvollen Anregungen und freundlichen Worte waren eine große Unterstützung.

Ich möchte zum Schluss meinem in der Ukraine gefallenen Kameraden, Andrii Vytiaz, meinen tiefsten Dank aussprechen. Ohne ihn wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit zum Ende zu bringen. Ruhe in Frieden, mein Freund.