

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Immunhistochemische und durchflusszytometrische  
Untersuchungen bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2  
und kalzifizierender Aortenklappenstenose**

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

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

**vorgelegt von**

**Marquetand, Nura Susann**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. med. K. Müller

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Birkenfeld

Tag der Disputation: 14.12.2023

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die Aortenklappe .....	1
1.1.1. Anatomie der Aortenklappe .....	1
1.1.2. Funktion der Aortenklappe.....	2
1.1.3. Histologie der Aortenklappe.....	2
1.2. Die Aortenklappenstenose .....	3
1.3. Diabetes mellitus Typ 2 als Risikofaktor .....	12
1.4. Ziel dieser Arbeit .....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Material .....	14
2.1.1. Geräte und Software.....	14
2.1.2. Verbrauchsmaterial und Zubehör .....	15
2.1.3. Antikörper .....	15
2.1.4. Reagenzien und Chemikalien.....	17
2.1.5. Lösungen und Puffer .....	18
2.2. Methoden .....	19
2.2.1. Rahmenbedingungen .....	19
2.2.2. Studiendesign .....	20
2.2.3. Patientenpopulation .....	21
2.2.4. Histopathologie .....	22
2.2.4.1. Klappenprocurement .....	22
2.2.4.2. Paraffineinbettung .....	22
2.2.4.3. Anfertigen von Schnitten .....	23
2.2.4.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbungen .....	24
2.2.4.5. Immunhistochemische Färbung .....	25
2.2.4.6. Mikroskopie .....	27
2.2.4.7. Analyse der immunhistochemischen Färbungen.....	28
2.2.5. Durchflusszytometrie .....	30

2.2.5.1. Probenvorbereitung .....	31
2.2.5.2. Extrazelluläre Färbung .....	31
2.2.5.3. Intrazelluläre Färbung.....	32
2.2.5.4. Durchflusszytometrische Messungen und Analysen .....	35
2.2.6. Statistische Analyse.....	36
3. Ergebnisse .....	37
3.1. Patientencharakteristika.....	37
3.2. Ergebnisse der Histopathologie .....	39
3.2.1. Höhere Zellzahl im Klappengewebe bei DMT2 .....	39
3.2.2. Geringere Anzahl von CD3-Zellen im Klappengewebe bei DMT2....	41
3.2.3. Geringere Anzahl von CD16-Zellen im Klappengewebe bei DMT2..	43
3.2.4. Vergleichbare Anzahl von CD68-Makrophagen im Klappengewebe	47
3.2.5. Vergleichbare Thrombozyten-Expression im Klappengewebe .....	49
3.3. Ergebnisse der Durchflusszytometrie .....	51
3.3.1. Verändertes Monozyten-Expressionsprofil bei DMT2 .....	51
3.3.2. Erhöhte Thrombozytenaktivität bei DMT2 .....	56
4. Diskussion .....	61
4.1. Geringere Immunzellexpression im Klappengewebe bei DMT2 .....	62
4.2. Verändertes Monozyten-Profil bei Patienten mit DMT2.....	64
4.3. Verstärkte Thrombozytenaktivität bei DMT2 .....	68
4.4. Zusammenfassung und Ausblick .....	70
5. Zusammenfassung .....	74
6. Literaturverzeichnis .....	76
7. Erklärungen zum Eigenanteil .....	93
Danksagung .....	94
Anhang .....	I

## Abkürzungsverzeichnis

AGE	-	Advanced Glycation End products
ALP	-	Alkalische Phosphatase
AS	-	Aortenklappenstenose
ASE	-	American Society of Echocardiography
BAV	-	bikuspidale Aortenklappe
BMI	-	Body Mass Index
BMP2	-	Bone Morphogenetic Protein 2
bpm	-	Herschlag pro Minute
CABG	-	Koronararterien-Bypass
CAVD	-	kalzifizierende Aortenklappenstenose
CCR	-	C-C chemokine Receptor
CD	-	Cluster of Differentiation
CK	-	Creatin-Kinase
CRP	-	C-reaktives Protein
CXCL	-	C-X-C motif chemokine Ligand
CXCR	-	C-X-C motif chemokine Receptor
DMT2	-	Diabetes mellitus Typ 2
EKG	-	Elektrokardiogramm
EndMT	-	Endothelial to Mesenchymal Transition
EuroSCORE	-	European System for Cardiac Operative Risk Evaluation
EV	-	Extrazelluläre Vesikel
EZM	-	Extrazelluläre Matrix
FMO	-	Fluorescence Minus One
FSC	-	Forward Scatter
GFR	-	Glomeruläre Filtrationsrate
GP	-	Glykoprotein

Hb	-	Hämoglobin
HDL	-	High Density Lipoprotein
hs-Trop I	-	hochsensitives Troponin I
IL	-	Interleukin
Kardio-CT	-	Kardio-Computertomografie
Kardio-MRT	-	Kardio-Magnetresonanztomografie
KHK	-	Koronare Herzkrankheit
KÖF	-	Klappenöffnungsfläche
LDL	-	Low Density Lipoprotein
LV	-	linksventrikulär
MFI	-	Mittlere Fluoreszenzintensität
MIF	-	Macrophages migration Inhibitory Factor
nDMT2	-	kein Diabetes mellitus Typ 2
NFκB	-	Nuclear Factor κ B
NYHA	-	New York Heart Association
OPG	-	Osteoprogenin
NT-pro-BNP	-	N terminal pro-Brain Natriuretic Protein
PRR	-	Pattern Recognition Receptor
RAGE	-	Receptor for Advanced Glycation End products
RANK	-	Receptor Activator of Nuclear Faktor Kabba B
RANKL	-	Receptor Activator of Nuclear Faktor Kabba B Ligand
ROS	-	Reaktive Sauerstoffspezies
Runx2	-	Runt-related Transcription Factor 2
SSC	-	Side Scatter
STS-Score	-	Society of Thoracic Surgeons Score
TAVI	-	kathetergestützte Aortenklappen-Implantation
TEE	-	Transösophageale Echokardiografie
TGF-β	-	Transforming Growth Factor β
TNF-α	-	Tumornekrosefaktor α

- VEC - valvuläre endotheliale Zellen
- VIC - valvuläre interstitielle Zellen

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung Aortenklappenstenose .....	10
Tabelle 2: Antikörper- und Isotypverdünnung mit PBS .....	27
Tabelle 3: Beispiel eines Pipettierschemas für die Durchflusszytometrie .....	33
Tabelle 4: Patientencharakteristika .....	37

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des histologischen Aufbaus einer Aortenklappe .....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der CAVD-Pathogenese .....	8
Abbildung 3: Studiendesign .....	20
Abbildung 4: Darstellung der Applikation der Paraffin-Schnitte auf die Objektträger .....	24
Abbildung 5: Prinzip der Immunmarkierung .....	26
Abbildung 6: Analytierte Abschnitte des Aortenklappengewebes .....	28
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Systematik der Auswertung .....	29
Abbildung 8: Darstellung der Funktionsweise der Durchflusszytometrie .....	30
Abbildung 9: Höhere Zellzahl im Klappengewebe bei DMT2 .....	40
Abbildung 10: Geringere Anzahl von CD3-Zellen im Klappengewebe bei DMT2 .....	42
Abbildung 11: CD14-Immunfärbung von Aortenklappengewebe .....	44
Abbildung 12: Geringere Anzahl CD16-Monozyten im Klappengewebe bei DMT2 .....	46
Abbildung 13: CD68-Immunfärbung von Aortenklappengewebe bei CAVD .....	48
Abbildung 14: CD42b-Immunfärbung von Aortenklappengewebe bei CAVD .....	50
Abbildung 15: Expression von Monozyten-Subklassen nach manuellem Gating .....	52
Abbildung 16: Markerexpression klassischer Monozyten nach manuellem Gating .....	53
Abbildung 17: Markerexpression intermediärer Monozyten nach manuellem Gating .....	54
Abbildung 18: Unüberwachte Datenanalyse des Aktivierungspanels von Monozyten .....	55
Abbildung 19: Unüberwachte Datenanalyse des Chemokinpanels von Monozyten .....	56
Abbildung 20: Markerexpression von Thrombozyten nach manuellem Gating .....	57
Abbildung 21: Unüberwachte Datenanalyse von Thrombozyten .....	59
Abbildung 22: Unüberwachte Datenanalyse Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate .....	60



# 1. Einleitung

## 1.1. Die Aortenklappe

### 1.1.1. Anatomie der Aortenklappe

Die Aortenklappe (Valva aortae) ist eine von vier Herzklappen. Sie trennt den linken Ventrikel von der Aorta und soll den Rückfluss des ausgeworfenen Blutes verhindern. Als eine von zwei Taschenklappen, aufgrund ihrer Form auch Semilunarklappen genannt, besteht die Aortenklappe normalerweise aus drei halbmondförmigen Taschen (Valvula semilunaris). Entsprechend ihrer anatomischen Lage werden diese als Valvula semilunaris sinistra, Valvula semilunaris dextra und Valvula semilunaris posterior bezeichnet. Die Aortenklappe setzt an dem Ostium aortae in der Aortenwurzel am Übergang des linken Ventrikels in den aufsteigenden Teil der Aorta (Pars ascendens aortae) an. Verankert ist sie am Anulus fibrosus, einem bindegewebigen Faserring, der das proximale Ende der Aortenwurzel markiert. Durch die bauchige Erweiterung der Aortenwurzel ergeben sich zwischen den Klappentaschen und der Gefäßwand Räume, die sogenannten Sinus aortae oder Sinus Valsalvae, die in ihrer Gesamtheit den Bulbus aortae formen. In den Sinus der Valvulae semilunares sinistra und dextra befinden sich die jeweiligen Abgänge der Arteria coronaria sinistra und der Arteria coronaria dextra, weshalb sich im klinischen Alltag die Unterscheidung in linkskoronare, rechtskoronare und akoronare Aortenklappentasche etabliert hat. Schwalbennestartig ragen die freien Ränder (Lunulae valvarum semilunarium) jeder Valvula im geöffneten Zustand in das Aortenlumen hinein. Diese freien Ränder gehen mittig in einen bindegewebigen Knoten (Nodus valvae semilunaris) über. Bei Klappenschluss in der Diastole legen sich Lunulae und Noduli der drei Taschen aneinander und dichten so das Aortenlumen ab. Die Schnittpunkte der Taschen werden als Kommissuren bezeichnet und liegen auf Höhe der sinotubulären Junktion, einer gedachten Linie, die das distale Ende der Aortenwurzel begrenzt (Aumüller, Gerhard, Aust, Gabriela and Doll, Andreas, 2010: 526-531; Schünke, Schulte and Schumacher, 2012: 98-101).

### 1.1.2. Funktion der Aortenklappe

Die Aortenklappe fungiert während des Herzzyklus als Ein-Weg-Ventil zwischen linkem Ventrikel und der Aorta. In der Diastole befindet sich die Aortenklappe in einem geschlossenen Zustand, der linke Ventrikel erschlafft und füllt sich mit Blut. Sobald der dort vorherrschende Druck durch die Ventrikelkontraktion in der Systole den der Aorta übersteigt, öffnet sich die Aortenklappe und erlaubt so den Blutausstrom in den systemischen Kreislauf. Fällt der intraventrikuläre Druck unter den in der Aorta bestehenden Druck, schließt sich die Aortenklappe wieder (Aumüller, Gerhard, Aust, Gabriela and Doll, Andreas, 2010: 526-531).

### 1.1.3. Histologie der Aortenklappe

Die Herzklappe ist unter physiologischen Umständen gut an die hämodynamischen Beanspruchungen des Herzzyklus adaptiert.

Ihre drei Schichten unterscheiden sich in ihrem jeweiligen Aufbau und sind an die regional verschiedenen mechanischen Einwirkungen angepasst: Die Aortenklappe besteht aus einer zur Aorta hin orientierten Lamina fibrosa, einer ventrikelwärts gerichteten Lamina ventricularis und der mittig gelegenen Lamina spongiosa. Umgeben ist die Klappe beidseits von einer Endothelschicht.

Die Lamina fibrosa macht den größten Teil der Klappe aus und besteht aus dicken, dicht gepackten Fasern aus Kollagen Typ I und III. Auf sie wirkt vor allem Zugspannung. Neben Kollagen weist die Lamina ventricularis einen hohen Anteil an radiär angeordnetem Elastin auf, was zur Elastizität und Verformbarkeit der Klappe beiträgt. Sie ist am stärksten Scherspannung ausgesetzt. Als lose strukturierte, Glykosaminoglykan-reiche Schicht dient die Lamina spongiosa wahrscheinlich vor allem als eine Art Stoßdämpfer, indem sie regionalspezifische Kräfte verteilt und ausgleicht (Stella and Sacks, 2007).

Die Zellen der Herzklappe werden als valvulär interstitielle Zellen (VIC, von engl. valvular interstitial cells) zusammengefasst und weisen Charakteristika von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Myofibroblasten auf (Taylor *et al.*, 2003). Sie sind vor allem für die Produktion, den Umbau und die Reparatur der extrazellulären Matrix (EZM) zuständig. Diese bildet die Grundsubstanz der

Klappenschichten, vorwiegend bestehend aus Elastin, Kollagen und wasserziehenden Glykosaminoglykanen (Taylor, Allen and Yacoub, 2000; Taylor *et al.*, 2003). Bei entsprechendem Reiz segregieren VIC Botenstoffe und Enzyme, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Matrix-Metalloproteasen. Auf diese Weise beeinflussen sie wesentlich Struktur und Funktion der Aortenklappe (Liu, Joag and Gotlieb, 2007). Spezialisierte valvuläre endotheliale Zellen (VEC, von engl. valvular endothelial cells) bilden die äußere Monoschicht, die antiadhäsive und antiproliferative Eigenschaften besitzt (El-Hamamsy, Chester and Yacoub, 2010). Der histologische Aufbau der Aortenklappe ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

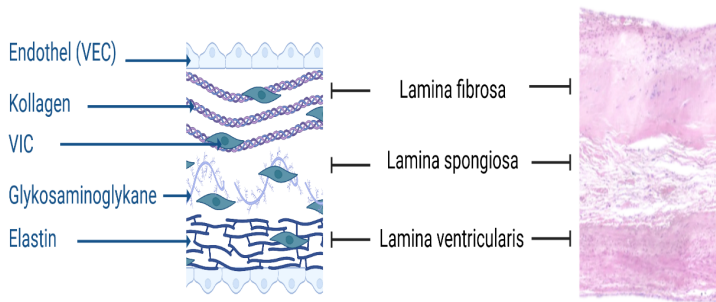


Abbildung 1: Schema des histologischen Aufbaus einer Aortenklappe

Links: Schematische Darstellung einzelner Strukturen des Klappengewebes, rechts: Schnitt einer Aortenklappe nach HE-Färbung. Abkürzungen: VEC – valvuläre endotheliale Zelle, VIC – valvuläre interstitielle Zelle. Eigene Abbildung, erstellt mit BioRender.

## 1.2. Die Aortenklappenstenose

Die Aortenklappenstenose (AS) ist der häufigste behandlungswürdige Klappenfehler weltweit (Nkomo *et al.*, 2006). Dabei macht die kalzifizierende Aortenklappenstenose (CAVD, von engl. Calcific Aortic Valve Disease) in Europa und Nordamerika den Hauptanteil der Krankheitsentität aus. Das Spektrum der CAVD reicht von der Aortenklappensklerose mit milder Taschenverdickung bis zur stark kalzifizierten und funktionell beeinträchtigten Aortenklappenstenose mit Verengung der linksventrikulären (kurz LV) Ausflussbahn (Otto *et al.*, 1994). Sie

betrifft insbesondere über 65-Jährige, die Prävalenz beträgt 3 % und steigt mit zunehmendem Alter stark an (Eveborn *et al.*, 2013). Infolge der Alterung der Bevölkerung ist daher eine stete Zunahme der Erkrankungsrate in den nächsten Jahren und damit ein wachsender Einfluss auf unser Gesundheitssystem und seine Ressourcen zu erwarten (Yadgir *et al.*, 2020).

Die CAVD wird als erworbenen AS klassifiziert. Eine weitere erworbene Form ist die postreumatische AS, die auf eine Infektion mit  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken zurückzuführen ist und infolge konsequenter antibiotischer Therapie mit mehrjähriger Rezidivprophylaxe in den Ländern des Globalen Nordens nur noch selten auftritt (Olsson, Thyberg and Nilsson, 1999; Dass and Kanmanthareddy, 2022). Selten sind auch angeborene AS, die durch einen zu engen Klappenring, Taschenanomalien oder zusätzlich angelegte membranöse Strukturen bedingt sind. Die häufigste und klinisch relevanteste kongenitale Klappenfehlbildung ist die bikuspidale Aortenklappe (BAV, von engl. bicuspid aortic valve), die mit familiärer Häufung und männlicher Prädominanz 1 bis 2 % der Normalbevölkerung betrifft. Statt physiologisch von drei Taschen wird die Aortenklappe dabei nur von zwei Taschen gebildet und auch wenn sie primär nicht mit einer AS assoziiert sein muss, weist sie aufgrund einer erhöhten mechanischen Beanspruchung in der Regel zwei Dekaden früher Klappenveränderungen auf als bei physiologischer, trikuspidaler Klappenanlage (Beppu *et al.*, 1993; Pachulski and Chan, 1993; Ward, 2000; Sievers and Schmidtke, 2007; Michel-Behnke, Murin and Sarikouch, 2020).

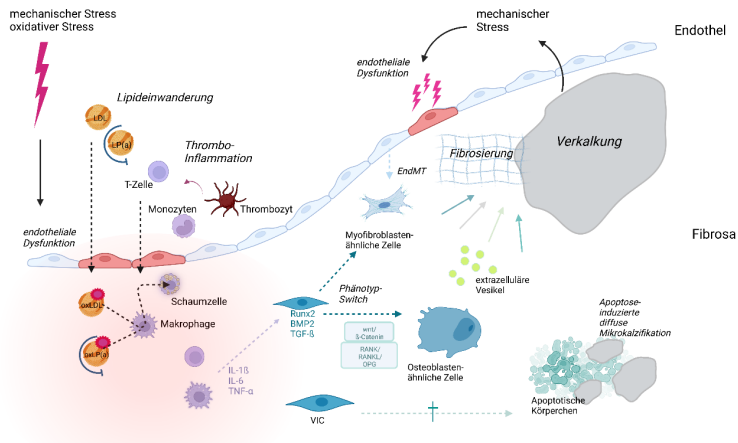
Die Pathogenese der CAVD ist noch nicht vollständig geklärt. In der Vergangenheit galt die CAVD als degenerative Verschleißerscheinung, mittlerweile stützen jedoch viele Studien die Hypothese, dass ihr ein komplexer aktiver Prozess zu Grunde liegt: Endotheliale Dysfunktion, Lipideinlagerung mit Thrombo-Inflammation und Umwandlung der VIC in fibro-kalzifizierende Phänotypen tragen zur Pathophysiologie bei (Freeman and Otto, 2005; Aikawa and Libby, 2017). Ähnliche Beobachtungen finden sich in der Frühphase der Atherosklerose, beide Erkrankungen weisen im Verlauf jedoch ultrastrukturelle Unterschiede auf (Otto *et al.*, 1994; Kostyunin *et al.*, 2020). Wie von Aikawa und Otto (2012) vorgeschlagen, lässt sich die Pathogenese der CAVD grob in drei

Phasen einteilen: einer Initiationsphase mit vorherrschender Inflammation folgt eine Propagationsphase mit ersten Kalzifikationsherden, die schließlich in einem Endstadium mit irreversiblen Verkalkungen mündet. Mechanischer Stress scheint dabei ein wichtiger initiiender Faktor zu sein, was am frühen Beginn und raschen Verlauf der CAVD bei BAV gut demonstriert wird. Prädilektionsstelle für die durch die mechanische Beanspruchung entstehenden endothelialen Defekte scheinen analog zu atherosklerotischen Veränderungen diejenigen Bereiche zu sein, die in geringerem Ausmaß Scherspannung ausgesetzt sind (Asakura and Karino, 1990; Otto *et al.*, 1994; Simmons *et al.*, 2005). Bezogen auf die Klappenschichten finden sich die Verkalkungen dementsprechend in der subendothelialen Zone der aortalen Seite (Aikawa and Libby, 2017). Auch auf eine gewisse Spezialisierung der VEC beider Aortenklappenseiten wird eine unterschiedlich ausgeprägte Vulnerabilität hinsichtlich Verkalkungen zurückgeführt (Simmons *et al.*, 2005). Neben mechanischem Stress steht erhöhter oxidativer Stress im Verdacht, die endotheliale Dysfunktion zu begünstigen (Rajamannan *et al.*, 2011). Die Störung der endothelialen Barriere ermöglicht die Infiltration und Akkumulation von zirkulierenden Plasmalipoproteinen im Klappengewebe, allen voran LDL (von engl. Low Density Lipoprotein) und Lipoprotein (a), die durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, von engl. Reactive Oxygen Species) oxidiert werden und eine Entzündungskaskade in Gang setzen. So wandern über PRRs (von engl. Pattern Recognition Receptors), wie dem toll-like-receptor und NF- $\kappa$ B (von engl. Nuclear Factor  $\kappa$ B), aktivierte zirkulierende Immunzellen, vornehmlich T-Zellen und Monozyten, in das Gewebe ein (Olsson, Thyberg and Nilsson, 1999; Mathieu, Bouchareb and Boulanger, 2015). Hier entwickeln sich Monozyten zu Makrophagen und werden durch Aufnahme der oxidierten Lipide über ihre Scavenger-Rezeptoren zu Schaumzellen (Brown *et al.*, 1980; Otto *et al.*, 1994; Olsson, Thyberg and Nilsson, 1999). Auch zirkulierende Thrombozyten werden durch hämodynamische Veränderungen an der Klappe aktiviert und leisten einen Beitrag zum lokalen inflammatorischen Geschehen. Auf welche Weise sie die Pathogenese der CAVD beeinflussen ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird allerdings vermutet, dass sie nach Aktivierung durch hämodynamische

Veränderungen an der Aortenklappen Immunzellen aktivieren. (Sakamoto *et al.*, 2019). Von den Immunzellen und Thrombozyten ausgeschüttete Chemokine und Zytokine, wie TNF-alpha (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) und IL-6 (Interleukin-6) aktivieren die VIC und medieren ihre Differenzierung in myofibroblastische und osteogene Phänotypen (Kaden *et al.*, 2003; Kaden, Dempfle, *et al.*, 2005; Kaden, Kiliç, *et al.*, 2005; Galeone *et al.*, 2013; Goody *et al.*, 2020). Im Rahmen der „Endothelial to Mesenchymal Transition“ (EndMT) können sich bei entsprechendem Reiz auch VEC in mesenchymale Zellen umwandeln (Pardali *et al.*, 2017; Kovacic *et al.*, 2019). Infolge der gesteigerten Produktion und Deposition von Matrixkomponenten durch aktivierte VIC, hauptsächlich bestehend aus desorganisierten Kollagenfasern, kommt es zur Fibrosierung und Versteifung der Klappe. Die Kalzifikation des Klappengewebes erfolgt wahrscheinlich auf verschiedenen Wegen: Durch Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege wie beispielsweise der wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (wingless INT-1/ $\beta$ -Catenin) oder der RANK/RANKL/OPG-Signalweg (von engl. Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B/Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand/Osteoprotegerin) wird die Transformation der VIC in Osteoblasten-ähnlich Zellen vorangetrieben (Kaden *et al.*, 2004; Caira *et al.*, 2006; Duan and Bonewald, 2016). An diesem sog. Phänotyp-Switch scheinen Signalstoffe der Knochenbildung wie TGF- $\beta$  (von engl. Transforming Growth Factor  $\beta$ ), BMP2 (von engl. Bone Morphogenetic Protein 2) und Runx2 (von engl. Runt-related transcription factor 2) beteiligt zu sein. Auch konnte gezeigt werden, dass Knochenstoffwechsel-assoziierte Proteine wie ALP (Alkalische Phosphatase), Osteopontin und Osteocalcin exprimiert werden (O'Brien *et al.*, 1995; Mohler *et al.*, 1997, 1999, 2001; Rajamannan *et al.*, 2003). Extrazelluläre Vesikel (EV), die kalzifizierende Mediatoren beinhalten, tragen zur Formation von Hydroxylapatit-Nestern bei. Ihr Ursprung ist noch nicht abschließend geklärt, es wird allerdings vermutet, dass sie von Makrophagen und den transformierten VIC ausgeschüttet werden. Eine solche EV-induzierte Bildung von Hydroxylapatit-Nestern kann auch bei skelettaler Knochenbildung und bei vaskulärer Kalzifikation beobachtet werden. (Kim, 1976; Cui *et al.*, 2016; Krohn *et al.*, 2016; Jansen, Xiang and Werner, 2017). Vorangetrieben wird die Verkalkung der

valvulären EZM wahrscheinlich außerdem durch diffuse Mikrokalzifikation. Diese entsteht durch Mineralisierung apoptotischer Körperchen im Klappengewebe, die aus zugrunde gegangenen Immunzellen und VIC hervorgehen (Proudfoot *et al.*, 2000) (siehe auch Abbildung 2). Auch wenn die CAVD als fibro-kalzifizierende Erkrankung gilt, scheinen die pro-osteogenen Mechanismen ab einem gewissen Punkt zu dominieren (Peeters *et al.*, 2018).

Aufgrund der Ähnlichkeit der Initiationsphase zur Atherosklerose wird vermutet, dass die typischen kardiovaskuläre Risikofaktoren, zu denen neben genetischen Faktoren das Alter, das männliche Geschlecht, arterielle Hypertonie, Dyslipidämien und Diabetes mellitus Typ 2 gehören, zur Pathogenese beitragen (Mohler *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1997; Faggiano *et al.*, 2006; Sathyamurthy *et al.*, 2016; Ljungberg *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2017; Chen, Engert and Thanassoulis, 2019). Auf welche Weise diese Faktoren den Erkrankungsprozess beschleunigen, ist noch nicht abschließend geklärt. Ein möglicher Einfluss liegt in der Erhöhung des mechanischen oder oxidativen Stresses, der die endotheliale Dysfunktion begünstigt, einer verstärkten Lipidoxidation oder einer vermehrten Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der CAVD-Pathogenese**

Mechanischer und oxidativer Stress führen zu endothelialer Dysfunktion, die die Lipideinwanderung in das Klappengewebe ermöglichen mit anschließender Infiltration von Immunzellen, wie T-Zellen und Monozyten. Die Lipoproteine wie LDL und Lp(a) werden im Klappengewebe oxidiert. Monozyten entwickeln sich im Gewebe zu Makrophagen. Diese nehmen über ihre Scavenger-Rezeptoren Lipide auf und werden zu Schaumzellen. Oxidierte Lipide und Schaumzellen führen zur verstärkten Entzündungsreaktion. Immunzellen schütten pro-inflammatorische Moleküle aus, insbesondere IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , die die Differenzierung von VIC in mesenchymale und osteogene Phänotypen medieren. Intrazelluläre Signalwege wie der wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg oder der RANK/RANKL/OPG-Signalweg werden aktiviert. Involviert sind dabei mit Knochenbildung-assoziierte Transkriptionsfaktoren bzw. Wachstumsfaktoren wie Runx2, BMP2 und TGF- $\beta$ . Auch die VEC können sich im Rahmen der EndMT in mesenchymale Phänotypen transformieren. Durch verstärkte Bildung von Matrixkomponenten wie Kollagen kommt es zur Fibrosierung der Klappe. Extrazelluläre Vesikel mit kalzifizierendem Inhalt fördern die Bildung von Verkalkungsherden. Außerdem kommt es zur diffusen Mikrokalzifikation durch Mineralisierung von apoptotischen Körperchen, die aus apoptotischen VIC und Immunzellen bestehen. Abkürzungen: BMP2 – bone morphogenetic protein 2, EndMT – Endothelial to Mesenchymal Transition, IL-1 $\beta$  – Interleukin 1 $\beta$ , IL6 – Interleukin 6, LDL – Low Density Lipoprotein, LP(a) – Lipoprotein (a), oxLDL – oxidiertes Low Density Lipoprotein, oxLP(a) – oxidiertes Lipoprotein (a), RANK – Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B, RANKL – Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand, Runx2 – runt-related transcription factor 2, TNF- $\alpha$  – Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , VEC – valvuläre endotheliale Zelle, VIC – valvuläre interstitielle Zelle, wnt – wingless Int. Eigene Abbildung, erstellt mit BioRender.

Eine Verengung der physiologisch 3 bis 4 cm<sup>2</sup> großen Klappenöffnungsfläche (KÖF) bewirkt eine Erhöhung des Auswurfwiderstandes und stellt dadurch eine Druckbelastung für den linken Ventrikel dar. Um das Herzzeitvolumen aufrechterhalten zu können wird kompensatorisch die Wandspannung erhöht, was langfristig zur Ausbildung einer konzentrischen Hypertrophie führt. Patienten bleiben trotz Erkrankungsprogredienz lange asymptomatisch. Allerdings sind bei



Auftreten von Krankheitssymptomen (s.u.) Morbidität und Mortalität drastisch erhöht und die durchschnittliche 2-Jahres-Überlebensrate liegt ohne Behandlung bei etwa 50 % (Turina *et al.*, 1987; Leon *et al.*, 2010). Die konzentrische Hypertrophie bedingt durch Reduktion des Innenradius und Versteifung des Myokards eine diastolische Dysfunktion, infolge dieser es zur Lungenstauung mit pulmonaler Hypertonie kommen kann. Im Verlauf kann auch der erhöhte myokardiale Sauerstoffbedarf nicht mehr ausreichend gedeckt werden, da die Koronarperfusion durch die erhöhte Wandspannung beeinträchtigt ist. Es resultieren subendokardiale Ischämien mit Fibrosierung. Folge davon können eine reduzierten Pumpleistung und ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien sein. Typische Symptome der AS sind (Belastungs-) Dyspnoe, Schwindel sowie Angina pectoris („Brustenge“). Nicht selten ist der plötzliche Herztod Erstmanifestation einer schweren AS (Taniguchi *et al.*, 2022).

Leitbefund der AS ist ein spindelförmiges, raues Systolikum mit Punctum maximum im zweiten Interkostalraum rechts parasternal mit Fortleitung in die Karotiden bei Auskultation. Dazu lässt sich häufig ein Pulsus parvus et tardus (schwacher Puls mit langsam ansteigender Pulskurve) als Ausdruck eines verkleinerten und verzögert entleerten Schlagvolumens palpieren. Der systolische Blutdruck ist typischerweise hypoton, hypertone Werte schließen die AS allerdings nicht aus. Daneben können verschiedene unspezifische Begleiterscheinungen Hinweise auf die Klappenerkrankung geben. Dazu gehören Zeichen der Linksherzbelastung im Elektrokardiogramm (EKG) mit (überdrehtem) Linkstyp und Linksherzhypertrophie gemäß Sokolow-Index oder Zeichen einer Linksherzverbreiterung im Thorax-Röntgen (mit Herz-Thorax-Quotienten über 0,5 und einer Reduktion des Retrokardialraums). Goldstandard für die Diagnose und Einstufung der AS ist die Echo- bzw. Dopplersonografie (Herold, Gerd, 2016: 174-177). Gemäß der American Society of Echocardiography (ASE) sind die drei wichtigsten Parameter für die standardmäßige Beurteilung der Klappenerkrankung folgende: 1. die maximale transvalvuläre Jet-Geschwindigkeit (m/s), 2. der mittlere transvalvuläre Druckgradient (mmHg) und 3. die Klappenöffnungsfläche (cm<sup>2</sup>). Anhand dieser

Parameter kann eine AS als mild, mittelgradig oder hochgradig klassifiziert werden (H. Baumgartner *et al.*, 2017; Ring *et al.*, 2021).

Zur Berechnung des mittleren Druckgradienten kommt die Bernoulli-Gleichung zum Einsatz. Die hierfür benötigte transvalvuläre Flussgeschwindigkeit wird mit dem Continuous-wave Doppler (CW-Doppler) bestimmt. Die KÖF wird dabei mithilfe der Kontinuitätsrechnung berechnet. Dafür müssen mittels CW-Doppler die transvalvuläre Jet-Geschwindigkeit und mittels Pulsed-wave Doppler (PW-Doppler) der Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstraktes und die darüber gemessene Geschwindigkeit ermittelt werden.

Tabelle 1: Einteilung Aortenklappenstenose

	mild	moderat	hochgradig
Transvalvuläre Jet-Geschwindigkeit	2.6 – 2.9	3.0 – 4.0	$\geq 4.0$
Mittlerer transvalvulärer Gradient	< 20	20 – 40	$\geq 40$
Klappenöffnungsfläche	> 1.5	1.0 – 1.5	< 1.0

Angepasst nach ASE-Empfehlungen (H. Baumgartner *et al.*, 2017)

Weitere diagnostische Optionen, beispielsweise bei Unstimmigkeiten zwischen dem klinischen Untersuchungsbefund und der echokardiografischen Diagnostik, stellen die Transösophageale Echokardiografie (TEE), der Dobutamin-Stresstest, die Kardio-Magnetresonanztomografie (Kardio-MRT) und die Kardio-Computertomografie (Kardio-CT) mit Calcium-Scoring dar. Eine diagnostische Herzkatheteruntersuchung wird nur noch in seltenen Fällen empfohlen und ermöglicht zusätzlich die Beurteilung der Koronargefäße (Rafique *et al.*, 2009; Zamorano and Goncalves, 2010; Cuffe *et al.*, 2011; H. Baumgartner *et al.*, 2017; Pawade *et al.*, 2018; Ring *et al.*, 2021).

Der Klappenersatz ist aktuell die einzige Therapiemöglichkeit einer CAVD und kann operativ kardiochirurgisch oder mittels interventioneller kathetergestützter Aortenklappenimplantation (TAVI, von engl. Transcatheter Aortic Valve Implantation) erfolgen. Die Wahl des Klappenersatz-Verfahrens ist eine

patientenindividuelle Entscheidung unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren. Eine klare Empfehlung für den Klappenersatz ergibt sich bei Auftreten von Symptomen und bei Vorliegen einer hochgradigen Stenose mit eingeschränkter systolischer Ventrikelfunktion. Asymptomatische Patienten mit milder bis mittelgradiger Stenose werden in der Regel entsprechend des „watchful waiting“-Prinzips („Beobachten und Abwarten“) behandelt (Nishimura *et al.*, 2014; Otto *et al.*, 2021; Vahanian *et al.*, 2021). Dabei gilt es, individuell zwischen Eingriff-assoziierten Risiken und Komplikationen aufgrund von myokardialen Umbauprozessen abzuwiegen und mögliche negative Prädiktoren zu beachten, die für einen raschen Klappenersatz sprechen. Zu diesen gehören das Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren, Zeichen einer LV-Dysfunktion und abnorme Biomarker wie das NT-pro-BNP (von engl. N terminal pro-Brain Natriuretic Peptide). (Connolly *et al.*, 1997; Rosenhek *et al.*, 2000, 2004). Auch wenn die meisten Patienten mit vorherrschender LV-Funktionsstörung mit einer Verbesserung nach Klappenersatz rechnen können, erhöht sich dennoch das Risiko für intra- bzw. postoperative Komplikationen (Kennedy, Doces and Stewart, 1977; Schwarz *et al.*, 1982; Hwang *et al.*, 1989; Connolly *et al.*, 1997; Everett *et al.*, 2018). Der Verlauf ist dabei sehr individuell, weshalb es wichtig ist, rechtzeitig Hochrisikopatienten für einen raschen und schweren Verlauf zu identifizieren. Bisher konnten neben dem pro-BNP (Bergler-Klein *et al.*, 2004; Pfister *et al.*, 2010) als Indikator für kardiale Belastung und Dekompensation noch kein weiterer CAVD-spezifischer Biomarker gefunden werden, der das erhöhte Risiko für einen schlechten Verlauf prognostizieren bzw. bei der Identifikation von Hochrisikopatienten weiterhelfen könnte. Auch konnte noch keine präventive oder verlaufsmodifizierende medikamentöse Therapie etabliert werden. Verschiedene Pharmaka werden derzeit in Studien geprüft. Das Verständnis für die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu erweitern erscheint daher essenziell, um so weitere Angriffspunkte für etwaige neue medikamentöse Therapien zu ermöglichen.

### 1.3. Diabetes mellitus Typ 2 als Risikofaktor

Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) ist eine chronisch-progrediente Stoffwechselerkrankung, die durch periphere Insulinresistenz und pankreatische Betazellinsuffizienz gekennzeichnet ist. Seit einiger Zeit steigt die Prävalenz von DMT2 rasant an, was Gesundheitssysteme global vor erhebliche Herausforderungen stellt (American Diabetes Association, 2008; Danaei *et al.*, 2011; Jacobs *et al.*, 2017; Bommer *et al.*, 2018; Cho *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2020). DMT2 betrifft hauptsächlich Erwachsene über 40 Jahre und ist neben einer genetischen Disposition mit einem Lebensstil assoziiert, der geprägt ist von Überernährung und Bewegungsmangel (Rathmann *et al.*, 2003; Tamayo *et al.*, 2016). Wichtige Komorbiditäten sind daher Übergewicht (Body Mass Index/BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>), Dyslipidämien und arterielle Hypertonie, die bei gemeinsamem Auftreten mit DMT2 als metabolisches Syndrom zusammengefasst werden. Als Systemerkrankung betreffen die Folgen des DMT2 den gesamten Organismus mit Schädigung der Nieren, Nerven und Augen durch Mikroangiopathien und Komplikationen wie einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, einem Myokardinfarkt oder einem Schlaganfall durch makroangiopathische Veränderungen (Klein, 1995). DMT2 ist entsprechend einer der wichtigsten beeinflussbaren kardiovaskulären Risikofaktoren, kardiovaskuläre Erkrankungen sind wiederum eine der Hauptursachen für eine erhöhte Mortalität bei Patienten mit DMT2 (Larsson *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Raghavan *et al.*, 2019). Insbesondere eine unzureichende Therapie des gestörten Glucosestoffwechsels ist mit schlechten Verläufen assoziiert. Hinweise über einen insuffizient eingestellten DMT2 gibt die Höhe des Langzeitblutzuckers (HbA1c, von Hämoglobin A1c) (Stratton, 2000; Danaei *et al.*, 2006). Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Prävalenz von DMT2 bei Patienten mit CAVD höher ist als bei der Normalbevölkerung (Larsson *et al.*, 2018; Banovic, Athithan and McCann, 2019; Chen, Engert and Thanassoulis, 2019; Coisne *et al.*, 2022). Daneben gibt es Hinweise, dass DMT2 den Progress der CAVD beschleunigt. Die diesen Beobachtungen zugrundeliegenden Pathomechanismen sind dabei zu großen Teilen noch unverstanden. Allgemein besteht jedoch Konsens, dass

DMT2 bei AS mit einer deutlich schlechteren Herzfunktion assoziiert ist, die einerseits durch myokardiale Umbauprozesse, aber auch durch die Induktion von Folgeerkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit (KHK) bedingt ist (Falcão-Pires *et al.*, 2011). Dementsprechend sind Diabetiker von schlechteren Verläufen betroffen. Von einem besseren Verständnis des Einflusses von DMT2 auf die CAVD mit Identifikation potentieller Angriffspunkte für eine präventive oder verlaufsbeeinflussende könnten wahrscheinlich insbesondere Diabetiker profitieren.

#### 1.4. Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, das Verständnis für die Diabetes mellitus Typ 2-assozierte CAVD-Pathogenese zu erweitern. Dafür wurden die lokale und systemische Expression von Markern der Thrombo-Inflammation bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Patienten ohne Diabetes mellitus Typ 2 vergleichend untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Automatischer Hämatologie-Analysator Sysmex KX-21N	SYSMEX, Kobe/Japan
CO <sub>2</sub> Inkubator MCO-18AIC	SANYO, Gunma-Ken/Japan
Jung Multicut 2045 Mikrotom	Leica Instruments, Nussloch
Kühlplatte 70045	MEDAX Nagel, Kiel
Lichtmikroskop Nikon Eclipse NI	NIKON Deutschland, Düsseldorf
LSR Fortessa Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes/USA
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen
Paraffinspender Modell 71010	MEDAX Nagel, Kiel
Paraffinstreckbad Modell WB24	MEDAX Nagel, Kiel
Samsung Galaxy A70 Front Kamera	Samsung, Suwon/Südkorea
Trockenschrank Heraeus 6030	Heraeus, Hanau
Software	Hersteller
BioReader	BD Biosciences, Franklin Lakes/USA
Excel	Microsoft Corporation, Redmond/USA
FACS DIVA	BD Biosciences, Franklin Lakes/USA
Fiji Image J	Open Source
FlowJo 10.6.2	BD Biosciences, Franklin Lakes/USA
GIMP 2.10.30	Open Source
GraphPad Prism 8.4.0	GraphPad Software Inc, Boston/USA
IBM SPSS Statistics 26	SPSS Inc, Chicago/USA
NIS-Elements AR 5.21.00. 64 bits	NIKON Deutschland, Düsseldorf
NIS-Elements BR 2.1	NIKON Deutschland, Düsseldorf
OMIQ Data analysis	Omiq Inc, Santa Clara/USA
Power Point	Microsoft Corporation, Redmond/USA

Zotero	Open Source
--------	-------------

### 2.1.2. Verbrauchsmaterial und Zubehör

Material	Hersteller
Blutentnahme Safety-Multify® Set	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläser (24 x 50 mm, Stärke 1)	Langenbrinck, Emmendingen
Einbettkassetten Macrosette™	Roth, Karlsruhe
Einbettring	Zimpert, Québec/Kanada
Faltenfilter ROTILABO®	Roth, Karlsruhe
Färbekammer StainTray™	Roth, Karlsruhe
Färbekasten aus Glas	Roth, Karlsruhe
Färbekasten ROTILABO®	Roth, Karlsruhe
Glas-Einsatz für Färbekasten mit Drahtbügel	Roth, Karlsruhe
Gussformen aus Metall für Einbettungskassetten	Roth, Karlsruhe
Metall-Einsatz für Färbekasten	Roth, Karlsruhe
Mikrotomklingen S35 Feather	Langenbrinck, Emmendingen
Monovetten	Sarstedt, Nürnberg
Objekträger (25 x 75 x 1 mm), Super Frost® plus	Langenbrinck, Emmendingen
Objekträgerhalter ROTILABO®	Roth, Karlsruhe
Schwämme für Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Super PAP Pen Liquid Blocker	Science Services, München

### 2.1.3. Antikörper

Antikörper	Hersteller
<b>Immunhistochemie</b>	
Anti-CD3	Thermo Fisher, Waltham/USA
Anti-CD14	Santa Cruz, Dallas/USA

Anti-CD16	Santa Cruz, Dallas/USA
Anti-CD42b	Santa Cruz, Dallas/USA
Anti-CD68	Santa Cruz, Dallas/USA
Biotinylated Link Universal Sekundäntikörper	Agilent/Dako, Santa Clara/USA
Mouse IgG	Santa Cruz, Dallas/USA
Rabbit Immunoglobulin Fraction (Solid-Phase Absorbed)	Agilent/Dako, Santa Clara/USA
<b>Durchflusszytometrie</b>	
CD106 APC	BioLegend, San Diego/USA
CD11a BV650	BD, Franklin Lakes/USA
CD11b BV605	BioLegend, San Diego/USA
CD14 FITC	BioLegend, San Diego/USA
CD15 BV510	BioLegend, San Diego/USA
CD16 BV711	BioLegend, San Diego/USA
CD19 BV510	BioLegend, San Diego/USA
CD192 (CCR2) BV605	BioLegend, San Diego/USA
CD197 (CCR7) BV785	BioLegend, San Diego/USA
CD20 BV510	BioLegend, San Diego/USA
CD3 BV510	BioLegend, San Diego/USA
CD31 BV711	BioLegend, San Diego/USA
CD40 BV421	BioLegend, San Diego/USA
CD41 PaBI	BioLegend, San Diego/USA
CD42b PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego/USA
CD49a PECy7	BioLegend, San Diego/USA
CD54 PE	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD56 BV510	BioLegend, San Diego/USA
CD61 FITC	BioLegend, San Diego/USA
CD62L PECy7	BioLegend, San Diego/USA
CD62P PECy7	BioLegend, San Diego/USA
CD80 BV785	BioLegend, San Diego/USA



CX3CR1 PE/Dazzle 594	BioLegend, San Diego/USA
CXCL12 PE	R&D Systems, Minneapolis/USA
CXCL14 AF647	Novus Biological, Littleton/USA
CXCR4 BV650	BD, Franklin Lakes/USA
CXCR7 BV421	BD, Franklin Lakes/USA
HLA-DR PerCP Vio770	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MIF AF594	R&D Systems, Minneapolis/USA
IgG from human serum	Merck, Darmstadt

#### 2.1.4. Reagenzien und Chemikalien

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
<b>Histologie und Immunhistochemie</b>	
Citronensäure	Sigma-Aldrich, Darmstadt
DAB+ Chromogen, Liquid	Agilent/Dako, Santa Clara/USA
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin G	Roth, Karlsruhe
Ethanol >99 %	SAV, Flintsbach
Formaldehyd-Lösung 4 %, gepuffert	Fischar, Saarbrücken
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Paraffin Pastillen Paraplast Plus®	Roth, Karlsruhe
PBS Tabletten	Thermo Fisher, Waltham/USA
Proteinblock, Serum-free, Ready to use	Agilent/Dako, Santa Clara/USA
Roti®Histokitt	Roth, Karlsruhe
Roti®Histol	Roth, Karlsruhe
Streptavidin/HRP	Agilent/Dako, Santa Clara/USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	AppliChem gmbH, Darmstadt
Tween20	SigmaAldrich, St. Louis/USA
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth, Karlsruhe
<b>Durchflusszytometrie</b>	

Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Merck, Darmstadt
Erythrozyten lysierender Puffer „RBC Lysis Buffer (10 x)“	BioLegend, San Diego/USA
Fixierungspuffer „eBioscience™ Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set	Thermo Fisher, Waltham/USA
Gibco™ Fetal Bovine Serum (FBC), qualified, heat inactivated, United States	Thermo Fisher, Waltham/USA

### 2.1.5. Lösungen und Puffer

<b>Lösungen und Puffer</b>	
<b>Histologie und Immunhistochemie</b>	
Citratpuffer (pH 6)	41 ml Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,1 M (2,94 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 100 ml Aqua dest.) 9 ml Citronensäure 0,1 M (1,92 g Citronensäure in 100 ml Aqua dest.) 450 ml Aqua dest. Einstellen pH 6, unter tropfenweiser Zugabe von Salzsäure oder Natriumhydroxid
Eosin 1%-Lösung	2 g Eosin G 200 ml Aqua dest. 2 Tropfen Eisessig
Hämalaunlösung	50 ml Mayers Hämalaunlösung 250 ml Aqua dest., Durch Faltenfilter filtern
PBS mit 0,05 % Tween20	2 PBS-Tabletten

	1 l Aqua dest. 500 µl Tween20
Wasserstoffperoxid 3 %	10 ml Wasserstoffperoxid 30% 100 ml Aqua dest.
<b>Durchflusszytometrie</b>	
FACS Puffer	500 ml PBS 5 ml Hitze-inaktiviertes FCS 4.5 ml Natriumazid (0.09%) 2 mM EDTA
HEPES-Tyrode Puffer	10 mM HEPES 129 mM Natriumchlorid 8.9 mM Natriumhydrogencarbonat 0.8 mM Kaliumhydrogencarbonat 5.6 mM D-Glucose pH 7.4 einstellen und steril filtern
Fix/Perm-Lösung	50 µl Fixierungspuffer-Konzentrat 150 µl Reinstwasser (Millipore)
Färbepuffer	PBS 1 % FCS 2 mM EDTA 1 % Natriumazid
Perm Buffer	5 ml 10 x Perm Buffer 45 ml Reinstwasser (Millipore)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Rahmenbedingungen

Die Studie entspricht den Anforderungen der Deklaration von Helsinki und wurde vom Ethikrat der Universität Tübingen genehmigt (Antragsnummer 240/2018B02). Sie wurde gemäß den Richtlinien für „Gute wissenschaftliche

Praxis" durchgeführt. Jeder in die Studie eingeschlossene Patient hat der Teilnahme nach ausführlicher Aufklärung explizit schriftlich zugestimmt. Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Patientennamen durch den Buchstaben „K" und einer fortlaufenden Nummer (K - #) anonymisiert.

### 2.2.2. Studiendesign

Das Studiendesign ist Abbildung 3 zu entnehmen.

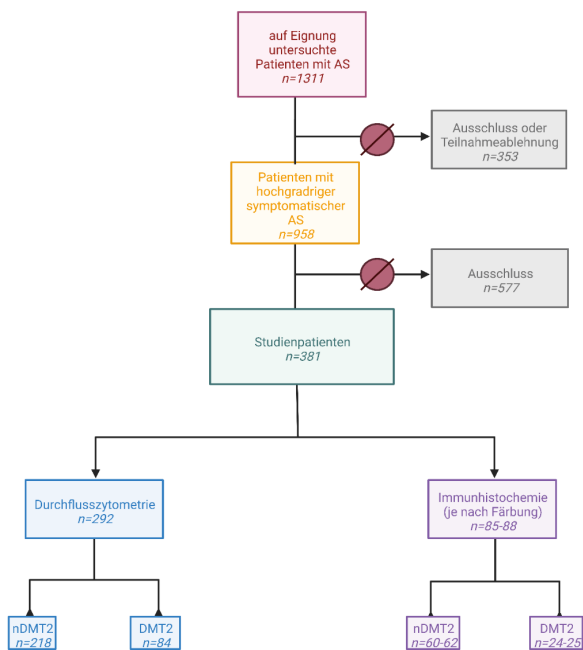


Abbildung 3: Studiendesign

Abkürzungen: AS – Aortenklappenstenose, DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2. Abbildung erstellt mit BioRender.

### 2.2.3. Patientenpopulation

In diese Studie wurden 381 Patienten eingeschlossen, die sich zwischen Dezember 2014 und März 2021 mit einer schweren und symptomatischen Aortenklappenstenose in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie bzw. der Abteilung für Herzchirurgie an dem Universitätsklinikum Tübingen vorgestellt haben. Dabei galten Patienten mit Beschwerden entsprechend NYHA-Klassifikation  $\geq 2$  (von New York Heart Association-Klassifikation) als symptomatisch. Einschlusskriterien waren Volljährigkeit sowie eine leitliniengerecht echokardiografisch gesicherte hochgradige Aortenklappenstenose mit einer sich daraus ergebenden Indikation für einen Herzklappenersatz. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Verdacht auf oder gesicherter systemischer Infektion oder bakterieller Endokarditis innerhalb 180 Tage vor dem Untersuchungszeitpunkt. Des Weiteren wurden Patienten mit einer schweren Leberzirrhose bzw. aktiver Lebererkrankung ausgeschlossen, ebenso Patienten mit einer durch die Ärzte des interdisziplinären Herz-Teams bestimmten voraussichtlichen Lebenserwartung von weniger als einem Jahr. Jeder Patient wurde ausführlich zur persönlichen Krankengeschichte, Komorbiditäten und Risikofaktoren sowie Begleitmedikationen befragt und unterzog sich einer kardiologischen Untersuchung, einschließlich EKG und Echokardiografie. Letztere diente auch der leitliniengerechten Quantifizierung der Aortenklappenstenose in milde, moderate und schwere Form und wurde zur Prüfung auf Eignung für die Studienteilnahme eingesetzt. Peripher-venöse Blutuntersuchungen fanden zur Bestimmung von Blutbild, Elektrolyten, Nieren- und Leberwerten, Entzündungsparametern (CRP, von C-reaktives Protein), herzmuskelspezifischen Parametern (hs-Troponin, von hochsensitives Troponin), NT-pro-BNP, dem Lipidprofil und (Langzeit-) Blutzucker statt (Tabelle 4). Das Klappenersatzverfahren, ob TAVI oder offen-chirurgischer Eingriff, wurde unter Berücksichtigung des STS-Score (von Society of Thoracic Surgery-Score) und EuroSCORE II (von European System for Cardiac Operative Risk Evaluation-Score) gewählt. Beide Risikostratifizierungsskalen dienen unter Einbeziehung patienten- und operationsbezogener Faktoren der Einschätzung

des Mortalitätsrisikos bei kardiochirurgischen Eingriffen. Unabhängig von der Art Intervention (TAVI oder offen-chirurgisch) wurde das entfernte Klappenmaterial zur Darstellung lokaler Gewebsveränderungen histologisch und immunhistochemisch gefärbt. Außerdem wurden zur Charakterisierung systemischer Veränderungen durchflusszytometrische Analysen verschiedener Marker von Monozyten-Subpopulationen und Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie wurden die Ergebnisse beider Methoden hinsichtlich Unterschiede zwischen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) bzw. ohne Diabetes mellitus Typ 2 (nDMT2) verglichen.

#### 2.2.4. Histopathologie

##### 2.2.4.1. Klappenprocurement

Das bei Klappenersatz entfernte Aortenklappengewebe von 88 Patienten wurde im Mittel dreißig Minuten in eiskalter Kochsalzlösung asserviert, bis es zur Fixierung in 4 % Paraformaldehydlösung überführt und darin bis zur Paraffineinbettung bei 4°C gelagert wurde. Das Gewebe eines thrombosierten Aortenaneurysmas eines Studienpatienten diente als Positivkontrolle für die im späteren Verlauf durchgeführte immunhistochemische Färbung (Kindermann *et al.*, 2012; Mueller *et al.*, 2017). Es wurde analog zum Aortenklappengewebe behandelt. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit wird sie in den folgenden Bearbeitungsschritten nicht explizit erwähnt.

##### 2.2.4.2. Paraffineinbettung

Nach der Formalinfixierung des Aortenklappengewebes folgte die Paraffineinbettung. Die Klappentaschen wurde hierfür in mit wasserfestem Bleistift beschriftete Einbettkassetten mit jeweils an Ober- und Unterseite aufgelegten synthetischen Schwämmen platziert. Für mehrere Stunden wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dafür verblieben die Einbettkassetten jeweils eine Stunde in 70 %, 80 %, 95 % Ethanol, für jeweils zwei Stunden in 100 % Ethanol und in Roti-Histol®, als Ethanol verdrängendes

Intermedium. Anschließend wurden die Einbettkassetten für zwei Stunden bei 60°C in geschmolzenes Paraffin gelegt. In metallene Gussformen mit aufgelegten Einbettringen wurde aus einem Paraffinspender eine Schicht Paraffin gegeben, eine Klappentasche mithilfe einer Pinzette hierin fixiert und das Paraffin bis zum Rand des Ringes nachgefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Klappentaschen so positioniert wurden, dass die aortale und ventrikuläre Seite jeweils nach links bzw. rechts orientiert waren, um sicher zu gehen, dass ein histologischer Schnitt alle Schichten der Aortenklappe erfassen konnte. Sofern die Orientierung anhand der gewölbten Form makroskopisch zu differenzieren war, wurde diese neben einem Pseudonym mit Bleistift am Rand des Einbettrings angegeben. Die Gussformen wurden bis Aushärten des Paraffins, mindestens aber 24 Stunden, auf einer Kühlplatte gelagert, anschließend wurden die Paraffinblöcke samt Einbettring aus ihnen gelöst und bis zur weiteren Bearbeitung an einem trockenen und kühlen Ort gelagert.

#### 2.2.4.3. Anfertigen von Schnitten

Zum Anfertigen von histologischen Schnitten wurden die Paraffinblöcke in die Halterung eines Rotationsmikrotoms eingesetzt und parallel zur Klingenhalterung fixiert. Mit dem Grobtrieb wurde zunächst die erste gewebefreie Schicht abgetragen, um anschließend 6 µm dicke Gewebeschnitte anzufertigen. Bei stark verkalkten Klappenpräparaten musste der dabei entstehende Kalkstaub mit einem Pinsel entfernt werden, damit sich dieser möglichst nicht zwischen Schnitt und Objektträger sammeln und so die Adhäsion des Gewebes auf dem Glas behindern konnte. Mit einem Pinsel wurden die Schnitte aufgesammelt und in ein Wasserbad überführt. Dort wurden die Schnitte mit Objektträgern einzeln aufgefangen und in einem heißen Paraffinstreckbad gestreckt. Auf jeden Objektträger wurden jeweils drei Schnitte untereinander platziert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden dabei nacheinander zunächst die obersten, dann die mittleren, und schließlich die untersten Reihen einer Objektträgerserie mit Schnitten belegt, auf die im späteren Verlauf möglichst in einer festen Reihenfolge die Antikörperlösungen und die verschiedenen Kontrolllösungen aufgetragen werden sollten. Nach entsprechender Beschriftung des Mattrandes

wurden die Objektträger horizontal für 36 Stunden bei 37°C in einem Inkubator gelagert.

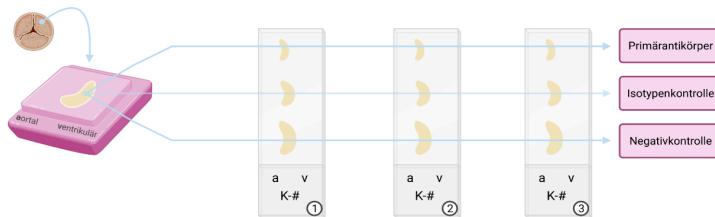


Abbildung 4: Darstellung der Applikation der Paraffin-Schnitte auf die Objektträger  
K-# beschreibt das Patientenpseudonym. Abkürzungen: a – aortal, v – ventrikulär. Eigene Abbildung, erstellt mit BioRender.

#### 2.2.4.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Von allen Klappenpräparaten wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen, kurz HE-Färbungen, angefertigt. Diese Routinefärbung ermöglicht die Differenzierung von mit Hämatoxylin blau gefärbten basophilen und durch Eosin rot anfärbbare azidophile Strukturen. Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger für zwanzig Minuten in Roti-Histol<sup>®</sup> inkubiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus zehn Minuten in 100 % sowie fünf Minuten jeweils in 90 %, 80 % und 70 % Ethanol, in ein wässriges Milieu überführt. Nach fünfminütiger Inkubation in destilliertem Wasser lagen die Schnitte für fünf Minuten in einer Hämlaun-Lösung. Die Schnitte wurden danach für 15 Minuten unter fließendem Wasser gebläut, wobei es durch Erhöhung des pH zum Farbumschlag vom ursprünglich bräunlichen Farbton der Farblösung in das typische Blau kam. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger drei Minuten in einer Eosin-Lösung inkubiert. Anschließend wurden sie für zehn Sekunden in destilliertem Wasser gespült. Um das Eosin nicht vollständig auszuwaschen, wurden die Objektträger bei der nachfolgenden Alkoholreihe zunächst nur für zehn Sekunden in 70 %, 80 % und 90 % Ethanol, dann für jeweils zehn Minuten in 100 % Ethanol und Roti-Histol<sup>®</sup> gelegt. Mit Eindeckmedium wurde das gefärbte



Gewebe mit Deckgläsern bedeckt und für mindestens 24 Stunden trocken gelassen.

#### 2.2.4.5. Immunhistochemische Färbung

Für die Immunhistochemischen Färbung wurden die Aortenklappenschnitte inklusive des als Positivkontrolle dienenden Präparates eines Aortenaneurysmas analog zur HE-Färbung entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Fixierungs- und Paraffinierungsprozesse können zur Quervernetzung und Strukturveränderungen von Antigenen führen, die dadurch von ihren korrespondierenden Antikörpern nicht erkannt werden und so ihre „Antigenität“ in gewissem Maße verlieren. Zur Verbesserung der Immunreaktivität vor der Färbung mit Antikörpern erfolgte daher eine Antigendemaskierung mittels HIER-Verfahren (von engl. Heat Induced Epitope Retrieval), indem die Objektträger für 15 Minuten in vorgewärmten Citratpuffer (pH 6) in einer Mikrowelle erhitzt wurden und anschließend für 15 Minuten abkühlten. Es folgte ein Waschvorgang bestehend aus 15 Minuten in PBS-Lösung. Mit dem Ziel der Hemmung der Aktivität der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 15 Minuten in 3 % Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert, wodurch ein Interferieren mit den im Verlauf eingesetzten Peroxidase-basierenden Detektionssystemen und somit unerwünschte Hintergrundfärbungen vermieden werden sollten. Nach erneutem Waschvorgang wurden die Schnitte mit einem wasserabweisenden Lipidstift umrandet, wodurch das Auslaufen und Vermischen der von nun an aufgetragenen Lösungen verhindert werden sollte. Zur Reduktion unspezifischer Proteinbindungen wurde auf jeden Schnitt jeweils ein bis zwei Tropfen der Proteinblock-Fertiglösung für dreißig Minuten in einer Feuchtekkammer bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach Abkippen der Flüssigkeit wurden jeweils 30 µl des Primärantikörpers, der entsprechenden Isotyp- und der Negativkontrolle mit PBS auf jeweils einen Schnitt appliziert und diese für 24 Stunden bei 4°C in einer Feuchtekkammer inkubiert. Die Verdünnungen können der Tabelle 2 entnommen werden. Eingesetzt wurden anti-CD3- (T-Zellen), anti-CD14- und anti-CD16- (Monozyten), anti-CD68- (Makrophagen) sowie anti-

CD42b- (Thrombozyten) Antikörper (CD, von engl. Cluster of Differentiation). Nach einem Waschschrift, dieses Mal bestehend aus 15 Minuten in PBS mit 0,05 % Tween20, wurden jeweils ein bis zwei Tropfen des biotinylierten Sekundärantikörpers für zehn Minuten aufgetragen. Es folgte ein erneuter Waschvorgang für sechs Minuten in PBS mit 0,05 % Tween20. Anschließend erfolgte die zehnmünütige Inkubation in einem bis zwei Tropfen Streptavidin/Meerrettichperoxidase-Konjugat (HRP, von engl. Horse Raddish Peroxidase). Mehrere Moleküle des Biotin-affinen Streptavidin binden dabei an den biotinmarkierten Sekundärantikörper, der als eine Art Brückenantikörper zwischen Primärantikörper und dem Enzymkonjugat fungiert. Nach einem wie zuletzt beschrieben ablaufenden Waschschrift wurden zügig 30 µl einer DAB/Chromogen-Lösung (DAB von 3,3'-Diaminobenzidine) auf alle Schnitte für drei Minuten aufgetragen. Infolge der enzymatischen Reaktion des chromogenen Substrates DAB mit der Meerrettichperoxidase soll es in dem Schritt der Immunmarkierung zu einem braunen Farbniederschlag kommen, der den Ort des Zielantigens markiert. Gegengefärbt wurden die Präparate durch dreiminütige Inkubation in Hämalaun-Lösung mit anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser. In einer aufsteigenden Alkoholreihe bestehend aus fünf Minuten in 70 %, 80 %, 90 % und zehn Minuten in 100 % Ethanol und schließlich Roti-Histol® wurden die Präparate entwässert und analog zur HE-Färbung eingedeckt. Das Prinzip der Immunmarkierung ist Abbildung 5 zu entnehmen.

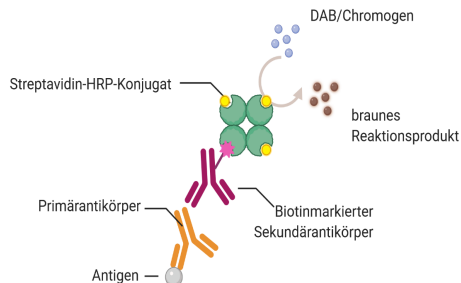


Abbildung 4: Prinzip der Immunmarkierung

Abkürzungen: HRP – Horse Raddish Peroxidase, DAB – 3,3'-Diaminobenzidine. Eigene Abbildung, erstellt mit BioRender.

Tabelle 2: Antikörper- und Isotypverdünnung mit PBS

Antikörper	Verdünnung
anti-CD3	1 : 100
IgG-Kontrolle	1 : 1 500 000
anti-CD14	1 : 20
IgG-Kontrolle	1 : 40
anti-CD16	1 : 20
IgG-Kontrolle	1 : 40
anti-CD42b	1 : 20
IgG-Kontrolle	1 : 40
anti-CD68	1 : 150
IgG-Kontrolle	1 : 300

#### 2.2.4.6. Mikroskopie

Das gefärbte Aortenklappengewebe samt Positivkontrolle wurde mit einem Nikon-Lichtmikroskop begutachtet. In fünffacher Vergrößerung wurden Übersichtsbilder der HE- und immunhistochemisch gefärbten Aortenklappe angefertigt. Für die semi-quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden Bilder in zwanzigfacher Vergrößerung von jeweils drei repräsentativen und sich zur Vergleichbarkeit möglichst deckenden Bereichen von Lamina fibrosa, Lamina spongiosa und Lamina ventricularis erstellt.

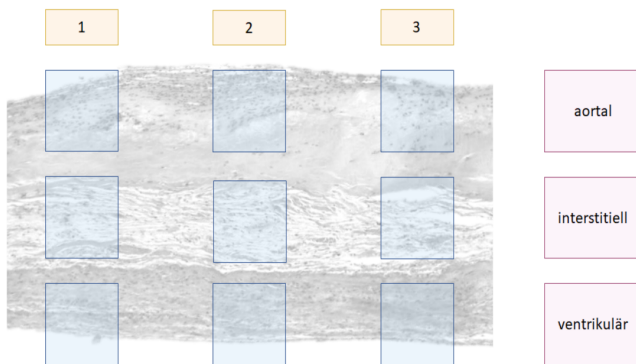


Abbildung 6: Analysierte Abschnitte des Aortenklappengewebes  
Eigene Abbildung, erstellt mit PowerPoint.

#### 2.2.4.7. Analyse der immunhistochemischen Färbungen

Jeder abfotografierte Abschnitt wurde einzeln untersucht. Sich braun darstellende positive Zellen und blau erscheinende negative Zellen wurden nach immunhistochemischer Färbung mit anti-CD3-, anti-CD14-, anti-CD16- und anti-CD68-Antikörpern in der Image J-Software unter Zuhilfenahme eines Rasters manuell ausgezählt. Positive und negative Zellen wurden zur Ermittlung der Gesamtzellzahl addiert. Die ausgezählte Fläche wurde mittels Image J ausgemessen. CD42b-positive Strukturen stellten sich flächig da. Nach Herausarbeiten des zu untersuchenden Areals in der GIMP-Software konnten die Antigen-positiven Bereiche der Klappe berechnet werden. Dafür wurde das Plug-in Colour Deconvolution bei Image J eingesetzt, das einen zuvor definierten Farbwert herausarbeitete. Die analysierte Gesamtfläche wurde von Image J berechnet. Die von Image J in Pixel angegebenen Werte wurden entsprechend der Kalibrationswerte des Mikroskops in  $\text{mm}^2$  umgerechnet. Berechnet wurde die Zellzahl bzw. Fläche pro  $\text{mm}^2$ .

Die weitere Auswertung erfolgte in drei Ebenen des Klappenschnittes, wie schematisch in Abbildung 6 dargestellt. Ausgezählte Zellen und gemessene

Flächen wurden je nach Auswertungsebene (einzelner Abschnitt - Abschnitte einer Klappenschicht - alle Abschnitte) stufenweise addiert. Außerdem wurden positive Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. Analog dazu wurde bei CD42b-gefärbten Schnitten Quotienten aus positiver Fläche und gesamter Fläche gebildet.

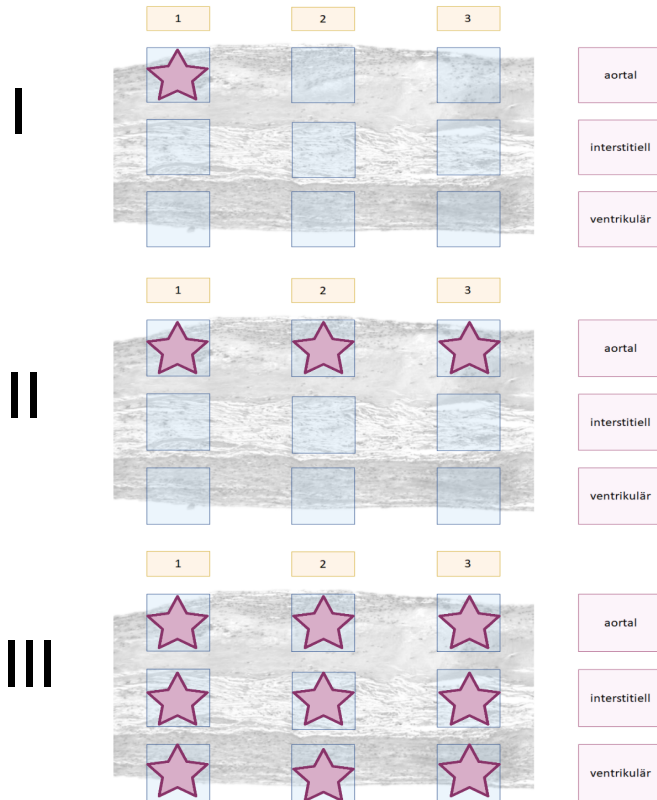


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Systematik der Auswertung

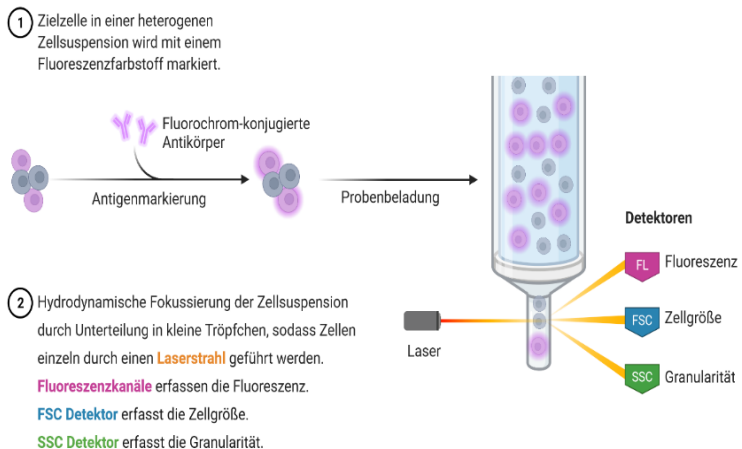
- I Ein Abschnitt einer Klappenschicht
- II Alle drei Abschnitte einer Klappenschicht
- III Alle Abschnitte der drei Klappenschichten

Eigene Abbildung, erstellt mit BioRender und PowerPoint.

## 2.2.5. Durchflusszytometrie

Die im Folgenden beschriebene Methode wurde von Frau Carolin Prang (naturwissenschaftliche Doktorandin) durchgeführt. Weitere Details hierzu sind den Angaben zum Eigenanteil zu entnehmen. Die Durchflusszytometrie, ermöglicht die Detektion und Quantifizierung verschiedener Fluorochrom-markierter Zellen in einer Zellsuspension, indem ihre größen- und strukturabhängige Streuung von Lichtsignalen und ihre Fluoreszenz durch Photosensoren gemessen werden (Adan *et al.*, 2017). Im Rahmen der Studie wurden zirkulierende Monozyten-Subpopulationen und Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate bei Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose untersucht. Eine kurze Darstellung der Methode ist der Abbildung 8 zu entnehmen.

Abbildung 8: Darstellung der Funktionsweise der Durchflusszytometrie



Abkürzungen: FL – Fluoreszenz, FSC – Forward Scatter, SSC – Side Scatter. Eigene Abbildung, erstellt mit BioRender.

### 2.2.5.1. Probenvorbereitung

Peripher venöses Blut von 292 Studienpatienten wurde dafür in mit der Stabilisatorlösung Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) zugesetzten Monovetten gewonnen. Für die Färbung mit den Fluoreszenz-markierten Antikörpern mussten Thrombozyten- und Monozyten-Panels unterschiedlich vorbehandelt werden: Zur Erythrozyten-Lyse in der Monozyten-Probe wurden 5 ml Vollblut mit 45 ml des 10 x Red Blood Cell (RBC) Lysis Puffer gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Die Probe wurde bei 350 x g für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand aspiriert und das Zellsediment in 5 ml PBS resuspendiert. Es wurden 100 µl der Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung entnommen und ein erneuter Waschschritt vorgenommen, dieses Mal wurden die Zellen jedoch in 1 ml PBS resuspendiert. Mithilfe des Hämatologie-Analysators wurden Zellzahlen pro µl bestimmt und die Flüssigkeit so verteilt, dass sich  $3 \times 10^6$  Leukozyten in jedem FACS-Röhrchen für die Monozytenfärbung befanden. Für die Färbung der Thrombozyten wurden jeweils 10 µl Vollblut im Verhältnis von 1 : 10 mit HEPES-Tyrode Puffer (pH 7,4) in einem Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt. Zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindungen durch Blockade der Fc-Rezeptoren von Monozyten und Thrombozyten, wurde jedes FACS-Röhrchen mit 1 ml humanes IgG bei 4°C für zwanzig Minuten inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 4°C, 350 x g und anschließendem Abkippen des Überstands erfolgte die Applikation der Fluoreszenz-markierten Antikörper zur extrazellulären Färbung.

### 2.2.5.2. Extrazelluläre Färbung

Monozyten wurden in zwei Panels gefärbt, einmal zur Detektion von Chemokin-Rezeptoren und einmal zur Detektion von Aktivierungsmarkern. Den FACS-Röhrchen wurden jeweils 100 µl des anti-CCR7- bzw. anti-CCR2- (CCR von engl. C-C chemokine Receptor) und anti- CX3CR1- (CX3C1 von engl. CX3C motif chemokine Receptor 1) Antikörpers zugegeben, der Thrombozyten-Probe statt eines Antikörpers 100 µl des FACS-Puffers, alle Proben wurden gevortext und bei 37°C für eine Stunde stehen gelassen. Nach Waschen durch Hinzugabe von

1 ml FACS-Puffer, zehnmütiger Zentrifugation bei 350 x g bei Raumtemperatur und Abkippen des Überstandes wurden die Proben mit extrazellulär färbenden Antikörpern bei 4°C für zwanzig Minuten inkubiert. Monozyten wurden im ersten Panel gefärbt mit CD11b-, CD62L-, CXCR7-, CXCR4- (CXCR von engl. C-X-C motif chemokine Receptor), im zweiten mit CD54-, CD106-, CD49a, CD11a, CD40 und CD80-färbenden Antikörpern. Beide Monozyten-Panels wurden außerdem mit anti-CD14-, anti-CD16- sowie anti-HLA-DR-Antikörpern (HLA-DR, von engl. Human Leukocyte Antigen-DR Isotyp) gefärbt. Dies geschah auch mit anti-CD3-, anti-CD20-, anti-CD15- und anti-CD56-Antikörpern zur späteren Diskriminierung von T-Zellen, B-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Granulozyten. Die Thrombozyten-Färbung erfolgte mit anti-CD41-, anti-CD31-, anti-CD61-, anti-CD42b- und anti-CD62P-Antikörpern. Parallel dazu kam die Färbung mit Zombie NIR (™) zum Einsatz, ein Farbstoff, der die spätere Differenzierung lebendiger von toten Zellen durch Bindung intrazellulärer Amine ermöglichen sollte. Dabei wurde dieser Färbe-Multimix, bestehend aus mehreren Antikörpern und des Farbstoffes zur Lebend-/Tod-Diskriminierung gemäß eines auf die Anzahl der Proben anpassbaren Pipettierschemas mit dem FACS-Puffer auf ein Volumen von 100 µl pro FACS-Röhrchen pro Panel eingestellt. Das Beispiel eines Pipettierschemas ist Tabelle 3 zu entnehmen.

### 2.2.5.3. Intrazelluläre Färbung

Zur Vorbereitung der intrazellulären Färbung wurden die Zellen beider Proben nach erneutem Waschen mit 200 µl pro FACS-Röhrchen eines Formaldehyd-enthaltenden Fixierungspuffers entsprechend der Herstellerangaben behandelt. Dem Fixierungsprozess bei 4°C über Nacht nachfolgend wurden allen Panels 0,5 ml eines im Verhältnis von 1 : 10 verdünnten Permeabilisierungspuffers zugegeben, der die Zellmembran für die intrazelluläre Färbung durchlässig machen sollte. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 350 x g und 4°C, und Abkippen des Überstandes wurden die Zellen mit 100 µl der intrazellulären Antikörperlösungen pro FACS-Röhrchen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. CXCL12-, CXCL14- (CXCL, von C-X-C motif chemokine Ligand) und MIF- (MIF, von engl. Macrophage migration Inhibitory Factor) färbende



Antikörper wurden für die Monozyten-Probe des Chemokin-Rezeptoren-Panels und für Thrombozyten-Proben eingesetzt. Wie zuvor wurde die Antikörpermischung entsprechend eines Pipettierschemas mit dem Permeabilisierungspuffer auf ein Volumen von 100 µl pro FACS-Röhrchen gebracht. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer, die Proben wurden bei 4°C für zehn Minuten bei 350 x g zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Während der anschließenden durchflusszytometrischen Messungen wurden die Proben auf Eis gelagert.

Tabelle 3: Beispiel eines Pipettierschemas für die Durchflusszytometrie

<b>Antikörper</b>	<b>Volumen/test [µl]</b>
<b>Monozyten Panel 1 - CCR7</b>	
CCR7 / CD197 BV786	2
FACS Puffer [µl]	98
<b>Monozyten Panel 1 - Extrazelluläre Färbung</b>	
CD19 BV510 (1:5 VV)	5
CD20 BV510 (1:5 VV)	5
CD3 BV510 (1:5 VV)	5
CD56 BV510 (1:4 VV)	5
CD15 BV510 (1:5 VV)	5
CD16 BV711 (1:10 VV)	3.125
CD14 FITC (1:8 VV)	10
CD11b BV605 (1:12 VV)	10
CD62L PE/Cy7 (1:16 VV)	10
CXCR7 BV421 (1:8 VV)	10
CXCR4 BV650	2
HLA-DR PerCP-Vio770 (1:10 VV)	10
Zombie NIR	0.2
FACS Buffer [µl]	19.675
<b>Monozyten-Panel 1 - Intrazelluläre Färbung</b>	
MIF AF594	5

CXCL14 AF647	1
CXCL12 PE	2
Perm Buffer [ $\mu$ l]	92
<b>Monozyten Panel 2 - CCR2 &amp; CX3CR1</b>	
CD192/CCR2 BV605 (1:10 VV)	10
CX3CR1 PE/Dazzle	2
FACS Buffer [ $\mu$ l]	88
<b>Monozyten Panel 2 - Extrazelluläre Färbung</b>	
CD19 BV510 (1:5 VV)	5
CD20 BV510 (1:5 VV)	5
CD3 BV510 (1:5 VV)	5
CD56 BV510 (1:4 VV)	5
CD15 BV510 (1:5 VV)	5
CD16 BV711 (1:10 VV)	3.125
CD14 FITC (1:8 VV)	10
CD54 PE (1:10 VV)	10
CD106 APC	5
CD49a PE-Cy7 (1:16 VV)	10
CD11a BV650 (1:10 VV)	10
CD40 BV421 (1:10 VV)	10
CD80 BV785	5
HLA-DR PerCP-Vio770 (1:10 VV)	10
Zombie NIR	0.2
FACS Buffer [ $\mu$ l]	1.675
<b>Thrombozyten - Extrazelluläre Färbung</b>	
CD41 BV421	2
CD31 BV711 (1:8 VV)	10
CD61 FITC	2
CD42b PerCP-Cy5.5	5
CD62P PE-Cy7	1
Zombie NIR	0.2

FACS Buffer [µl]	79.8
<b>Thrombozyten - Intrazelluläre Färbung</b>	
MIF AF594	5
CXCL14 AF647	1
CXCL12 PE	2
Perm Buffer [µl]	92

Die Summe der Antikörper pro Panel wird mit FACS-Puffer bis 100 µl pro FACS-Röhrchen aufgefüllt.

#### 2.2.5.4. Durchflusszytometrische Messungen und -Analysen

Mit dem LSR Fortessa Durchflusszytometer und der DIVA-Software erfolgte die Erfassung des Streulichts mit Vorwärtsstreuung (FSC, von engl. Forward Scatter) zur Größendefinierung und Seitwärtsstreuung (SSC, von engl. Side Scatter) als Maß für Granularität sowie Messung von Fluoreszenzintensitäten (MFI, von engl. Mean Fluorescent Intensity). Mit dem manuellen Gating wurden in mehreren Stufen Zellpopulationen nach bestimmten Parametern eingegrenzt und selektiert, wodurch die Expression von verschiedenen Markern gezielt gemessen werden konnte. Damit dies korrekt ablaufen konnte, wurden Fluorescence-Minus-One-Kontrollen (FMO-Kontrollen) durchgeführt. Diese Proben, die mit allen Farbstoffen abzüglich des zu testenden Antikörpers gefärbt wurden, dienten der Messung des Beitrags der Fluorochrom-Konjugate zum Signal im Kanal des unmarkierten Antikörpers. Durch die DIVA-Software erfolgte die Kompensation, also die Korrektur des Signals, das ein Fluoreszenzfarbstoff durch spektrale Überlappung in einem nicht für ihn vorgesehenen Kanal verursachen kann. Monozyten wurden in zwei Panels untersucht. Charakterisiert wurden sie dabei entsprechend ihrer Oberflächenexpression von CD14 und CD16 in klassische Monozyten (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediäre Monozyten (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) und nicht-klassische Monozyten (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>). Thrombozyten wurden anhand ihrer Größe und Granularität eingeteilt, wobei einzelne Thrombozyten unter FSC-low/CD42bCD41<sup>+</sup> und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate unter FSC-high/CD42bCD61<sup>+</sup> erfasst wurden. Mit FlowJo erfolgte das manuelle Gating. Zunächst wurden dafür im manuellen „Clean-up-Gating“ tote Zellen und

Zelldebris entfernt. Anschließend wurde der Datensatz einer Art Qualitätscheck mit Beseitigung von Ausreißern durch die Flow-AI-Software unterzogen. Es wurden zudem unüberwachte Datenanalysen mittels der OMIQ-Software durchgeführt. Die Dimensionsreduktion erfolgte mit UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) zur Gruppierung phänotypisch ähnlicher Daten (McInnes and Healy, 2018). Für eine unüberwachte Clusteranalyse wurde PhenoGraph angewandt (Levine *et al.*, 2015).

#### 2.2.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit der SPSS-Software durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde hierbei auf  $p \leq 0,05$  bei 95 % Konfidenzintervall festgelegt. Als hoch-signifikant galten Werte von  $p \leq 0,01$ . Mediane und Interquartilbereiche kontinuierlicher Variablen wurden ermittelt und der t-Test kam zur Signifikanzprüfung zum Einsatz. Kategoriale Variablen wurden in absoluten (n) und relativen (%) Anteilen angegeben, der Chi-Quadrat-Test nach Pearson (zweiseitig) wurde zur Testung auf Signifikanz angewandt. Bei fehlender Normalverteilung der bei der Durchflusszytometrie und immunhistochemischen Färbung erhobenen Daten erfolgte die Prüfung auf signifikante Unterschiede mittels des Kruskal-Wallis-Test.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patientencharakteristika

Die wesentlichen Patientencharakteristika sind Tabelle 4 zu entnehmen. Je nach Vorliegen bzw. Nichtvorliegen von Diabetes mellitus Typ 2 wurden die 381 eingeschlossenen Patienten in zwei Subkohorten eingeteilt. Davon waren 282 (74 %) Patienten ohne Diabetes mellitus Typ 2 (nDMT2) und 99 (26 %) Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2). Beide Subgruppen waren größtenteils vergleichbar. Patienten mit DMT2 waren signifikant häufiger bzw. stärker von typischen Komorbiditäten betroffen (Übergewicht, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie bzw. metabolisches Syndrom), was sich auch in den verschiedenen Risikoskalen (CHA2DS2-Vasc-Score, STS-Score, Euro-SCORE II) und in der Dauermedikation (Einnahme von Statinen, Antihypertonika) niederschlug.

Tabelle 4: Patientencharakteristika

Parameter	Alle Patienten n= 381	nDMT2 n=282	DMT2 n=99	p-Wert
<b>Klinische Charakteristika</b>				
Alter (y)	76 (67 - 81)	76 (65 - 81)	76 (71 - 80)	0.701
Geschlecht				
- Männlich	247 (64.8 %)	182 (64.5 %)	65 (65.7 %)	0.748
Gewicht (kg)	78 (67 - 89)	77 (65 - 87)	84 (71.8 - 95)	<b>0.01</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.5 (24.1 - 30)	26.1 (23.9 - )	27.6 (24.9 - )	<b>&lt;0.001</b>
Systolischer Blutdruck (mmHg)	133 (120 - 150)	130 (120 -150)	132.5 (120 - 150)	0.581
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	75 (70 - 80)	78.5 (70 - 80)	75 (70 - 80)	0.733
Herzfrequenz (bpm)	73 (64 - 84)	73 (64 - 84)	74 (65 - 84)	0.392
NYHA Klassifikation > 2	178 (46.7 %)	130 (46.1 %)	49 (49.5 %)	0.895
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Ko-Morbiditäten</b>				
Koronare Herzerkrankung				
- 1-Gefäß	49 (12.9 %)	33 (11.7 %)	16 (16.2 %)	0.16
- 2-Gefäß	72 (18.9 %)	56 (19.9 %)	16 (16.2 %)	

- 3-Gefäß	81 (21.3 %)	48 (17 %)	33 (33.3 %)	
- CABG	7 (1.8 %)	4 (1.4 %)	3 (3.0 %)	
Myokardinfarkt	32 (8.4 %)	20 (7.1 %)	12 (12.1 %)	0.627
Herzinsuffizienz	325 (85.3 %)	236 (84.0 %)	89 (89.9 %)	0.793
Schlaganfall	30 (7.9 %)	20 (7.1 %)	10 (10.1 %)	0.606
TIA	8 (2.1 %)	6 (2.1 %)	2 (2.0 %)	0.976
Rauchen	70 (18.4 %)	53 (18.8 %)	17 (17.2 %)	0.969
Dyslipidämie	174 (45.7 %)	116 (41.1 %)	58 (58.6 %)	<b>&lt;0.001</b>
Arterielle Hypertonie	305 (80.1 %)	210 (74.5 %)	95 (96.0 %)	<b>&lt;0.001</b>
Vorhofflimmern	120 (31.5 %)	82 (29.1 %)	38 (38.4 %)	0.408
Pulmonale Hypertonie	134 (35.2 %)	90 (31.9 %)	44 (44.4 %)	0.1
Bikuspide Aortenklappe	39 (10.2 %)	31 (11.0 %)	8 (8.1 %)	<b>0.048</b>
Metabolisches Syndrom	125 (32.8 %)	53 (18.8 %)	72 (72.7 %)	<b>&lt;0.001</b>
Positive Familiengeschichte	40 (10.5 %)	29 (10.3 %)	11 (11.1 %)	0.933
CHA2DS2-Vasc Score >1	284 (74.5 %)	198 (70.2 %)	86 (86.9 %)	<b>&lt;0.001</b>
STS-Score	2 (1.3 - 3.25)	1.9 (1.1 - 3.3)	2.3 (1.7 - 3.2)	<b>0.005</b>
EuroSCORE II	2.1 (1.3 - 3.4)	2 (1.2 - 3.3)	2.4 (1.8 - 3.8)	<b>0.003</b>
<b>Echokardiographische Parameter</b>				
Mittlerer Druckgradient (mmHg) AV	42 (33 - 49)	42 (31 - 49)	41 (34.5 - 49)	0.912
Maximaler Druckgradient (mmHg)	68 (55.3 - 83)	70 (57 - 83)	66 (55 - 82)	0.343
KÖF (cm <sup>2</sup> )	0.80 (0.6 - 0.9)	0.76 (0.6 - 0.9)	0.8 (0.6 - 0.9)	0.374
<b>Dauermedikation zu Studienbeginn</b>				
Thrombozytenaggregationshemmer	160 (42.0 %)	116 (41.1 %)	44 (44.4 %)	0.314
Orale Antikoagulation	80 (21.0 %)	57 (20.2 %)	23 (23.2 %)	0.387
Antihypertensiva	302 (79.3 %)	212 (75.2 %)	90 (90.9 %)	<b>0.05</b>
Aldosteron-Inhibitoren	61 (16.0 %)	38 (13.5 %)	23 (23.2 %)	0.117
Diuretika	160 (42.0 %)	105 (37.2 %)	55 (55.6 %)	<b>0.013</b>
Beta-Blocker	169 (44.4 %)	117 (41.5 %)	52 (52.5 %)	0.204
Statine	220 (57.7 %)	148 (52.5 %)	72 (72.7 %)	<b>0.01</b>
<b>Laborparameter und Biomarker</b>				
Leukozyten (1/ $\mu$ L)	7100 (6005 – 8530)	7000 (6005 - 8325)	7540 (6030 - 9060)	0.146
Hb (g/dL)	13.1 (11.9 - 14.1)	13.2 (11.9 - 14.3)	12.8 (11.9 - 13.8)	0.137
Thrombozyten (1000/ $\mu$ L)	211 (179 - 245.5)	208 (176 - 240)	224 (192 - 261)	<b>0.035</b>
CRP (mg/dL)	0.2 (0.1 - 0.6)	0.2 (0.1 - 0.6)	0.2 (0.1 - 0.6)	0.242
hs-TNI	12.5 (5 - 24.3)	12 (5 - 25)	19 (7.5 - 27.5)	0.670
NT-pro-BNP (ng/L)	658 (251 - 720.5)	520 (251 - 2039)	705 (153.3 - 1201.3)	0.951

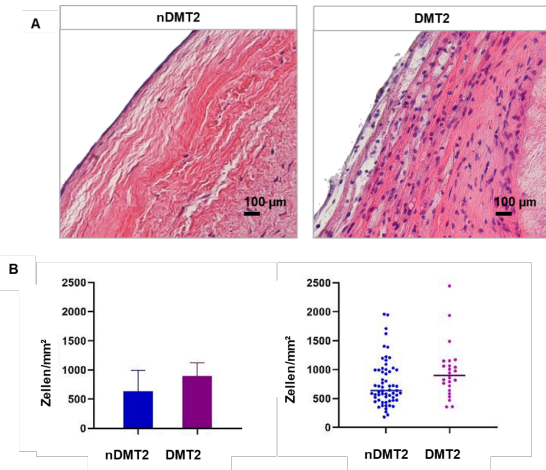
CK(U/l)	79 (56 - 124)	80 (57 - 124)	73.5 (53.8 - 126.3)	0.767
Serumkreatinin (mg/dL)	0.9 (0.8 - 1.2)	0.9 (0.8 - 1.1)	1 (0.8 - 1.3)	0.208
GFR-MDRD (ml/m <sup>2</sup> )	71.5 (56.4 - 88)	72.7 (58.9 - 88)	69.4 (52.6 - 89.5)	0.334
Gesamtcholesterol (mg/dL)	168 (142 - 207)	173 (147 - 212.8)	156 (144 - 185)	<b>0.003</b>
LDL (mg/dL)	101.5 (73.3 - 132.5)	110 (75 - 140)	89 (71 - 116)	<b>0.006</b>
Spontan-Blutzucker (mg/dL)	101 (91 - 129)	97 (90 - 107.3)	136 (105 - 192)	<b>&lt;0.001</b>
HbA1c	6 (5.5 - 7)	5.7 (5.4 - 6)	7.1 (6.4 - 7.6)	<b>0.000</b>

Die Werte sind als absolute Anzahl (n) und Prozent (%) oder Median und Interquartilbereich (IQR) angegeben. Abkürzungen: AV – Aortenklappe, BMI – Body Mass Index, bpm – Herzschlag pro Minute, CABG – Koronararterien-Bypass, CK – Creatinin-Kinase, CRP – C-reaktives Protein, DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, EuroSCORE – European System for Cardiac Operative Risk Evaluation, GFR-MDRD – Glomerular Filtration Rate, Hb – Hämoglobin, HbA1c – Hämoglobin A 1c, HDL – High Density Lipoprotein, hs-TNI – hochsensitives Troponin I, KHK – Koronare Herzkrankheit, KÖF – Klappenöffnungsfläche, LDL – Low Density Lipoprotein, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2, NT-pro-BNP – N-terminal pro-B-type Natriuretic Peptide, STS - Society of Thoracic Surgeons, TIA – Transient Ischemic Attack.

## 3.2. Ergebnisse der Histopathologie

### 3.2.1. Höhere Zellzahl im Klappengewebe bei DMT2

Es wurden 88 Klappen ausgewertet, davon waren je nach Immunfärbung 24 bis 26 Patienten mit DMT2 und 60 bis 62 Schnitte Patienten ohne DMT2 zuzuordnen. Es zeigte sich, dass das Klappengewebe von Patienten mit DMT2 und CAVD eine höhere Zellzahl im Vergleich zu Klappengewebe von Patienten ohne DMT2 aufwies (nDMT2 versus DMT2; Zellen/mm<sup>2</sup>; Median (IQR); 639 (471,9 – 995,8) versus 901,3 (659,7 – 1128,3); p = 0,043) (siehe Abbildung 9). Dabei war die topologische Verteilung der Zellen innerhalb des Klappenschnitts bei beiden Subkohorten vergleichbar: Zellreichste Schicht stellte bei DMT2 und nDMT2 die Lamina ventricularis dar, zellärmste die aortal gelegene Lamina fibrosa. Eine tabellarische Aufführung der Auswertung der Immunfärbung ist dem Anhang zu entnehmen.



**Abbildung 9: Höhere Zellzahl im Klappengewebe bei DMT2**

**(A)** HE-Färbung von Aortenklappengewebe. Abgebildet sind Ausschnitte der Lamina ventricularis in 20-facher Vergrößerung. Links: nDMT2, rechts: DMT2. **(B)** Balkendiagramm der Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup>. Dargestellt sind: Median + Interquartilbereich (IQR); Median + Gesamtverteilung. Die Diagramme wurden mit GraphPad und BioRender erstellt. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – Diabetes mellitus Typ 2.

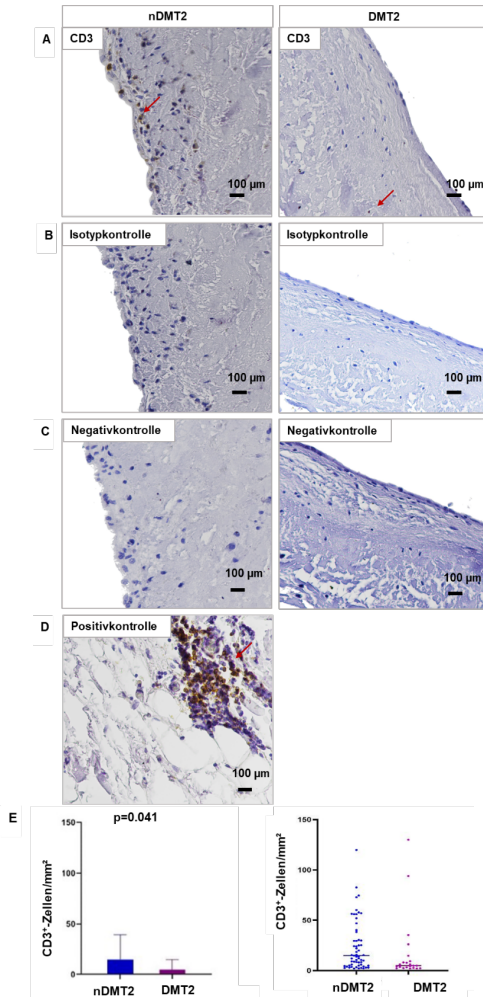
Zur weiteren Differenzierung der Zellen im Klappengewebe erfolgten immunhistochemische Färbungen. Zielzellen der immunhistochemischen Färbung waren T-Zellen (CD3-Immunfärbung), Monozyten (CD14- und CD16-Immunfärbung) und Makrophagen (CD68-Immunfärbung), die als inflammatorische Mediatoren der CAVD-Entwicklung gelten. Auch eine Immunfärbung von Thrombozyten (CD42b-Immunfärbung) wurde zur Darstellung der Thrombozyten-Akkumulation im Klappengewebe im Rahmen der Interaktion von Thrombozyten und Immunzellen bei kardiovaskulärer Inflammation durchgeführt.



### 3.2.2. Geringere Anzahl von CD3-Zellen im Klappengewebe bei DMT2

Signifikant niedriger war dabei der Anteil von T-Zellen an der Gesamtzellzahl in der gesamten Klappe (nDMT2 versus DMT2; CD3-positive Zellen/Gesamtzellzahl; Median (IQR); 3,5 (0,7 – 7,7) versus 1,3 (0,2 – 4,2);  $p = 0,038$ ). Bei weiterer topographischer Differenzierung zeigten sich signifikante Unterschiede insbesondere in der aortal gelegenen Klappenschicht: sowohl die absolute Anzahl CD3-positiver Zellen war aortal signifikant niedriger bei DMT2 als bei nDMT2 (nDMT2 versus DMT2; CD3-positive Zellen/mm<sup>2</sup>; Median (IQR); 14,5 (5 – 36,4) versus 4,9 (2,7 – 14,7);  $p = 0,041$ ), als auch das Verhältnis der T-Zellen zur Gesamtzellzahl (nDMT2 versus DMT2; CD3-positive Zellen/Gesamtzellzahl; Median (IQR); 3 (0,9 – 7) versus 1 (0,4 – 3,3);  $p = 0,031$ ). Sowohl im mittleren Klappenbereich als auch in der ventrikulären Schicht war der Anteil von CD3-positiven T-Zellen an der Gesamtzellzahl bei DMT2 im Vergleich zu nDMT2 reduziert, dies jedoch nur knapp über dem Signifikanzniveau (mittig: nDMT2 versus DMT2; CD3-positive Zellen/Gesamtzellzahl; Median (IQR); 3 (0,6 – 9,8) versus 1 (0,4 – 4,1);  $p = 0,074$ ), (ventrikulär: (nDMT2 versus DMT2; CD3-positive Zellen/Gesamtzellzahl; Median (IQR); 2,4 (0,6 – 7) versus 1 (0,2 – 3,3);  $p = 0,055$ ).

Zusammenfassend waren insbesondere im aortalen Bereich signifikant weniger T-Zellen im Klappengewebe von DMT2 nachzuweisen als im Klappengewebe von nDMT2 (Abbildung 10). Der Beitrag von CD3-positiven Zellen an der Gesamtzahl der im Klappengewebe vertretenen Zellen war bei DMT2 geringer als bei nDMT2.



**Abbildung 10: Geringere Anzahl von CD3-Zellen im Klappengewebe bei DMT2**  
**(A-C)** Aortenklappengewebe von Patienten mit DMT2 und ohne DMT2. Dargestellt sind Ausschnitte der Lamina fibrosa in 20-facher Vergrößerung. **(A)** Anti-CD3-Immunfärbung von Aortenklappengewebe, **(B)** Isotypkontrollen, **(C)** Negativkontrollen, **(D)** Positivkontrolle.  
**(E)** Balkendiagramm der CD3-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> aortal. Dargestellt: Median + Interquartilbereich (IQR), Median + Gesamtverteilung. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – Diabetes mellitus Typ 2. Die Diagramme wurden mit GraphPad und BioRender erstellt.

### 3.2.3. Geringere Anzahl von CD16-Zellen im Klappengewebe bei DMT2

Des Weiteren wurde die valvuläre Expression von Monozyten, die in CD14-positive und CD16-positive Monozyten differenziert wurden, untersucht.

Insgesamt wies das Klappengewebe beider Subkohorten, Patienten mit DMT2 und Patienten ohne DMT2, eine signifikant höhere Anzahl CD16-positiver Monozyten als CD14-positiver Monozyten auf (CD14-positive Zellen versus CD16-positive Zellen; Zellen/mm<sup>2</sup>; Median (IQR); 5,8 (2,4 – 16,8) versus 39,7 (10,3 – 100,8);  $p < 0,001$ ).

CD14-positive Zellen waren bei beiden Gruppen gleichmäßig im Klappengewebe verteilt. Hinsichtlich der lokalen Expression von CD14-positiven Monozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen DMT2 und nDMT2 (Abbildung 11). Die absolute Anzahl CD14-positiver Zellen (nDMT2 versus DMT2; CD14-positive Zellen/mm<sup>2</sup>; Median (IQR); 5,8 (2,5 – 18,5) versus 6,6 (1,8 – 15,9);  $p = 0,89$ ) sowie das Verhältnis CD14-positiver Zellen zur gesamten Zellzahl (nDMT2 versus DMT2; CD14-positive Zellen/Gesamtzellzahl; Median (IQR); 1,1 (0,3 – 2) versus 0,9 (0,4 – 2,2);  $p = 0,88$ ) waren in beiden Subkohorten vergleichbar. Regionale Unterschiede waren ebenfalls nicht nachzuweisen.

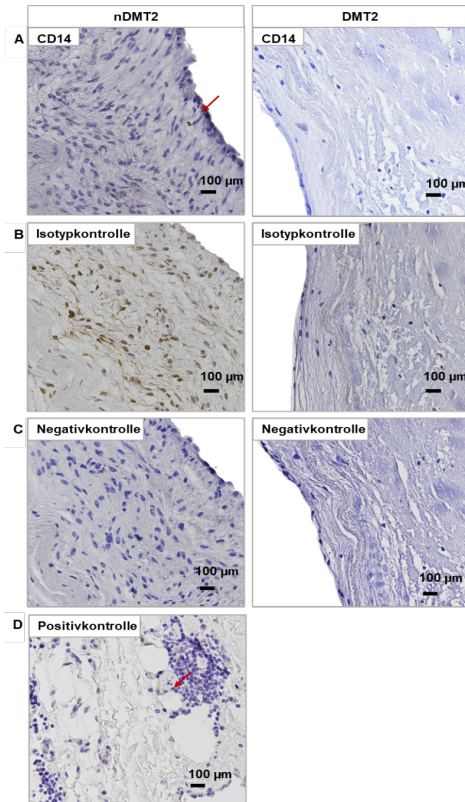


Abbildung 11: CD14-Immunfärbung von Aortenklappengewebe

(A-C) Aortenklappengewebe von Patienten mit und ohne DMT2. Dargestellt sind Ausschnitt der Lamina fibrosa in 20-facher Vergrößerung. (A) Anti-CD14-Immunfärbung von Aortenklappengewebe, (B) Isotypkontrollen, (C) Negativkontrollen, (D) Positivkontrolle. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – Diabetes mellitus Typ 2.

Bezüglich der topographischen Verteilung von CD16-positiven Monozyten fand sich bei beiden Gruppen die größte Anzahl der Zellen in der Lamina ventricularis. In der Lamina ventricularis zeigten sich auch zwischen den Subgruppen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Expression von CD16-Monozyten: Hier war der Anteil CD16-positiver Monozyten an der gesamten Zellzahl bei DMT2 im Vergleich zu nDMT2 signifikant niedriger (nDMT2 versus DMT2; CD16-positiv Zellen/Gesamtzellzahl; Median (IQR); 5,3 (1,1 – 10,1) versus 1 (0,7 – 8,2);  $p = 0,035$ ). Ebenfalls ventrikulär war der Trend einer niedrigeren absoluten Anzahl von CD16-positiven Zellen (nDMT2 versus DMT2; CD16-positiv Zellen/mm<sup>2</sup>; Median (IQR); 48,6 (9,5 – 133,1) versus 8 (55 – 56,8);  $p = 0,064$ ) nachzuweisen. Der Trend eines reduzierten Verhältnisses CD16-positiver Zellen zur Gesamtzellzahl (nDMT2 versus DMT2; CD16-positiv Zellen/Gesamtzellzahl; Median (IQR); 5,4 (1,7 – 12,1) versus 2,2 (1,2 – 6,9);  $p = 0,067$ ) zeigte sich auch aortal (Abbildung 12).

Während sich die Expression von CD14-Monozyten zwischen den Gruppen nicht unterschied, war der Anteil der CD16-Monozyten an der gesamten Zellzahl niedriger bei DMT2, wie auch bereits bei den CD3-T-Zellen zu beobachten war. Die Unterschiede hinsichtlich der Expression von CD16-positiven Zellen waren vor allem ventrikulär signifikant - anders als bei T-Zellen, bei denen Unterschiede in der gesamten Klappe bzw. bei genauerer topologischer Differenzierung insbesondere aortal darzustellen waren.

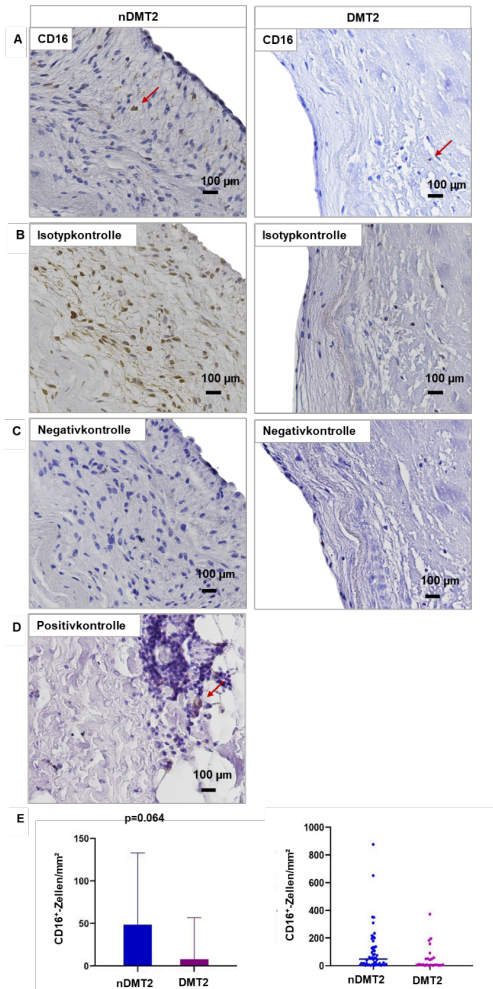


Abbildung 12: Geringere Anzahl CD16-Monozyten im Klappengewebe bei DMT2  
**(A-C)** Aortenklappengewebe von Patienten mit und ohne DMT2. Dargestellt sind Ausschnitte der Lamina fibrosa in 20-facher Vergrößerung. **(A)** Anti-CD16-Immunfärbung von Aortenklappengewebe, **(B)** Isotypkontrollen, **(C)** Negativkontrollen, **(D)** Positivkontrolle.  
**(E)** Balkendiagramm der CD16<sup>+</sup>-Zellen pro mm<sup>2</sup> aortal. Dargestellt: Median + Interquartilbereich (IQR), Median + Gesamtverteilung. Darstellung mittels GraphPad und Biorender. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – Diabetes mellitus Typ 2.

#### 3.2.4. Vergleichbare Anzahl von CD68-Makrophagen im Klappengewebe

Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten und sind ebenfalls an der CAVD-Entwicklung beteiligt. Die Expression von Makrophagen im Klappengewebe wurden mittels CD68-Immunfärbung untersucht (Abbildung 13). Dabei entsprachen Makrophagen bei beiden Subkohorten dem insgesamt am häufigsten vertretenen Immunzelltyp. Unterschiede zwischen den Subgruppen hinsichtlich der regionalen Verteilung der Makrophagen fanden sich nicht. Auch die absolute Anzahl CD68-positiver Zellen (nDMT2 versus DMT2; CD68-positiv Zellen/mm<sup>2</sup>; Median (IQR); 114,9 (50,9 – 189) versus 110 (46,9 – 202,3);  $p = 0,92$ ) sowie das Verhältnis von CD68-positiven Zellen zur gesamten Zellzahl (nDMT2 versus DMT2; CD68-positiv Zellen/Gesamtzellzahl; Median (IQR) 16,2 (9,1 – 22,7) versus 12,9 (6,5 – 21);  $p = 0,44$ ) waren in beiden Subkohorten vergleichbar.

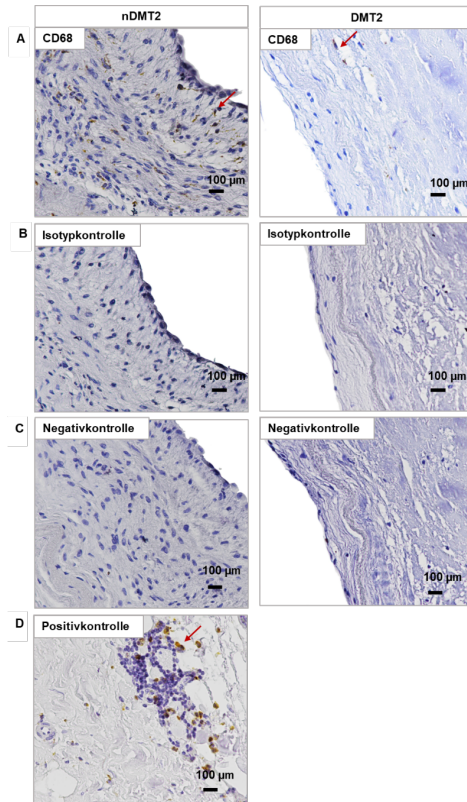


Abbildung 13: CD68-Immunfärbung von Aortenklappengewebe bei CAVD  
**(A-C)** Aortenklappengewebe von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2. Dargestellt sind Ausschnitte der Lamina fibrosa in 20-facher Vergrößerung. **(A)** Anti-CD68-Immunfärbung von Aortenklappengewebe, **(B)** Isotypkontrollen, **(C)** Negativkontrollen, **(D)** Positivkontrolle. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.



### 3.2.5. Vergleichbare Thrombozyten-Expression im Klappengewebe

Zur Darstellung der Expression von Thrombozyten im CAVD-Klappengewebe im Rahmen einer etwaigen lokalen Thrombo-Inflammation bei Patienten mit bzw. ohne DMT2 erfolgte die CD42b-Immunfärbung (Abbildung 14). Die Akkumulation von Thrombozyten im Klappengewebe wurde hier als positiv gefärbte Fläche dargestellt. Dabei war der Anteil des CD42b-positiven Areal an der gesamten untersuchten Fläche bei DMT2 und nDMT2 miteinander vergleichbar (nDMT2 versus DMT2; CD42b-positive Fläche/Gesamtfläche; %; Median (IQR); 22,6 (9,6 – 36,9) versus 12,2 (4,8 – 28,3);  $p = 0,176$ ).

Unterschiede zwischen den Subgruppen hinsichtlich der regionalen Verteilung von Thrombozyten fanden sich nicht.

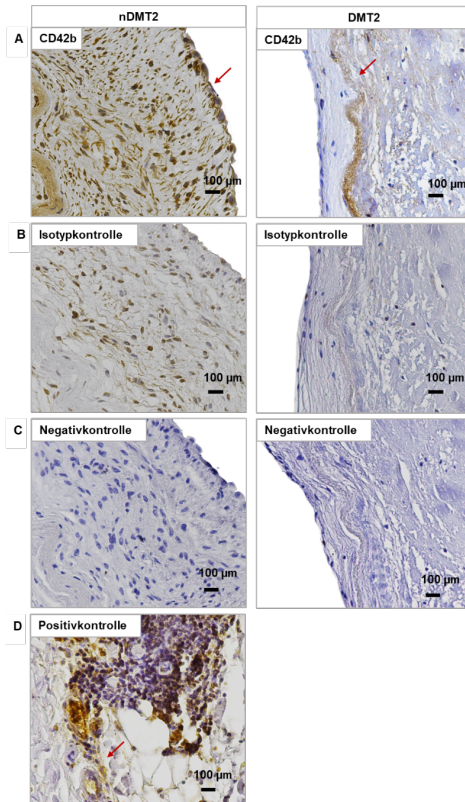


Abbildung 14: CD42b-Immunfärbung von Aortenklappengewebe bei CAVD  
**(A-C)** Aortenklappengewebe von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2. Dargestellt sind Ausschnitte der Lamina fibrosa in 20-facher Vergrößerung. **(A)** Anti-CD42b-Immunfärbung von Aortenklappengewebe, **(B)** Isotypkontrollen, **(C)** Negativkontrollen, **(D)** Positivkontrolle. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.

### 3.3. Ergebnisse der Durchflusszytometrie

#### 3.3.1. Verändertes Monozyten-Expressionsprofil bei DMT2

Neben der immunhistochemischen Darstellung lokaler Klappenveränderung in Form von Immunzell- und Thrombozyten-Expression bei CAVD wurde untersucht, ob systemische Entzündung in einer Subkohorte vermehrt auftrat und ob sich etwaige lokale Veränderungen auf systemischer Ebene widerspiegeln. Unterschiede hinsichtlich etablierter laborchemischer Entzündungsmarker wie der Leukozytenzahl (nDMT2 versus DMT2;  $1/\mu\text{L}$ ; Median (IQR); 7000 (6005 – 8325) versus 7540 (6030 – 9060);  $p = 0,146$ ) oder der Höhe des C-reaktiven Proteins (nDMT2 versus DMT2;  $\text{mg/dl}$ ; Median (IQR); 0,2 (0,1 – 0,6) versus 0,2 (0,1 – 0,6);  $p = 0,242$ ) zeigten sich zwischen DMT2 und nDMT2 nicht. Auch waren in beiden Gruppen die Infektparameter nicht erhöht.

Der Fokus der Durchflusszytometrie lag auf Monozyten und Thrombozyten als an kardiovaskulärer Entzündung beteiligten Zellgruppen. Ziel war es, durch Darstellung der Expression von extra- und intrazellulären Antigenen zirkulierende Monozyten und Thrombozyten weiter immunphänotypisch zu charakterisieren und ggf. Unterschiede zwischen Patienten mit DMT2 und Patienten ohne DMT2 zur Darstellung zu bringen. Dabei wurden Aktivierungsmarker, Marker von Chemokinen bzw. Zytokinen und Chemokin-Rezeptoren untersucht. Von 292 Proben waren 218 nDMT2 und 74 DMT2 zuzuordnen.

Monozyten wurden anhand ihrer Oberflächenmarkern in klassische ( $\text{CD14}^+\text{CD16}^-$ ), intermediäre ( $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ ) und nicht-klassische Monozyten ( $\text{CD14}^{\text{dim}}\text{CD16}^+$ ) unterschieden.

In beiden Subkohorten war eine vergleichbare absolute Anzahl klassischer Monozyten (nDMT2 versus DMT2; Median (IQR);  $32 \times 10^6$  ( $24 \times 10^6 - 41 \times 10^6$ ) versus  $32 \times 10^6$  ( $19 \times 10^6 - 42 \times 10^6$ );  $p = 0,59$ ), intermediärer Monozyten (nDMT2 versus DMT2; Median (IQR);  $5 \times 10^6$  ( $3 \times 10^6 - 7 \times 10^6$ ) versus  $5 \times 10^6$  ( $3 \times 10^6 - 7 \times 10^6$ );  $p = 0,89$ ) und nicht-klassischer Monozyten ( $3 \times 10^6$  ( $1 \times 10^6 - 4 \times 10^6$ ) versus  $3 \times 10^6$  ( $2 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ );  $p = 0,15$ ) gemessen worden. Dabei waren klassische Monozyten am häufigsten repräsentiert, nicht-klassische Monozyten am seltensten.

Der Anteil klassischer Monozyten an weißen Blutkörperchen war bei DMT2 signifikant niedriger als bei nDMT2 (nDMT2 versus DMT2; %, Median (IQR); 6,3 (4,8 – 7,8) versus 5,5 (3,7 – 6,9);  $p = 0,003$ ), während der Anteil von intermediären und nicht-klassischen Monozyten in beiden Subkohorten vergleichbar war (Abbildung 15).

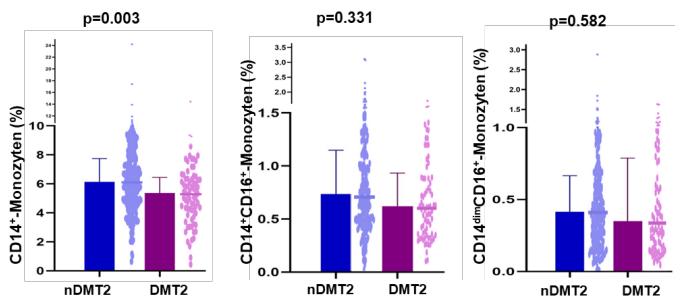
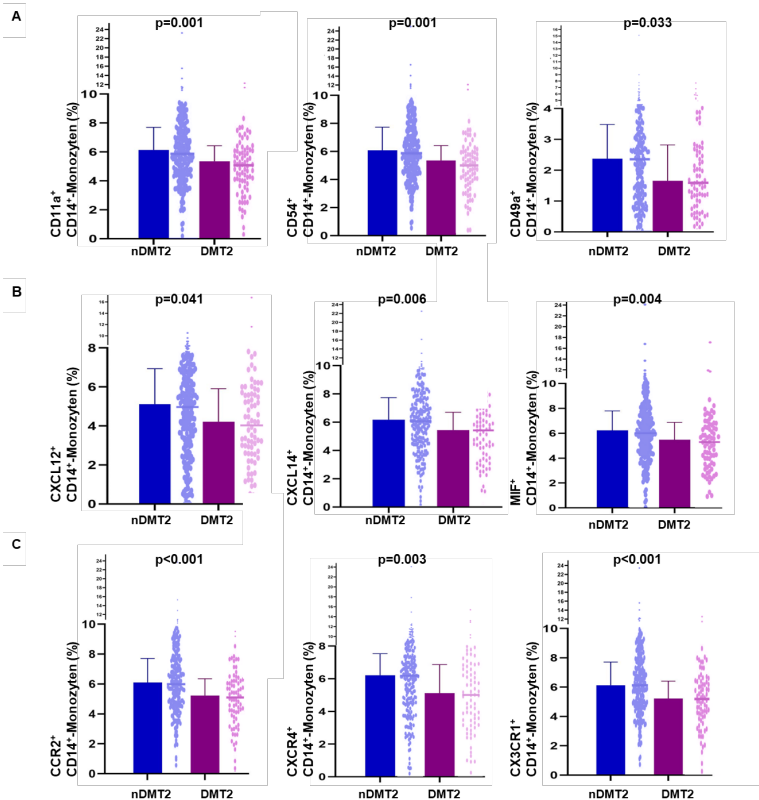


Abbildung 55: Expression von Monozyten-Subklassen nach manuellem Gating  
 Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit (%) von klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten von DMT2 und nDMT2 nach manueller Gating-Strategie. Die Daten der Durchflusszytometrie wurden mit FlowJo analysiert. Darstellung mittels GraphPad und BioRender. Dargestellt: Median + Interquartilbereich (IQR); Median + Gesamtverteilung. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.

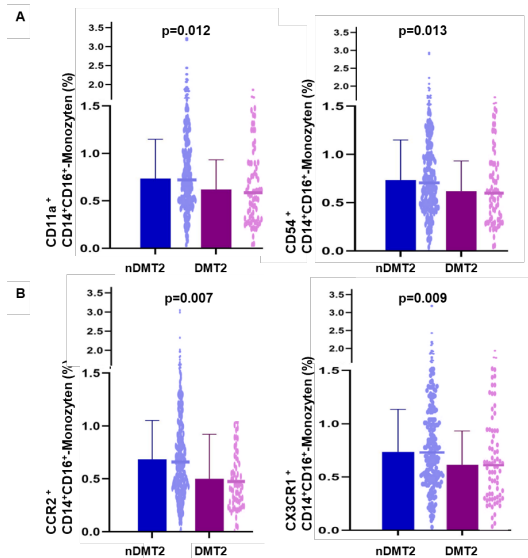
Marker der Monozyten-Aktivierung (HLA-DR, CD80, CD11a, CD11b, CD49a, CD54, CD62L), Chemokine bzw. Zytokine (CXCL14, CXCL12, MIF) und Chemokin-Rezeptoren (CCR2, CXCR4, CXCR7, CX<sub>3</sub>CR1) klassischer Monozyten waren bei DMT2 signifikant geringer exprimiert als bei nDMT2 (nDMT2 versus DMT2; %,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Markerexpression klassischer Monozyten nach manuellem Gating**  
**(A-C)** Markerexpression klassischer Monozyten von DMT2 und nDMT2 nach manuellem Gating. Die prozentuale Häufigkeit (%) folgender Marker von klassischen Monozyten wurden dargestellt: **(A)** Marker der Aktivierung (CD11a, CD54, CD49a), **(B)** Marker von Chemokinen (CXCL12, CXCL14) bzw. Zytokinen (MIF), **(C)** Marker von Chemokin-Rezeptoren (CCR2, CXCR4, CX3CR1). **(A-C)** Die Durchflusszytometrie-Daten wurden mit FlowJo analysiert. Darstellung mittels GraphPad und BioRender. Dargestellt: Median + Interquartilbereich (IQR); Median + Gesamtverteilung. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.

Auch wenn die prozentuale Häufigkeit intermediärer Monozyten in beiden Gruppen vergleichbar war, die geringer ausgeprägte Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern (HLA-DR, CD40, CD11a, CD49a, CD54, CD106) und Chemokinrezeptoren (CCR2, CX<sub>3</sub>CR1) demonstrierte auch hier einen Zustand

geringerer Aktivität bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (nDMT2 versus DMT2; %,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 17).

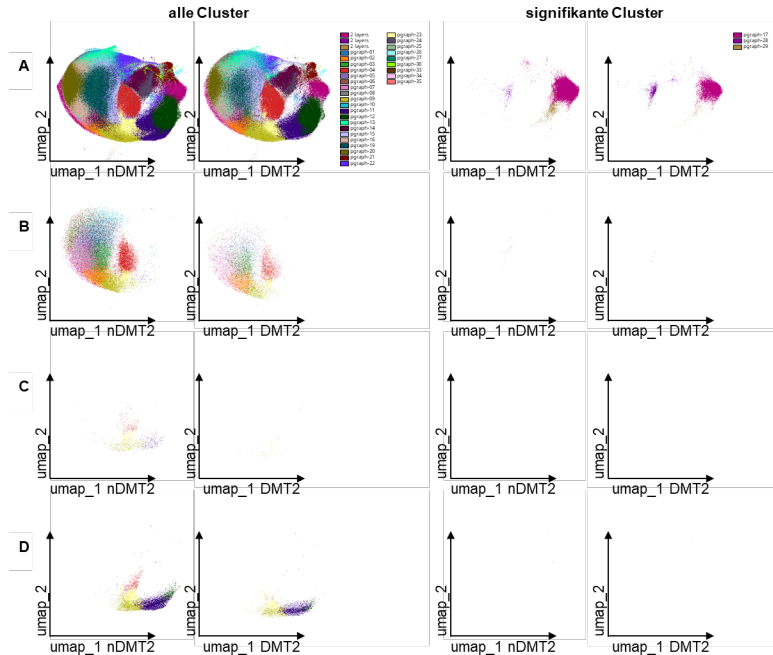


**Abbildung 67: Markerexpression intermediärer Monozyten nach manuellem Gating**  
**(A-B)** Markerexpression intermediärer Monozyten von DMT2 und nDMT2 nach manueller Gating. Die prozentuale Häufigkeit (%) von Expression folgender Marker intermediärer Monozyten wurden dargestellt: **(A)** Marker der Aktivierung (CD11a, CD54), **(B)** Chemokin-Rezeptoren (CCR2, CX3CR1). **(A-B)** Die Durchflusszytometrie-Daten wurden mit FlowJo analysiert. Darstellung mittels GraphPad und BioRender. Dargestellt: Median + Interquartilbereich (IQR); Median + Gesamtverteilung. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.

Bei nicht-klassischen Monozyten zeigten sich weder hinsichtlich ihrer Anzahl noch ihres Markerexpressionsprofils Unterschiede zwischen den Subgruppen.

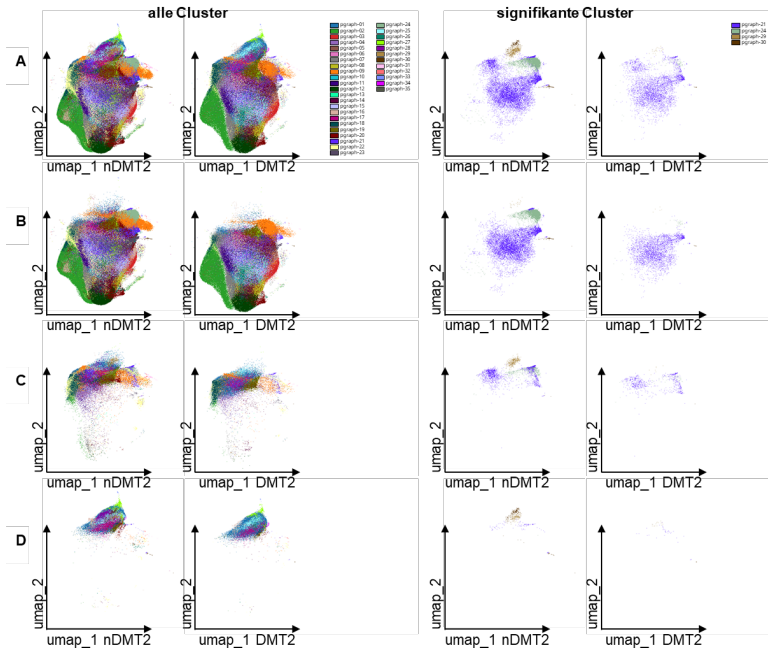
Im Anschluss an das manuelle Gating wurden unüberwachten Datenanalysen mittels UMAP und PhenoGraph durchgeführt. Diese erbrachten den Nachweis weiterer zuvor nicht definierter Cluster von Markerprofilen. Im Aktivierungspanel von Monozyten konnten so 35 phänotypisch verschiedene Cluster identifiziert

werden, von denen sich drei in den Subgruppen signifikant unterschieden (Abbildung 18).



**Abbildung 78: Unüberwachte Datenanalyse des Aktivierungspanels von Monozyten**  
**(A-D)** Unüberwachte Datenanalyse des Aktivierungspanels von Monozyten bzw. ihren Subpopulationen bei DMT2 und nDMT2. UMAP-Analyse des Aktivierungspanels, im Anschluss daran PhenoGraph (nearest neighbours k=20) für unüberwachtes Clustering. Linke Grafiken zeigen alle Cluster nach unüberwachtem Clustering, rechte Grafiken nur signifikant unterschiedliche Cluster. **(A)** Darstellung von Clustern aller Monozyten, **(B)** Darstellung von Clustern klassischer Monozyten, **(C)** Darstellung von Clustern intermediärer Monozyten, **(D)** Darstellung von Clustern nicht-klassischer Monozyten. **(A-D)** Darstellung mittels OMIQ-Software. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.

Im Chemokinpanel wurden analog dazu ebenfalls 35 phänotypisch heterogene Cluster registriert. Signifikante Unterschiede waren bei vier Clustern darzustellen (Abbildung 19).



**Abbildung 89: Unüberwachte Datenanalyse des Chemokinpanels von Monozyten**  
**(A-D)** Unüberwachte Datenanalyse des Chemokinpanels von Monozyten bzw. ihren Subpopulationen bei DMT2 und nDMT2. UMAP-Analyse des Aktivierungspanels, im Anschluss daran PhenoGraph (nearest neighbours k=20) für unüberwachtes Clustering. Linke Grafiken zeigen alle Cluster nach unüberwachtem Clustering, rechte Grafiken nur signifikant unterschiedliche Cluster. **(A)** Darstellung von Clustern aller Monozyten, **(B)** Darstellung von Clustern klassischer Monozyten, **(C)** Darstellung von Clustern intermediärer Monozyten, **(D)** Darstellung von Clustern nicht-klassischer Monozyten. **(A-D)** Darstellung mittels OMIQ-Software. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.

### 3.3.2. Erhöhte Thrombozytenaktivität bei DMT2

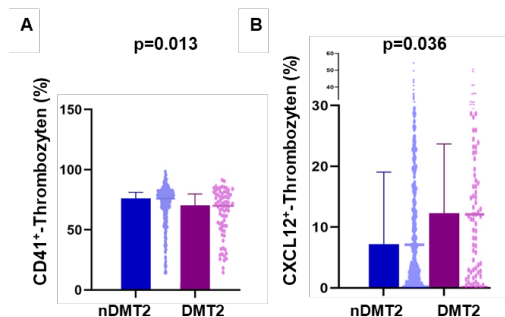
Analog zu den Monozyten erfolgten neben immunhistochemischer Darstellung der Thrombozyten-Akkumulation im Klappengewebe die Quantifizierung und Immunphänotypisierung von zirkulierenden Thrombozyten.

Die konventionell laborchemische Kontrolle hatte eine signifikant höhere Thrombozytenzahl bei DMT2 gemessen (nDMT2 versus DMT2; 1000/ $\mu$ l; Median



(IQR); 208 (176 - 240) versus 224 (192 - 261);  $p = 0,035$ ). Durchflusszytometrische Analysen nach manueller Gating Strategie zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede der Thrombozytenzahl beider Subkohorten, die hier als  $FSC^{low}CD42b^+$  Zellen definiert wurden (nDMT2 versus DMT2; Median (IQR);  $13 \times 10^9$  ( $10 \times 10^9 - 16 \times 10^9$ ) versus  $13 \times 10^9$  ( $10 \times 10^9 - 17 \times 10^9$ );  $p = 0,367$ ).

In der Durchflusszytometrie waren Unterschiede der Expression von Oberflächenmarkern und der Chemokineexpression bei zirkulierenden Thrombozyten von DMT2 und nDMT2 nachzuweisen. Das Thrombozyten-Glykoprotein CD41 war bei DMT2 signifikant geringer exprimiert (nDMT2 versus DMT2; CD41; %; Median (IQR); 76,2 (65,5 - 81,2) versus 70,5 (53,5 - 79,8);  $p = 0,013$ ). Die Expression von anderen Oberflächenmarkern (CD31, CD61, CD62P) war in beiden Gruppen vergleichbar. Das Chemokin CXCL12 wurde vermehrt in der Gruppe der DMT2 exprimiert (nDMT2 versus DMT2; Median (IQR); 7,2 (2,2 - 19,1) versus 12,3 (2,9 - 23,7),  $p = 0,036$ ) (Abbildung 20).

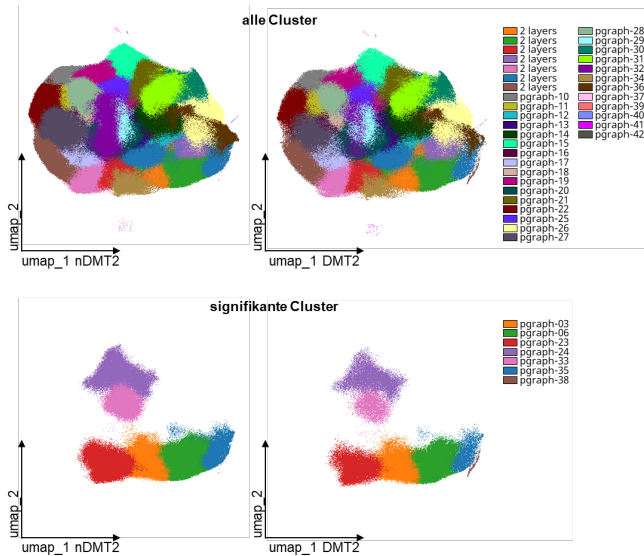


**Abbildung 20: Markerexpression von Thrombozyten nach manuellem Gating**

**(A-B)** Markerexpression Thrombozyten von DMT2 und nDMT2 nach manuellem Gating. Die prozentuale Häufigkeit (%) von Expression folgender Marker Thrombozyten wurden dargestellt: **(A)** Marker der Aktivierung (CD41), **(B)** Chemokin-Marker (CXCL12). **(A-B)** Die Durchflusszytometrie-Daten wurden mit FlowJo analysiert. Darstellung mittels GraphPad und BioRender. Dargestellt: Median + Interquartilbereich (IQR); Median + Gesamtverteilung. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.

Thrombozyten können nach Aktivierung an Leukozyten binden und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate bilden. Der Membranrezeptor CD62P ermöglicht dabei die die Bindung von aktivierten Thrombozyten an Leukozyten. Die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten definiert als FSC<sup>hi</sup>CD42b<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> Zellen, erfolgte bei DMT2 und nDMT2 im vergleichbaren Maße (nDMT2 versus DMT2; Median (IQR);  $8 \times 10^8$  ( $5 \times 10^8$ - $13 \times 10^8$ ) versus  $9 \times 10^8$  ( $5 \times 10^8$ - $15 \times 10^8$ );  $p = 0,59$ ). Jedoch zeigte die signifikant höhere Anzahl von CD62P-positiven Aggregaten bei DMT2 (nDMT2 versus DMT2; Median (IQR); 1240 (828,5 – 2034) versus 1586,5 (993,3 – 2966);  $p = 0,016$ ) eine verstärkte Aktivierung an.

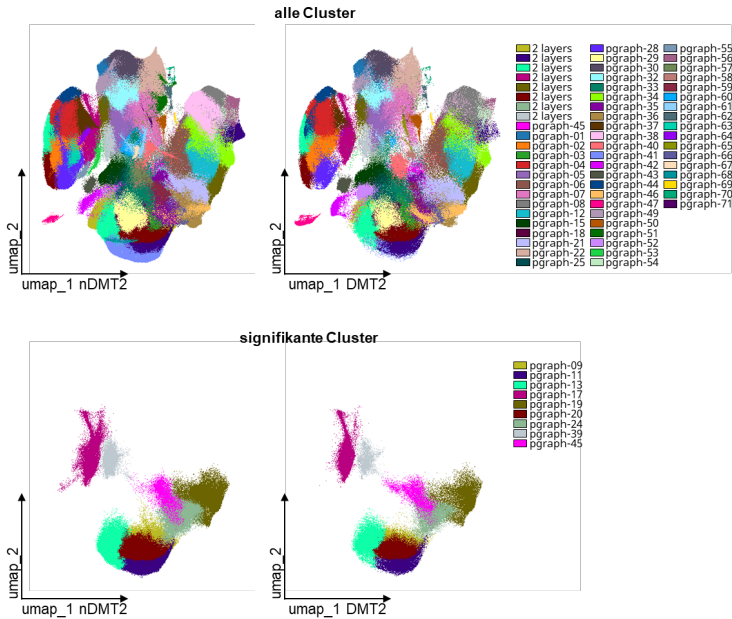
Nach manueller Gating-Analyse wurden im Thrombozytenpanel unüberwachte Datenanalysen durchgeführt. Dabei ergaben sich bei Thrombozyten 42 Clustern, von denen sich 6 Cluster in den Subgruppen signifikant unterschieden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Unüberwachte Datenanalyse von Thrombozyten**

Unüberwachte Datenanalyse von Thrombozyten bei DMT2 und nDMT2. UMAP-Analyse des Aktivierungspanels, im Anschluss daran PhenoGraph (nearest neighbours k=20) für unüberwachtes Clustering. Obere Grafiken zeigen alle Cluster nach unüberwachtem Clustering, untere Grafiken nur signifikante unterschiedliche Cluster. Darstellung mittels OMIQ-Software. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.

Bei den Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten wurden 71 verschiedene Cluster identifiziert. Hier waren bei 9 Clustern signifikante Unterschiede zwischen DMT2 und nDMT2 nachzuweisen (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Unüberwachte Datenanalyse Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate**  
 Unüberwachte Datenanalyse von Thrombozyten bei DMT2 und nDMT2. UMAP-Analyse des Aktivierungspanels, im Anschluss daran PhenoGraph (nearest neighbours k=20) für unüberwachtes Clustering. Obere Grafiken zeigen alle Cluster nach unüberwachtem Clustering, untere Grafiken nur signifikante unterschiedliche Cluster. Darstellung mittels OMIQ-Software. Abkürzungen: DMT2 – Diabetes mellitus Typ 2, nDMT2 – kein Diabetes mellitus Typ 2.

## 4. Diskussion

Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) gilt als Risikofaktor für die Entwicklung (Yan *et al.*, 2017; Larsson *et al.*, 2018) und einen raschen Progress (Ljungberg *et al.*, 2017) der kalzifizierenden Aortenklappenstenose (CAVD). Die diesen Beobachtungen zugrundeliegenden Pathomechanismen sind bisher weitestgehend unverstanden. Klappenveränderungen und Veränderungen von zirkulierenden Immunzellen bzw. zirkulierenden Thrombozyten im Rahmen einer CAVD bei gleichzeitig vorliegendem DMT2 wurden bislang kaum untersucht. Um etwaige lokale und systemischen Veränderungen im Rahmen einer hochgradigen CAVD bei Patienten mit DMT2 zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit immunhistochemische Färbungen von explantiertem Aortenklappengewebe sowie durchflusszytometrische Analysen von zirkulierenden Monozyten, Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten durchgeführt. Hierbei sollten Unterschiede zwischen Patienten mit DMT2 und Patienten ohne DMT2 identifiziert werden.

Dabei wurden folgende drei Haupt-Beobachtungen gemacht:

1. Aortenklappengewebe von Patienten mit DMT2 wies eine höhere Zellzahl auf. Dabei war die Expression von CD3-positiven T-Zellen und CD16-positiven Monozyten in der Aortenklappe bzw. in bestimmten Abschnitten der Klappe geringer bei Patienten mit DMT2 als bei Patienten ohne DMT2.
2. Patienten mit DMT2 wiesen im Vergleich mit Patienten ohne DMT2 ein verändertes Monozytenprofil auf: Der Anteil klassischer Monozyten war insgesamt reduziert, gleichzeitig fanden sich Hinweise einer geringeren Aktivierung klassischer und intermediärer Monozyten.
3. Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wiesen insgesamt Zeichen einer stärkeren Aktivierung zirkulierender Thrombozyten auf.

#### 4.1. Geringere Immunzelleexpression im Klappengewebe bei DMT2

Interessanterweise wies das Aortenklappengewebe von Diabetikern abschnittsweise eine niedrigere Anzahl an CD3-positiven (T-Zellen) und CD16-positiven Zellen (Monozyten) auf als das von Patienten ohne DMT2. Die Anzahl von CD14- (Monozyten) und CD68- (Makrophagen) positiven Zellen waren jeweils in beiden Gruppen vergleichbar. Auch bezüglich der Expression von CD42b-positiven Arealen (Thrombozyten) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Insgesamt war die Zellzahl bei Diabetikern erhöht. Diese Ergebnisse mögen auf dem ersten Blick kontraintuitiv erscheinen, da insbesondere Frühstadien der CAVD ähnlich der Atherosklerose von Immunzellinfiltration gekennzeichnet sind und DMT2, wie oben beschrieben, mit inflammatorischen Prozessen assoziiert wird. Die Datenlage hinsichtlich lokaler Veränderungen bei CAVD und DMT2 ist inkonsistent. Mosch *et al.* (2017) haben eine ähnliche, teils gar reduzierte Entzündungsreaktion im Klappenmaterial von Patienten mit DMT2 im Vergleich zu dem von Patienten ohne DMT2 nachweisen können. Gleichzeitig waren Kalzifikationsmarker wie Runx2 und ALP hochreguliert und das Klappengewebe bei DMT2 stärker mineralisiert. Interessanterweise wurde in dem Rahmen bei DMT2 eine größere KÖF und ein niedrigerer mittlerer Flussgradient entsprechend eines klinisch weniger fortgeschrittenen Erkrankungsstadiums gemessen. Solche echokardiografisch ermittelten Auffälligkeiten zeigen sich zahlenmäßig auch bei unserer Kohorte, jedoch war dieses Muster statistisch nicht signifikant. Hieraus könnte geschlossen werden, dass bei Diabetikern trotz echokardiografisch ähnlich fortgeschrittener Präsentation der CAVD beider Subgruppen ein auf molekularer Ebene weiter fortgeschrittenes Erkrankungsstadium mit zurückgegangener, ausgebrannter Entzündung und stärker ausgeprägter Kalzifikation vorliegen könnte. Demgegenüber wiesen einige Studien eine verstärkte lokale Entzündungsreaktion bei Diabetikern mit CAVD nach. Natorska *et al.* (2012) haben beispielsweise sowohl systemisch als auch lokal eine höhere Expression des CRP als Ausdruck von Inflammation bei Diabetikern darstellen können und schlussfolgerten daraus, dass ein rascherer Progress der CAVD bei Diabetikern

auf Basis einer verstärkten Entzündungsreaktion erfolgt. Vor dem Hintergrund, dass dort untersuchte Patienten mit DMT2 mit einem BMI  $>30 \text{ kg/m}^2$  deutlich übergewichtiger waren, schlossen sie ein Einfluss der Ergebnisse durch eine etwaige Adipositas-medierte CRP-Produktion, die mehrfach vorbeschrieben ist, nicht aus (Visser *et al.*, 1999; Sweat *et al.*, 2008). Passend dazu fanden Coté *et al.* (2013) bei etwa einem Viertel ihrer Kohorte chronische Entzündungsinfiltrate mit Neovaskularisation und Ossifikation im Klappengewebe von Diabetikern.

Trotz dieser vermeintlichen Widersprüchlichkeit erscheinen diese Beobachtungen prinzipiell miteinander vereinbar. So könnte Inflammation bis zu einem bestimmten Kalzifikationsgrad der treibende Faktor der CAVD sein und im Verlauf eine untergeordnete Rolle einnehmen. Die Kalzifikation könnte dabei auf verschiedenen Wegen vorangetrieben werden. Das pro-kalzifizierende Potential von DMT2, unabhängig von einer vorangehenden Inflammation, wurde in verschiedenen Studien beschrieben. Im Mausmodell zeigte sich, dass eine diabetische Stoffwechsellage bei Mäusen mit CAVD zur frühen Mineralisierung der Aortenklappe führt (Scatena *et al.*, 2018). Auch bei in vitro-Studien mit in Glucose kultivierten VIC wurde eine erhöhte Calciumablagerung in der EZM der Zellen nachgewiesen. Eine Rolle könnte dabei die vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Molekülen und ROS durch Immunzellen spielen, die verschiedene pro-osteogene Signalkaskaden aktivieren, an denen Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B, Runx2 und BMP2 involviert sind. Folge ist der valvuläre EZM-Umbau mit Fibrosierung und Verknöcherung. Des Weiteren können AGE/RAGE-Interaktionen durch Induktion verschiedener Signalketten, an denen TGF- $\beta$  und BMP2 involviert sind, zur Differenzierung von VEC in mesenchymale Phänotypen zur Klappenverkalkung beitragen (Kopytek *et al.*, 2020). Denkbar wäre auch, dass die diabetische Stoffwechsellage Klappenveränderung neben einem Inflammation-medierten Weg durch vermehrte Bildung diffuser Mikrokalzifikation im Klappengewebe begünstigt. Diese wird wahrscheinlich zum einen durch die Mineralisierung apoptotischer Zellen, zum anderen durch die Freisetzung von EV induziert. Infolge einer vermehrten Produktion von Apoptose-mediierenden ROS im Rahmen von DMT2, könnte es zu einem vermehrten Anfall apoptotischer Körperchen kommen und im

Verlauf zu deren Mikrokalzifikation (Volpe *et al.*, 2018). EV werden wahrscheinlich von verschiedenen Zelltypen, wie VIC, aber auch Makrophagen ausgeschüttet und können unterschiedliche kalzifizierende Mediatoren wie Annexine 2, 5, 6 und ALP beinhalten (Krohn *et al.*, 2016; Mosch *et al.*, 2017). Mosch *et al.* (2017) konnten bei Diabetikern mit CAVD eine höhere Expression der kalzifizierenden Mediatoren Annexin 2 und 5 feststellen können.

Der Einfluss von weiteren Faktoren, beispielsweise ein insuffizient therapierter und dauerhaft erhöhter Blutzucker oder andere Komorbiditäten, ist noch zu weiter zu untersuchen. Es gibt allerdings Hinweise, dass typische Komorbiditäten von DMT2, wie Adipositas und Dyslipidämien, unabhängig voneinander DMT2-assoziierte Veränderung durch Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen unterstützen (Liu *et al.*, 2012; Tolani *et al.*, 2013).

Eine höhere Zelldichte im Klappengewebe von Patienten mit DMT2 wurde noch nicht beschrieben. Denkbar wäre, dass es sich hierbei um weitere Immunzellen oder um Zellen mit mesenchymalem oder osteogenen Phänotyp handeln könnte. Es sollten weitere makro- und mikroskopische Untersuchungen von Klappengewebe bei Patienten mit CAVD und DMT2 zur Beurteilung von Inflammations- und Kalzifikationsprozessen durchgeführt werden.

## 4.2. Verändertes Monozyten-Profil bei Patienten mit DMT2

Unseres Wissens nach ist diese Arbeit die erste, die das Profil zirkulierender Monozyten bei hochgradiger CAVD und gleichzeitigem Vorliegen von Diabetes mellitus Typ 2 untersucht.

Die CAVD wurde bereits in verschiedenen Studien mit einer verstärkten Monozyten-Aktivität assoziiert (Moore, Sheedy and Fisher, 2013; Aikawa and Libby, 2017; Ngcobo *et al.*, 2022). Shimoni *et al.* (2016) haben bei Patienten mit moderater bis hochgradiger CAVD eine erhöhte Anzahl zirkulierender CD14-positiver Monozyten mit inverser Korrelation zur KÖF als Indikator für eine fortgeschrittene Aortenklappenstenose feststellen können. Bei einer Studie von Efe *et al.* (2016) war die Monozyten-Anzahl je nach Schweregrad der CAVD erhöht. Unter Berücksichtigung der drei Monozytenklassen konnten Hewing *et al.*



(2017) bei Patienten mit hochgradiger CAVD im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Anzahl intermediärer, nicht aber klassischer oder nicht-klassischer Monozyten zeigen. Interessanterweise wird eine erhöhte Anzahl von intermediären Monozyten immer wieder mit kardiovaskulären Erkrankungen, wie beispielsweise der Atherosklerose, in Verbindung gemacht, weshalb die Anzahl intermediärer Monozyten als prädiktiver Marker für kardiovaskuläre Ereignisse diskutiert wird (Rogacev *et al.*, 2012; Wildgruber *et al.*, 2016; Vos *et al.*, 2017; Elchinova *et al.*, 2018).

Bei der hier vorgenommenen unbeobachteten Cluster-Analyse, die ein umfangreiches Spektrum von Monozyten-Subclustern hervorbrachte, wurde deutlich, dass die bisher übliche Einteilung in nur drei Monozytenklassen der Komplexität von involvierten Zelltypen und ihren Interaktionen miteinander nicht gerecht wird. Klassische (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediäre (CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>) und nicht-klassische Monozyten (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) weisen eigene spezifische phänotypische und funktionelle Eigenschaften auf und lassen sich anhand verschiedener extra- und intrazellulärer Marker weiter differenzieren (Idzkowska *et al.*, 2015). Entsprechend kann das Monozyten-Expressionsprofil krankheitsspezifisch unterschiedlich sein (Gordon and Taylor, 2005).

Zur weiteren Charakterisierung des Monozyten-Expressionsprofils wurden in dieser hier vorgelegten Arbeit folgende extra- und intrazelluläre Marker untersucht: Oberflächenproteine, die bei Aktivierung (HLA-DR) oder zur Ko-Stimulation anderer Immunzellen (z.B. T-Zellen, B-Zellen) exprimiert werden (CD40, CD80); Adhäsionsmoleküle der Gruppe der Integrine (CD11a, CD11b, CD49a), Selektine (CD62L) oder Proteine der Super-Immunglobulinfamilie (CD54, CD106), die Interaktionen von Monozyten mit anderen Zellen vermitteln; außerdem Chemokin- (CXCL12, CXCL14) und Zytokinmarker (MIF) sowie Marker von Chemokin-Rezeptoren (CCR2, CCR7, CXCR4, CXCR7, CX<sub>3</sub>CR1).

Dabei konnten signifikante Unterschiede der Monozytenexpressionsprofile von nDMT2 und DMT2 dargestellt werden. Einerseits war der Anteil klassischer Monozyten bei DMT2 signifikant niedriger als bei nDMT2, andererseits unterschied sich die prozentuale Häufigkeit von intermediären und nicht-klassischen Monozyten zwischen den Subgruppen nicht signifikant. Klassische

Monozyten von DMT2 exprimierten zudem in geringerem Ausmaß Marker der Monozyten-Aktivierung (CD11a, CD11b, CD49a, CD54, CD62L), Chemokin- bzw. Zytokinmarker (CXCL12, CXCL14, MIF) und Marker von Chemokin-Rezeptoren (CCR2, CXCR4, CX3CR1). Auch bei intermediären Monozyten von DMT2 ließ die geringere Expression von bestimmten Oberflächenmarkern auf ein geringeres Aktivitätsniveau schließen (HLA-DR, CD40, CD11a, CD49a, CD54, CD106, CCR2, CX<sub>3</sub>CR1). Diese Beobachtungen einer geringeren Anzahl klassischer Monozyten sowie einer weniger stark ausgeprägten Aktivierung klassischer und intermediärer Monozyten bei CAVD-Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 erscheinen vor dem Hintergrund, dass DMT2 als ein Zustand chronischer subklinischer Inflammation gilt, zunächst kontraintuitiv. DMT2 wurde in verschiedenen Studien mit vermehrter Aktivierung von Monozyten-/Makrophagen-Linien mit verstärkter Bildung von Chemokinen, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie ROS assoziiert und soll auf dieser Basis kardiovaskuläre Inflammation begünstigen (Kitahara *et al.*, 1980; Guha *et al.*, 2000; Shanmugam *et al.*, 2003; Dasu, Devaraj and Jialal, 2007; Lee *et al.*, 2012; Mokgalaboni *et al.*, 2020). Dieser Effekt wurde auf epigenetische Veränderungen der Monozyten durch chronische Hyperglykämien im Sinne eines hyperglykämischen Gedächtnisses zurückgeführt (Sartipy and Loskutoff, 2003; Thiem *et al.*, 2021). Zusätzlich konnte die verstärkte Bildung sogenannter advanced glycation end products (AGE) und ihrer Rezeptoren (RAGE) (Donath and Shoelson, 2011) beobachtet werden. AGE - eine heterogene Gruppe von Molekülen, die durch nicht-enzymatische Glykation bei chronischen Hyperglykämien entstehen - induzieren die Aktivierung verschiedener proinflammatorischer intrazellulärer Signalwege. Des Weiteren wurde das Vorliegen eines veränderten Monozytenprofils bei Patienten mit DMT2 beschrieben. Wie auch bei dieser Arbeit war in mehreren Studien nachgewiesen worden, dass bei DMT2 verschiedene Monozytenklassen unterschiedlich stark exprimiert waren, jedoch ist die Studienlage dazu insgesamt widersprüchlich. So konnten Min *et al.* (2012) eine erhöhte proinflammatorische Aktivität mit höherer Anzahl CD16-positiver Monozyten bei Patienten mit DMT2, die nicht von DMT2-Folgeerkrankung betroffen waren, nachweisen. Interessanterweise wurde jedoch eine Reduktion dieser CD16-positiven Monozyten festgestellt, sobald diabetische

Komplikationen manifest wurden. Valtierra-Alvarado *et al.* (2020) konnten ebenfalls einen Anstieg der CD16-positiven Monozyten bei DMT2 im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden beobachten. Dafür wurden weniger CD16-negative Monozyten nachgewiesen, je höher der Blutzucker war. Kumar *et al.* (2015) zeigten bei DMT2 eine Veränderung der Monozyten-Verteilung mit Reduktion von klassischen und intermediären Monozyten. Bezüglich des Funktionsstatus von Monozyten konnten weitere Studien im Rahmen von unbehandeltem DMT2 eine Immunzellfunktion darstellen (Komura *et al.*, 2009; Davison *et al.*, 2017). So haben Komura *et al.* einen niedrigeren Aktivierungsstatus von Monozyten bei unbehandeltem DMT2, bei behandeltem DMT2 und Prädiabetes dagegen einen höheren Aktivierungsstatus von Monozyten darstellen können. In Zusammenschau dieser insgesamt nicht konsistenten Datenlage bezüglich des Monozytenprofils, wird deutlich, dass nicht nur das Vorliegen von DMT2 selbst, sondern weitere Faktoren, wie der Aspekt einer unzureichend kontrollierten Stoffwechsellage oder Komorbiditäten Einfluss auf das Monozytenprofil von Patienten mit und ohne CAVD haben könnten. Vor dem Hintergrund, dass die Patienten mit DMT2 der hier vorlegten Arbeit von höheren (Langzeit-) Blutzuckerwerten sowie Komorbiditäten wie Übergewicht und Dyslipidämien betroffen waren, lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit am ehesten mit jenen Studien vereinbaren, die im Rahmen eines (langjährig) insuffizient eingestellten bzw. eines fortgeschrittenen DMT2 eine Änderung im Sinne einer Reduktion von Monozytenklassen bzw. einer verminderten Monozytenaktivität beschreiben. Diese Beobachtungen könnten im Sinne einer Erschöpfung nach langjähriger chronischer Aktivierung im Rahmen eines fortgeschrittenen DMT2 gesehen werden.

Daneben fällt auf, dass die hier untersuchte Gruppe mit DMT2 deutlich häufiger mit Statinen therapiert wurde. Die Statin-induzierte Inhibition der Expression verschiedener proinflammatorischer Moleküle, inklusive des CRP ist vorbeschrieben (Albert *et al.*, 2001). So haben Rezaie-Majd *et al.* (2003) eine Reduktion der Expression von Oberflächenmolekülen wie CD54 auf CD14-positiven Monozyten nach sechsmonatiger Statingabe (Simvastatin, Atorvastatin und Cerivastatin) *in vivo* und *in vitro* darstellen können. Sie schlussfolgerten

daraus, dass eine verminderte Monozyten-vermittelte Adhäsion zu der anti-inflammatorischen Wirkung der Medikamente beitragen könnte. Auch Rothe *et al.* (1999) haben nach Fluvastatin-Gabe eine Abnahme der CD14-Expressionsdichte von Monozyten nachweisen können. Vor diesem Hintergrund ist ein Einfluss der Dauermedikation mit Statinen auf unser Ergebnis, nämlich eine geringere Expression von klassischen Monozyten bzw. eine geringere Aktivierung von klassischen und intermediären Monozyten nicht auszuschließen. Die variable Datenlage insbesondere in Bezug auf das Monozytenspektrum bei DMT2 macht deutlich, dass weitere Studien zur Charakterisierung der Veränderungen des Immunzellprofil bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 mit oder ohne CAVD durchgeführt werden sollten. Die Differenzierung der Monozyten-Subklassen erscheint vor allem empfehlenswert, da sich Hinweise mehren, dass Monozyten krankheitsspezifisch phänotypische und funktionale Unterschiede aufweisen. In Bezug auf die CAVD-Entwicklung, die auf fibröse und osteogenen Umbauprozessen basiert, ist beispielsweise das Potential CD14-positiver Monozyten, sich in Osteoblasten-ähnliche Zellen mit Mineralisierungspotential differenzieren zu können, weiter zu analysieren. Dafür könnten durchflusszytometrische Analyse von hämatopoetischen Markern wie CD13, CD45 und CD34 sowie osteogene Marker wie Typ-1- Kollagen, ALP, Osteonectin, Osteopontin und Osteocalcin durchgeführt werden (Kuwana *et al.*, 2003; Suda *et al.*, 2009; Egan *et al.*, 2011).

#### 4.3. Verstärkte Thrombozytenaktivität bei DMT2

Thrombozyten sind nicht nur maßgeblich für die Blutgerinnung verantwortlich, sondern spielen auch eine aktive Rolle bei inflammatorischen Prozessen (van Rooy *et al.*, 2015). Die enge Interaktion zwischen Thrombozyten und Immunzellen wird als Thrombo-Inflammation bezeichnet und ist im Rahmen von kardiovaskulären Entzündungsprozessen, wie der Atherosklerose und der CAVD zu beobachten. Dabei werden Thrombozyten durch hämodynamische Veränderungen am beschädigten Endothel aktiviert. Neben der Einleitung der Gerinnungskaskade werden durch auto- und parakrine Ausschüttung

verschiedener Botenstoffe die Migration der Immunzellen an den Entzündungsherd und die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate gefördert (Müller *et al.*, 2015; Petito *et al.*, 2018; Sellers *et al.*, 2021). Als mögliche Mediatoren dieser Prozesse gelten Chemokine bzw. Zytokine, wie die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten thrombozytären Proteine CXCL12, CXCL14 und MIF. Neben diesen Botenstoffen wurden im Rahmen dieser Arbeit Proteine untersucht, die sich unabhängig des Aktivitätszustandes an der Zelloberfläche befinden und daher als Identifikatoren der Thrombozyten eingesetzt wurden. Dazu gehören CD41 und CD61, die gemeinsam den Glykoprotein- (GP) IIb/IIIa-Rezeptor bilden, sowie CD42b, eine Untereinheit des von-Willebrand-Faktor (vWF)-Rezeptors (Phillips *et al.*, 1988). Die drei Proteine sind für die Thrombozyten-Aggregation essenziell. Als Aktivierungsmarker wurden CD31 und CD62P untersucht, die bei Thrombozyten-Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Im Rahmen der Arbeit wiesen Patienten mit DMT2 Zeichen stärkerer Thrombozyten-Aktivität in Form eines erhöhten Anteils von CXCL12 bei der Charakterisierung von Thrombozyten und CD62P bei der Analyse von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten auf. CD62P mediiert dabei die Interaktion von aktivierten Thrombozyten und Leukozyten und fördert die Thrombozytenaggregation (Théorêt *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2020). DMT2 wurde schon mehrfach als prothrombotischer Zustand beschrieben mit Hyperaktivierung von Thrombozyten, verstärkter Aktivierung von Koagulationsproteinen und endothelialer Dysfunktion auf Basis von oxidativem Stress (Eibl *et al.*, 2004; Véricel *et al.*, 2004; Grant, 2007; Zahran *et al.*, 2018). Daher fügen sich die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse gut in bestehende Forschungserkenntnisse ein. Vorbeschrieben ist, dass die Expression von Aktivierungsmarkern wie CD62P auf Thrombozyten und in Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten mit dem Niveau des HbA1c zu korrelieren scheint. Ein kontrollierter Stoffwechsel wird entsprechend mit reduzierter Reaktivität assoziiert (Yngen *et al.*, 2006).

Auffällig ist zudem eine reduzierte Expression von CD41 (GP IIb), bei gleichartiger Expression von CD61 (GP IIIa). Derartige Veränderungen wurden unseres Wissens nach noch nicht beschrieben. In der Studie von Saboor (2013)

zeigten beide Glykoproteine keine Veränderungen bei Vorliegen von DMT2. Ein größerer Anteil von Studien zeigt jedoch eine stärkere CD41-/CD61-Expression bei Diabetikern im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Tschoepe *et al.*, 1990; Pretorius *et al.*, 2018). Ferner wurde beschrieben, dass die beobachtete erhöhte Thrombozyten-Aktivität bei Hyperglykämie sogar auf einer vermehrten Produktion dieser Glykoproteine durch Megakaryozyten, den Thrombozyten-Vorläuferzellen, beruhen könnte (Schneider, 2009). Es sind weitere Untersuchungen nötig, um einen etwaigen Pathomechanismus genauer beschreiben zu können.

Der Beitrag von Thrombozyten an der Entstehung und dem Fortschreiten der CAVD ist nur teilweise verstanden und Gegenstand aktueller Forschung.

Neben der proinflammatorischen Wirkung, die Mineralisierungsprozessen auf Basis von lokaler Entzündung vorantreibt, wurde ein möglicherweise kalzifizierendes Potential der Zellen beobachtet. Bouchareb *et al.* (2019) beschrieben, dass Thrombozyten über komplexe Interaktion mit den VIC ein osteogenes Programm in den VIC induzieren und auch auf diese Weise zur Klappenmineralisierung beitragen könnten.

#### 4.4. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend zeigt sich bei Patienten mit DMT2 sowohl systemisch als auch lokal ein Bild weniger stark ausgeprägter Inflammation im Vergleich zu Patienten ohne DMT2 bei gleichzeitig stärkerer Aktivierung zirkulierender Thrombozyten. Die Datenlage weist mehrheitlich auf eine auf Thrombo-Inflammation gründende Initiierung der CAVD-typischen Veränderungen, noch zu klären ist allerdings, ob sich der Prozess der Inflammation nur transient bis zu einem bestimmten Stadium der Klappenkalzifikation abspielt und ab einem gewissen Punkt der Pathogenese eine untergeordnete Rolle spielen könnte oder von anderen Faktoren abhängt (Kamalesh *et al.*, 2009). In dem Rahmen ist das osteogene Differenzierungspotential von zirkulierenden Monozyten, Thrombozyten und VIC näher zu beleuchten.

Weiterhin ist zu prüfen, ob DMT2 und weitere damit vergesellschaftete Inflammation und Kalzifikation fördernde Zustände zu einem beschleunigten Ablauf der bekannten Pathogenese führen. Neben DMT2 wurden Adipositas, Dyslipidämien und arterielle Hypertonie, zusammengefasst unter dem Begriff des metabolischen Syndroms, bereits als unabhängige Risikofaktoren für die CAVD-Entstehung beschrieben (Rajamannan, Bonow and Rahimtoola, 2007; Nowakowska *et al.*, 2019). Auch in dieser Arbeit war die Subgruppe der Patienten mit DMT2 signifikant häufiger von diesen Erkrankungen betroffen. Ein dauerhaft insuffizient eingestellter DMT2 und typische Komorbiditäten, wie Adipositas und Dyslipidämien, sind Faktoren, die bekanntermaßen unabhängig voneinander proinflammatorische Signalwege aktivieren (Liu *et al.*, 2012; Tolani *et al.*, 2013). Auch wurde die Hypothese aufgestellt, dass der CAVD-Erkrankungsprozess im Sinne einer Dosis-Wirkung-Beziehung mit Vorliegen eines jeden weiteren Risikofaktors beschleunigt werden könnte (Yan *et al.*, 2017). Entsprechend ist denkbar, dass die Kombination dieser Faktoren derart beschleunigen wirkt, dass sich Patienten mit DMT2 auf molekularer Ebene rascher in einem fortgeschrittenen Stadium von ausgebrannter Inflammation und ausgeprägter Kalzifikation befinden als die nicht von DMT2 betroffene Subgruppe.

Des Weiteren ist ein von Inflammation unabhängiger Weg der Klappenkalzifizierung bei Patienten mit DMT2 und damit einhergehend die Rolle von kalzifizierenden EV für die Pathogenese zu untersuchen. Auch das osteogene Differenzierungspotential von zirkulierenden Monozyten, Thrombozyten und VIC ist näher zu beleuchten.

Es wird deutlich, dass das Augenmerk zukünftiger Forschung insbesondere auf den zeitlichen Verlauf und Zusammenhang von Kalzifikation und Inflammation bei Patienten mit DMT2 und CAVD liegen sollte.

Die Arbeit mit humanem Klappengewebe ermöglicht die Beurteilung von Momentzuständen und bietet lediglich Hinweise auf möglicherweise zuvor abgelaufene Prozesse. Insbesondere humanes Klappengewebe liegt in der Regel erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien für histopathologischen Analysen vor. In vitro-Experimente und Tiermodelle der CAVD dagegen erlauben

die Kontrolle von bekannten Variablen und könnten eine longitudinale Betrachtung von Inflammation und Kalzifikation bei Vorliegen von DMT2 ermöglichen.

Weiterhin wurde bereits das Verständnis der Pathogenese um das Wissen um prädisponierende genetische Faktoren erweitert, wie Polymorphismen im NOTCH-1-Gen und im Apolipoprotein E2-Gen, sowie Geschlechtsunterschiede in der Genexpression von krankheitsrelevanten Signalwegen (Avakian *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 2005; McCoy, Nicholas and Masters, 2012). Das Geschlecht als mögliche verzerrende Variable wurde nicht gesondert betrachtet, auch das Vorliegen von genetischen Abweichungen wurde in dieser Studie nicht geprüft. Ebenso ist der Einfluss von der Dauermedikation auf Studienergebnisse zu beachten. Die Wirkung verschiedener Pharmaka wird im Rahmen mehrerer Studien getestet. Statine wirken bekanntermaßen durch Präparat-abhängige Inhibition von proinflammatorischen Molekülen und Immunzellen anti-inflammatorisch. Bei der Atherosklerose ist die Medikamentengruppe fester Therapiebestandteil, ein verlaufsverändernder Effekt auf die CAVD konnte in mehreren Studien jedoch nicht nachgewiesen werden (Cowell *et al.*, 2005; Rossebø *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2010). Bei erneuter Analyse einer dieser Studien kam zur Darstellung, dass von einer Simvastatin-Ezetimib-Behandlung lediglich Patienten mit milder Klappenerkrankung und hohem LDL-Wert profitierten (Greve *et al.*, 2019). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der Zeitpunkt des Therapiebeginns zu spät gewählt wurde und die Klappenveränderungen zu weit fortgeschritten waren bzw. sich in einem Zustand befanden, in dem Atherosklerose-ähnliche Prozesse möglicherweise nicht mehr die zentrale Rolle spielen. Das verdeutlicht auch die Notwendigkeit, Hochrisikopatienten für die Entwicklung einer CAVD zu identifizieren, um diese dann rechtzeitig einer Therapie zuzuführen (Donato *et al.*, 2020). Auch andere in den Lipid- und Glucosestoffwechsel eingreifende Wirkstoffe (z.B. Niacin, PCSK9-Inhibitoren, Antisense-Oligonukleotide gegen Lipoprotein(a)-mRNA, Dipeptidyl peptidase-4-Inhibitoren) werden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die CAVD geprüft (Viney *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2017; Donato *et al.*, 2020). In den Knochenstoffwechsel eingreifende Medikamente, wie Denosumab und



Alendronsäure wurden ebenfalls getestet, jedoch zeigte sich hier kein Effekt auf das Fortschreiten der Erkrankung (Pawade *et al.*, 2021).

In dem Zusammenhang ist außerdem die Etablierung von Biomarkern ausstehend, die nicht nur, wie es beim NT-pro-BNP der Fall ist, auf eine bereits bestehende Herzbelastung weisen, sondern anhand derer prädiktiv schwere Verläufe prognostizierbar werden.

Trotz der vielen Ansätze konnte bisher keine pharmakologische Therapie etabliert werden, die in den Krankheitsprozess eingreifen könnte. Aktuell gilt bei der Diagnose einer Aortenklappenstenose, mit individuellen Ausnahmen, das Prinzip des „watchful waiting“ bis sich bei Vorliegen eines hochgradigen Krankheitsstadiums oder bei Auftreten von Symptomen die Indikation eines Klappenersatzes ergibt. Ein weit fortgeschrittenes Krankheitsstadium ist jedoch mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität vergesellschaftet - aufgrund von irreversiblen myokardialen Umbauprozessen, die bei DMT2 im stärkeren Ausmaß stattfinden. Vor allem Patienten mit DMT2 haben dann ein erhöhtes Risiko, an Herzversagen oder einem plötzlichen Herztod zu versterben (Lund and Larsen, 1989; Coisne *et al.*, 2022; Seillier *et al.*, 2022) (Coisne). Daneben ist bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 das Operationsrisiko erhöht, darstellbar am STS-Score oder Euro-SCORE II, bei gleichzeitig schlechterem Outcome. Auch nach TAVI sind Diabetiker stärker von Komplikationen betroffen (Halkos *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2022). Langfristig konnte zudem eine raschere Degeneration der Klappenprothese bei DMT2 nachgewiesen werden (Lorusso *et al.*, 2012). Vor dem Hintergrund einer insgesamt schlechteren Prognose ist anzunehmen, dass insbesondere diese Patientengruppe von der Etablierung einer verlaufsmodifizierenden Pharmakotherapie profitieren würde.

## 5. Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) erhöht das Risiko für die Entwicklung einer kalzifizierenden Aortenklappenstenose (CAVD), soll ihr Fortschreiten beschleunigen und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Der pathogenetische Zusammenhang der CAVD und DMT2 ist dabei weitestgehend ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit DMT2 und Patienten ohne DMT2 mit hochgradiger Aortenklappenstenose hinsichtlich lokaler Klappengewebsveränderungen und Veränderungen des Profils zirkulierender Monozyten und Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten miteinander verglichen. Dafür wurde explantiertes Aortenklappenmaterial immunhistochemisch mit Antikörpern gegen T-Zellen (CD3), Monozyten (CD14, CD16), Makrophagen (CD68) und Thrombozyten (CD42b) gefärbt. Durchflusszytometrische Analysen dienen der Charakterisierung zirkulierender Monozyten und Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate bei Patienten mit und ohne DMT2.

Bei Patienten mit DMT2 zeigte sich sowohl lokal als auch systemisch eine tendenziell geringere Expression von Inflammation: Im Klappengewebe von Patienten mit DMT2 waren CD3-positive T-Zellen und CD16-positive Monozyten weniger stark exprimiert. In der Durchflusszytometrie war der Anteil klassischer Monozyten reduziert. Daneben zeigte sich ein Bild geringerer Aktivierung von klassischen und intermediären Monozyten bei DMT2. Gleichzeitig waren Hinweise einer stärkeren Thrombozyten-Aktivierung zur Darstellung gekommen. Die hier vorgelegte Arbeit erweitert das Verständnis der thromboinflammatorischen Prozesse im Rahmen der hochgradigen CAVD bei Vorliegen von DMT2. Obwohl DMT2 als Zustand chronischer Inflammation gilt, konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Prozesse im Aortenklappengewebe und auf Systemebene im Stadium der hochgradigen CAVD in geringerem Ausmaß vorherrschen als bei Patienten ohne DMT2. Dabei könnten diesen Beobachtungen folgende Ursachen zugrunde liegen: Inflammation im Rahmen der Klappenerkrankung könnte nur transient in den frühen Stadien eine Rolle

spielen. DMT2 und damit vergesellschaftete Inflammation- und Kalzifikationsfördernde Faktoren, wie z.B. ein insuffizient eingestellter Blutzucker oder Komorbiditäten wie Adipositas und Dyslipidämien, könnten zu einem beschleunigten Progress der CAVD führen, sodass bei DMT2 rascher ein Zustand ausgebrannter Inflammation vorliegt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass andere Kalzifikationsfördernde Mechanismen, wie diffuse Mikrokalzifikation oder extrazelluläre Vesikel, bei DMT2 verstärkt auftreten. Auch vor dem Hintergrund einer hier zur Darstellung kommenden erhöhten Zellzahl im Klappengewebe ist dabei das osteogene Differenzierungspotential von Immunzellen, valvulären interstitiellen (VIC) und endothelialen Zellen (VEC) sowie Thrombozyten näher zu beleuchten. Bezüglich der Thrombozyten zeigt sich ein Bild stärkerer Aktivierung, was sich ebenfalls gut in die bekannte Forschungserkenntnisse von DMT2 als pro-inflammatorischen Zustand einfügt. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind neben der Entwicklung einer verlaufsmodifizierenden Pharmakotherapie für die Identifikation des optimalen Zeitraumes für eine mögliche zukünftige pharmakologische Interventionen relevant, da anzunehmen ist, dass jeweils unterschiedliche Mechanismen zu verschiedenen Zeitpunkten die Pathogenese der CAVD bedingen.

## 6. Literaturverzeichnis

Adan, A. *et al.* (2017) 'Flow cytometry: basic principles and applications', *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), pp. 163–176. Available at: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>.

Aikawa, E. and Libby, P. (2017) 'A Rock and a Hard Place: Chiseling Away at the Multiple Mechanisms of Aortic Stenosis', *Circulation*, 135, pp. 1951–1955. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027776>.

Aikawa, E. and Otto, C.M. (2012) 'Look More Closely at the Valve', *Circulation*, 125(1), pp. 9–11. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.073452>.

Albert, M.A. *et al.* (2001) 'Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study', *JAMA*, 286(1), pp. 64–70. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.286.1.64>.

American Diabetes Association (2008) 'Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007', *Diabetes Care*, 31(3), pp. 596–615. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc08-9017>.

Asakura, T. and Karino, T. (1990) 'Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries.', *Circulation Research*, 66(4), pp. 1045–1066. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.66.4.1045>.

Aumüller, Gerhard, Aust, Gabriela and Doll, Andreas (2010) 'Duale Reihe Anatomie', in: Thieme, pp. 526–531.

Avakian, S. *et al.* (2001) 'Apolipoproteins AI, B, and E polymorphisms in severe aortic valve stenosis', *Clinical Genetics*, 60(5), pp. 381–384. Available at: <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2001.600511.x>.

Banovic, M., Athithan, L. and McCann, G.P. (2019) 'Aortic stenosis and diabetes mellitus: An ominous combination', *Diabetes and Vascular Disease Research*, 16(4), pp. 310–323. Available at: <https://doi.org/10.1177/1479164118820657>.

Baumgartner, H. *et al.* (2017) 'Recommendations on the Echocardiographic Assessment of Aortic Valve Stenosis: A Focused Update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography', *Journal of the American Society of Echocardiography*, 30(4), pp. 372–392. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.echo.2017.02.009>.

Baumgartner, H., (chair) *et al.* (2017) 'Recommendations on the echocardiographic assessment of aortic valve stenosis: a focused update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society

of Echocardiography', *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging*, 18(3), pp. 254–275. Available at: <https://doi.org/10.1093/ehjci/jew335>.

Beppu, S. *et al.* (1993) 'Rapidly of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves', *The American Journal of Cardiology*, 71(4), pp. 322–327. Available at: [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(93\)90799-1](https://doi.org/10.1016/0002-9149(93)90799-1).

Bergler-Klein, J. *et al.* (2004) 'Natriuretic Peptides Predict Symptom-Free Survival and Postoperative Outcome in Severe Aortic Stenosis', *Circulation*, 109(19), pp. 2302–2308. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000126825.50903.18>.

Bommer, C. *et al.* (2018) 'Global Economic Burden of Diabetes in Adults: Projections From 2015 to 2030', *Diabetes Care*, 41(5), pp. 963–970. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc17-1962>.

Bouchareb, R. *et al.* (2019) 'Activated platelets promote an osteogenic programme and the progression of calcific aortic valve stenosis', *European Heart Journal*, 40(17), pp. 1362–1373. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy696>.

Brown, M.S. *et al.* (1980) 'The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: Specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages', *Journal of Supramolecular Structure*, 13(1), pp. 67–81. Available at: <https://doi.org/10.1002/jss.400130107>.

Caira, F.C. *et al.* (2006) 'Human Degenerative Valve Disease Is Associated With Up-Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 Receptor-Mediated Bone Formation', *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8), pp. 1707–1712. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.02.040>.

Chan, K.L. *et al.* (2010) 'Effect of Lipid Lowering With Rosuvastatin on Progression of Aortic Stenosis', *Circulation*, 121(2), pp. 306–314. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.900027>.

Chen, H.Y., Engert, J.C. and Thanassoulis, G. (2019) 'Risk factors for valvular calcification', *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 26(2), pp. 96–102. Available at: <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000471>.

Cho, N.H. *et al.* (2018) 'IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 138, pp. 271–281. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>.

Choi, B. *et al.* (2017) 'Dipeptidyl Peptidase-4 Induces Aortic Valve Calcification by Inhibiting Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling in Valvular Interstitial Cells', *Circulation*, 135(20), pp. 1935–1950. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024270>.

- Coisne, A. *et al.* (2022) 'Diabetes mellitus and cardiovascular mortality across the spectrum of aortic stenosis', *Heart* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2022-320897>.
- Connolly, H.M. *et al.* (1997) 'Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis With Severe Left Ventricular Dysfunction', *Circulation*, 95(10), pp. 2395–2400. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.10.2395>.
- Coté, N. *et al.* (2013) 'Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease', *Inflammation*, 36(3), pp. 573–581. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9579-6>.
- Cowell, S.J. *et al.* (2005) 'A Randomized Trial of Intensive Lipid-Lowering Therapy in Calcific Aortic Stenosis', *New England Journal of Medicine*, 352(23), pp. 2389–2397. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043876>.
- Cueff, C. *et al.* (2011) 'Measurement of aortic valve calcification using multislice computed tomography: correlation with haemodynamic severity of aortic stenosis and clinical implication for patients with low ejection fraction', *Heart*, 97(9), pp. 721–726. Available at: <https://doi.org/10.1136/hrt.2010.198853>.
- Cui, L. *et al.* (2016) 'Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation', *Bone*, 87, pp. 147–158. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.04.007>.
- Danaei, G. *et al.* (2006) 'Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher-than-optimum blood glucose concentration: comparative risk assessment', *Lancet (London, England)*, 368(9548), pp. 1651–1659. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69700-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69700-6).
- Danaei, G. *et al.* (2011) 'National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants', *The Lancet*, 378(9785), pp. 31–40. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60679-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60679-X).
- Dass, C. and Kanmanthareddy, A. (2022) 'Rheumatic Heart Disease', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538286/> (Accessed: 30 May 2022).
- Dasu, M.R., Devaraj, S. and Jialal, I. (2007) 'High glucose induces IL-1 $\beta$  expression in human monocytes: mechanistic insights', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(1), pp. E337–E346. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00718.2006>.
- Davison, G.M. *et al.* (2017) 'Platelet, monocyte and neutrophil activation and glucose tolerance in South African Mixed Ancestry individuals', *Scientific Reports*, 7(1), p. 40329. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep40329>.

Donath, M.Y. and Shoelson, S.E. (2011) 'Type 2 diabetes as an inflammatory disease', *Nature Reviews Immunology*, 11(2), pp. 98–107. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2925>.

Donato, M. *et al.* (2020) 'Current Evidence and Future Perspectives on Pharmacological Treatment of Calcific Aortic Valve Stenosis', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), p. 8263. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21218263>.

Duan, P. and Bonewald, L. (2016) 'The Role of the Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway in Formation and Maintenance of Bone and Teeth', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 77(Pt A), pp. 23–29. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.015>.

Efe, T.H. *et al.* (2016) 'Calcific aortic stenosis and its correlation with a novel inflammatory marker, the lymphocyte/monocyte ratio', *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 35(11), pp. 573–578. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.repc.2016.06.008>.

Egan, K.P. *et al.* (2011) 'Role for Circulating Osteogenic Precursor (COP) Cells in Aortic Valvular Disease', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(12), pp. 2965–2971. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.234724>.

Eibl, N. *et al.* (2004) 'Improved metabolic control decreases platelet activation markers in patients with type-2 diabetes', *European Journal of Clinical Investigation*, 34(3), pp. 205–209. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01320.x>.

Elchinova, E. *et al.* (2018) 'Circulating monocyte subsets and heart failure prognosis', *PLOS ONE*, 13(9), p. e0204074. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204074>.

El-Hamamsy, I., Chester, A.H. and Yacoub, M.H. (2010) 'Cellular regulation of the structure and function of aortic valves', *Journal of Advanced Research*, 1(1), pp. 5–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.007>.

Eveborn, G.W. *et al.* (2013) 'The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. The Tromsø Study', *Heart*, 99(6), pp. 396–400. Available at: <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2012-302265>.

Everett, R.J. *et al.* (2018) 'Progression of Hypertrophy and Myocardial Fibrosis in Aortic Stenosis', *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 11(6), p. e007451. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.117.007451>.

Faggiano, P. *et al.* (2006) 'Epidemiology and cardiovascular risk factors of aortic stenosis', *Cardiovascular Ultrasound*, 4, p. 27. Available at: <https://doi.org/10.1186/1476-7120-4-27>.

Falcão-Pires, I. *et al.* (2011) 'Diabetes Mellitus Worsens Diastolic Left Ventricular Dysfunction in Aortic Stenosis Through Altered Myocardial Structure and Cardiomyocyte Stiffness', *Circulation*, 124(10), pp. 1151–1159. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025270>.

Freeman, R.V. and Otto, C.M. (2005) 'Spectrum of Calcific Aortic Valve Disease', *Circulation*, 111(24), pp. 3316–3326. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.486738>.

Galeone, A. *et al.* (2013) 'Aortic valvular interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand', *International Journal of Cardiology*, 169(4), pp. 296–304. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.09.012>.

Garg, V. *et al.* (2005) 'Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease', *Nature*, 437(7056), pp. 270–274. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03940>.

Goody, P.R. *et al.* (2020) 'Aortic Valve Stenosis', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(4), pp. 885–900. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313067>.

Gordon, S. and Taylor, P.R. (2005) 'Monocyte and macrophage heterogeneity', *Nature Reviews Immunology*, 5(12), pp. 953–964. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri1733>.

Grant, P.J. (2007) 'Diabetes mellitus as a prothrombotic condition', *Journal of Internal Medicine*, 262(2), pp. 157–172. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01824.x>.

Greve, A.M. *et al.* (2019) 'Relation of Lipid-Lowering Therapy to Need for Aortic Valve Replacement in Patients With Asymptomatic Mild to Moderate Aortic Stenosis', *American Journal of Cardiology*, 124(11), pp. 1736–1740. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2019.08.037>.

Guha, M. *et al.* (2000) 'Molecular Mechanisms of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Gene Expression in Monocytic Cells via Hyperglycemia-induced Oxidant Stress-dependent and -independent Pathways \*', *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), pp. 17728–17739. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.23.17728>.

Halkos, M.E. *et al.* (2010) 'The Effect of Diabetes Mellitus on In-Hospital and Long-Term Outcomes After Heart Valve Operations', *The Annals of Thoracic Surgery*, 90(1), pp. 124–130. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2010.03.111>.

Herold, Gerd (2016) 'Innere Medizin 2017', in. Dr. Gerd Herold, pp. 174–177.

Hewing, B. *et al.* (2017) 'Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes', *Journal of*



*Cardiovascular Translational Research*, 10(1), pp. 27–34. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12265-016-9726-9>.

Hwang, M.H. *et al.* (1989) 'Preoperative identification of patients likely to have left ventricular dysfunction after aortic valve replacement. Participants in the Veterans Administration Cooperative Study on Valvular Heart Disease', *Circulation*, 80(3 Pt 1), pp. 165–76.

Jacobs, E. *et al.* (2017) 'Healthcare costs of Type 2 diabetes in Germany', *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 34(6), pp. 855–861. Available at: <https://doi.org/10.1111/dme.13336>.

Jansen, F., Xiang, X. and Werner, N. (2017) 'Role and function of extracellular vesicles in calcific aortic valve disease', *European Heart Journal*, 38(36), pp. 2714–2716. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx477>.

Kaden, J.J. *et al.* (2003) 'Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis', *Atherosclerosis*, 170(2), pp. 205–211. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(03\)00284-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(03)00284-3).

Kaden, J.J. *et al.* (2004) 'Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(1), pp. 57–66. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2003.09.015>.

Kaden, J.J., Dempfle, C.-E., *et al.* (2005) 'Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis', *Cardiovascular Pathology*, 14(2), pp. 80–87. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.01.002>.

Kaden, J.J., Kiliç, R., *et al.* (2005) 'Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic valve myofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification', *International Journal of Molecular Medicine*, 16(5), pp. 869–872.

Kamalesh, M. *et al.* (2009) 'Does diabetes accelerate progression of calcific aortic stenosis?', *European Journal of Echocardiography*, 10(6), pp. 723–725. Available at: <https://doi.org/10.1093/ejechoard/jeq048>.

Kennedy, J.W., Doces, J. and Stewart, D.K. (1977) 'Left ventricular function before and following aortic valve replacement.', *Circulation*, 56(6), pp. 944–950. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.56.6.944>.

Khan, S. *et al.* (2022) 'Trends and Outcomes of Aortic Valve Replacement in Patients With Diabetes in the US', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, p. 844068. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.844068>.

Kim, K.M. (1976) 'Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media', *Federation Proceedings*, 35(2), pp. 156–162.

- Kindermann, I. *et al.* (2012) 'Update on Myocarditis', *Journal of the American College of Cardiology*, 59(9), pp. 779–792. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.09.074>.
- Kitahara, M. *et al.* (1980) 'Metabolic Activity of Diabetic Monocytes', *Diabetes*, 29(4), pp. 251–256. Available at: <https://doi.org/10.2337/diab.29.4.251>.
- Klein, R. (1995) 'Hyperglycemia and Microvascular and Macrovascular Disease in Diabetes', *Diabetes Care*, 18(2), pp. 258–268. Available at: <https://doi.org/10.2337/diacare.18.2.258>.
- Komura, T. *et al.* (2009) 'CD14+ Monocytes Are Vulnerable and Functionally Impaired Under Endoplasmic Reticulum Stress in Patients With Type 2 Diabetes', *Diabetes*, 59(3), pp. 634–643. Available at: <https://doi.org/10.2337/db09-0659>.
- Kopytek, M. *et al.* (2020) 'Accumulation of advanced glycation end products (AGEs) is associated with the severity of aortic stenosis in patients with concomitant type 2 diabetes', *Cardiovascular Diabetology*, 19(1), p. 92. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01068-7>.
- Kostyunin, A. *et al.* (2020) 'Ultrastructural Pathology of Atherosclerosis, Calcific Aortic Valve Disease, and Bioprosthetic Heart Valve Degeneration: Commonalities and Differences', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), p. 7434. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21207434>.
- Kovacic, J.C. *et al.* (2019) 'Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease', *Journal of the American College of Cardiology*, 73(2), pp. 190–209. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.09.089>.
- Krohn, J.B. *et al.* (2016) 'Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: expanding current paradigms', *The Journal of Physiology*, 594(11), pp. 2895–2903. Available at: <https://doi.org/10.1113/JP271338>.
- Kumar, N.P. *et al.* (2015) 'Profiling leucocyte subsets in tuberculosis–diabetes co-morbidity', *Immunology*, 146(2), pp. 243–250. Available at: <https://doi.org/10.1111/imm.12496>.
- Kuwana, M. *et al.* (2003) 'Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation', *Journal of Leukocyte Biology*, 74(5), pp. 833–845. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.0403170>.
- Larsson, S.C. *et al.* (2018) 'Type 1 and type 2 diabetes mellitus and incidence of seven cardiovascular diseases', *International Journal of Cardiology*, 262, pp. 66–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.03.099>.
- Lee, H.-M. *et al.* (2012) 'Upregulated NLRP3 Inflammasome Activation in Patients With Type 2 Diabetes', *Diabetes*, 62(1), pp. 194–204. Available at: <https://doi.org/10.2337/db12-0420>.

Leon, M.B. *et al.* (2010) 'Transcatheter Aortic-Valve Implantation for Aortic Stenosis in Patients Who Cannot Undergo Surgery', *New England Journal of Medicine*, 363(17), pp. 1597–1607. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008232>.

Levine, J.H. *et al.* (2015) 'Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis', *Cell*, 162(1), pp. 184–197. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.047>.

Li, S. *et al.* (2019) 'Diabetes Mellitus and Cause-Specific Mortality: A Population-Based Study', *Diabetes & Metabolism Journal*, 43(3), pp. 319–341. Available at: <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.0060>.

Lin, X. *et al.* (2020) 'Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025', *Scientific Reports*, 10(1), p. 14790. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71908-9>.

Liu, A.C., Joag, V.R. and Gotlieb, A.I. (2007) 'The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology', *The American Journal of Pathology*, 171(5), pp. 1407–1418. Available at: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070251>.

Liu, H.-F. *et al.* (2012) 'Altered Polarization, Morphology, and Impaired Innate Immunity Germane to Resident Peritoneal Macrophages in Mice with Long-Term Type 2 Diabetes', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, p. e867023. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/867023>.

Ljungberg, J. *et al.* (2017) 'Traditional Cardiovascular Risk Factors and Their Relation to Future Surgery for Valvular Heart Disease or Ascending Aortic Disease: A Case-Referent Study', *Journal of the American Heart Association*, 6(5), p. e005133. Available at: <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.005133>.

Lorusso, R. *et al.* (2012) 'Type 2 Diabetes Mellitus Is Associated With Faster Degeneration of Bioprosthetic Valve', *Circulation*, 125(4), pp. 604–614. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025064>.

Lund, O. and Larsen, K.E. (1989) 'Cardiac Pathology After Isolated Valve Replacement for Aortic Stenosis in Relation to Preoperative Patient Status: Early and Late Autopsy Findings', *Scandinavian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 23(3), pp. 263–270. Available at: <https://doi.org/10.3109/14017438909106006>.

Mathieu, P., Bouchareb, R. and Boulanger, M.-C. (2015) 'Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease', *Journal of Immunology Research*, 2015, p. e851945. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/851945>.

McCoy, C.M., Nicholas, D.Q. and Masters, K.S. (2012) 'Sex-Related Differences in Gene Expression by Porcine Aortic Valvular Interstitial Cells',

*PLOS ONE*, 7(7), p. e39980. Available at:  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039980>.

McInnes, L. and Healy, J. (2018) 'UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction'.

Michel-Behnke, I., Murin, P. and Sarikouch, S. (2020) 'DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE KARDIOLOGIE UND ANGEBORENE HERZFEHLER e.V. S2k-Leitlinie', p. 44.

Min, D. *et al.* (2012) 'Alterations in Monocyte CD16 in Association with Diabetes Complications', *Mediators of Inflammation*, 2012, p. e649083. Available at:  
<https://doi.org/10.1155/2012/649083>.

Mohler, E.R. *et al.* (1991) 'Development and progression of aortic valve stenosis: Atherosclerosis risk factors—a causal relationship? a clinical morphologic study', *Clinical Cardiology*, 14(12), pp. 995–999. Available at:  
<https://doi.org/10.1002/clc.4960141210>.

Mohler, E.R. *et al.* (1997) 'Detection of Osteopontin in Calcified Human Aortic Valves', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(3), pp. 547–552. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.3.547>.

Mohler, E.R. *et al.* (1999) 'Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves', *The Journal of heart valve disease*, 8(3), pp. 254–260.

Mohler, E.R. *et al.* (2001) 'Bone Formation and Inflammation in Cardiac Valves', *Circulation*, 103(11), pp. 1522–1528. Available at:  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.11.1522>.

Mokgalaboni, K. *et al.* (2020) 'Monocyte-mediated inflammation and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of pre-clinical and clinical studies', *JRSM Cardiovascular Disease*, 9, p. 2048004019900748. Available at:  
<https://doi.org/10.1177/2048004019900748>.

Moore, K.J., Sheedy, F.J. and Fisher, E.A. (2013) 'Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance', *Nature Reviews Immunology*, 13(10), pp. 709–721. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3520>.

Mosch, J. *et al.* (2017) 'Histopathological assessment of calcification and inflammation of calcific aortic valves from patients with and without diabetes mellitus', *Histology and histopathology*, 32(3), pp. 293–306. Available at:  
<https://doi.org/10.14670/HH-11-797>.

Mueller, K.A.L. *et al.* (2017) 'Histopathological and Immunological Characteristics of Tachycardia-Induced Cardiomyopathy', *Journal of the American College of Cardiology*, 69(17), pp. 2160–2172. Available at:  
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.02.049>.

Müller, K. *et al.* (2015) 'Platelets, inflammation and anti-inflammatory effects of antiplatelet drugs in ACS and CAD', *Thrombosis and Haemostasis*, 114(09), pp. 498–518. Available at: <https://doi.org/10.1160/TH14-11-0947>.

Natorska, J. *et al.* (2012) 'Does Diabetes Accelerate the Progression of Aortic Stenosis through Enhanced Inflammatory Response within Aortic valves?', *Inflammation*, 35(3), pp. 834–840. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10753-011-9384-7>.

Ngcobo, S.R. *et al.* (2022) 'Activated monocytes as a therapeutic target to attenuate vascular inflammation and lower cardiovascular disease-risk in patients with type 2 diabetes: A systematic review of preclinical and clinical studies', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, p. 112579. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112579>.

Nishimura, R.A. *et al.* (2014) '2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease', *Circulation*, 129(23), pp. e521–e643. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000031>.

Nkomo, V.T. *et al.* (2006) 'Burden of valvular heart diseases: a population-based study', *The Lancet*, 368(9540), pp. 1005–1011. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69208-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69208-8).

Nowakowska, M. *et al.* (2019) 'The comorbidity burden of type 2 diabetes mellitus: patterns, clusters and predictions from a large English primary care cohort', *BMC medicine*, 17(1), p. 145. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1373-y>.

O'Brien, K.D. *et al.* (1995) 'Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions', *Circulation*, 92(8), pp. 2163–2168. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.8.2163>.

Olsson, M., Thyberg, J. and Nilsson, J. (1999) 'Presence of Oxidized Low Density Lipoprotein in Nonrheumatic Stenotic Aortic Valves', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(5), pp. 1218–1222. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.5.1218>.

Otto, C.M. *et al.* (1994) 'Characterization of the early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies.', *Circulation*, 90(2), pp. 844–853. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.90.2.844>.

Otto, C.M. *et al.* (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(5), pp. e72–e227. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000923>.

- Pachulski, R.T. and Chan, K.L. (1993) 'Progression of aortic valve dysfunction in 51 adult patients with congenital bicuspid aortic valve: assessment and follow up by Doppler echocardiography.', *Heart*, 69(3), pp. 237–240. Available at: <https://doi.org/10.1136/hrt.69.3.237>.
- Pardali, E. *et al.* (2017) 'TGF- $\beta$ -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), p. 2157. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18102157>.
- Pawade, T. *et al.* (2018) 'Computed Tomography Aortic Valve Calcium Scoring in Patients With Aortic Stenosis', *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 11(3), p. e007146. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.117.007146>.
- Pawade, T.A. *et al.* (2021) 'Effect of Denosumab or Alendronic Acid on the Progression of Aortic Stenosis: A Double-Blind Randomized Controlled Trial', *Circulation*, 143(25), pp. 2418–2427. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.053708>.
- Peeters, F.E.C.M. *et al.* (2018) 'Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment', *European Heart Journal*, 39(28), pp. 2618–2624. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx653>.
- Petito, E. *et al.* (2018) 'A dichotomy in platelet activation: Evidence of different functional platelet responses to inflammatory versus haemostatic stimuli', *Thrombosis Research*, 172, pp. 110–118. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.10.019>.
- Pfister, R. *et al.* (2010) 'Utility of NT-pro-BNP in patients undergoing transapical aortic valve replacement', *Clinical Research in Cardiology*, 99(5), pp. 301–307. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00392-010-0118-x>.
- Phillips, D. *et al.* (1988) 'The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex', *Blood*, 71(4), pp. 831–843. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood.V71.4.831.831>.
- Pretorius, L. *et al.* (2018) 'Platelet activity and hypercoagulation in type 2 diabetes', *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), p. 141. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0783-z>.
- Proudfoot, D. *et al.* (2000) 'Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification In Vitro', *Circulation Research*, 87(11), pp. 1055–1062. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.11.1055>.
- Rafique, A.M. *et al.* (2009) 'Meta-Analysis of Prognostic Value of Stress Testing in Patients With Asymptomatic Severe Aortic Stenosis', *American Journal of Cardiology*, 104(7), pp. 972–977. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.05.044>.

Raghavan, S. *et al.* (2019) 'Diabetes Mellitus–Related All-Cause and Cardiovascular Mortality in a National Cohort of Adults', *Journal of the American Heart Association*, 8(4), p. e011295. Available at: <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011295>.

Rajamannan, N.M. *et al.* (2003) 'Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype', *Circulation*, 107(17), pp. 2181–2184. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000070591.21548.69>.

Rajamannan, N.M. *et al.* (2011) 'Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process A Review and Agenda for Research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group', *Circulation*, 124(16), pp. 1783–1791. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767>.

Rajamannan, N.M., Bonow, R.O. and Rahimtoola, S.H. (2007) 'Calcific aortic stenosis: an update', *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 4(5), pp. 254–262. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0827>.

Rathmann, W. *et al.* (2003) 'High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000', *Diabetologia*, 46(2), pp. 182–189. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-002-1025-0>.

Rezaie-Majd, A. *et al.* (2003) 'Simvastatin Reduces the Expression of Adhesion Molecules in Circulating Monocytes From Hypercholesterolemic Patients', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), pp. 397–403. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000059384.34874.F0>.

Ring, L. *et al.* (2021) 'Echocardiographic assessment of aortic stenosis: a practical guideline from the British Society of Echocardiography', *Echo Research and Practice*, 8(1), pp. G19–G59. Available at: <https://doi.org/10.1530/ERP-20-0035>.

Rogacev, K.S. *et al.* (2012) 'CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography', *Journal of the American College of Cardiology*, 60(16), pp. 1512–1520. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.07.019>.

van Rooy, M.-J. *et al.* (2015) 'Platelet hyperactivity and fibrin clot structure in transient ischemic attack individuals in the presence of metabolic syndrome: a microscopy and thromboelastography® study', *Cardiovascular Diabetology*, 14(1), p. 86. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0249-5>.

Rosenhek, R. *et al.* (2000) 'Predictors of Outcome in Severe, Asymptomatic Aortic Stenosis', *New England Journal of Medicine*, 343(9), pp. 611–617. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM200008313430903>.

Rosenhek, R. *et al.* (2004) 'Mild and moderate aortic stenosis: Natural history and risk stratification by echocardiography', *European Heart Journal*, 25(3), pp. 199–205. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2003.12.002>.

Rossebø, A.B. *et al.* (2008) 'Intensive Lipid Lowering with Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis', *New England Journal of Medicine*, 359(13), pp. 1343–1356. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804602>.

Rothe, G. *et al.* (1999) 'A more mature phenotype of blood mononuclear phagocytes is induced by fluvastatin treatment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease', *Atherosclerosis*, 144(1), pp. 251–261. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(99\)00061-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(99)00061-1).

Saboor, M. (2013) 'Comparison of Platelet CD Markers between Normal Individuals and Untreated Patients with Type 2 Diabetes Mellitus', *Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases*, 02(01). Available at: <https://doi.org/10.4172/2329-8790.1000123>.

Sakamoto, A. *et al.* (2019) 'Is there a role for activated platelets in progression of aortic valve calcification?', *European Heart Journal*, 40(17), pp. 1374–1377. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy775>.

Sartipy, P. and Loskutoff, D.J. (2003) 'Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), pp. 7265–7270. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1133870100>.

Sathyamurthy, I. *et al.* (2016) 'Risk factor profile of calcific aortic stenosis', *Indian Heart Journal*, 68(6), pp. 828–831. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2016.04.007>.

Scatena, M. *et al.* (2018) 'Increased Calcific Aortic Valve Disease in response to a diabetogenic, procalcific diet in the LDLr-/-ApoB100/100 mouse model', *Cardiovascular Pathology*, 34, pp. 28–37. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2018.02.002>.

Schneider, D.J. (2009) 'Factors Contributing to Increased Platelet Reactivity in People With Diabetes', *Diabetes Care*, 32(4), pp. 525–527. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc08-1865>.

Schünke, M., Schulte, E. and Schumacher, U. (2012) 'PROMETHEUS Innere Organe LernAtlas Anatomie', in: Thieme, pp. 98–101.

Schwarz, F. *et al.* (1982) 'The effect of aortic valve replacement on survival', *Circulation*, 66(5), pp. 1105–1110. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.66.5.1105>.

Seillier, G. *et al.* (2022) 'Impact of type II diabetes on LV remodeling and function in patient with severe aortic stenosis', *European Heart Journal -*



- Cardiovascular Imaging*, 23(Supplement\_1), p. jeab289.433. Available at: <https://doi.org/10.1093/ehjci/jeab289.433>.
- Sellers, S.L. *et al.* (2021) 'Platelets', *JACC: Basic to Translational Science*, 6(12), pp. 1007–1020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2021.07.008>.
- Shanmugam, N. *et al.* (2003) 'High Glucose-Induced Expression of Proinflammatory Cytokine and Chemokine Genes in Monocytic Cells', *Diabetes*, 52(5), pp. 1256–1264. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.5.1256>.
- Shen, L. *et al.* (2020) 'P-selectin (CD62P) and soluble TREM-like transcript-1 (sTLT-1) are associated with coronary artery disease: a case control study', *BMC Cardiovascular Disorders*, 20(1), p. 387. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01663-2>.
- Shimoni, S. *et al.* (2016) 'Circulating CD14+ monocytes in patients with aortic stenosis', *Journal of Geriatric Cardiology: JGC*, 13(1), pp. 81–87. Available at: <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2016.01.015>.
- Sievers, H.-H. and Schmidtke, C. (2007) 'A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens', *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 133(5), pp. 1226–1233. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.01.039>.
- Simmons, C.A. *et al.* (2005) 'Spatial Heterogeneity of Endothelial Phenotypes Correlates With Side-Specific Vulnerability to Calcification in Normal Porcine Aortic Valves', *Circulation Research*, 96(7), pp. 792–799. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000161998.92009.64>.
- Stella, J.A. and Sacks, M.S. (2007) 'On the Biaxial Mechanical Properties of the Layers of the Aortic Valve Leaflet', *Journal of Biomechanical Engineering*, 129(5), pp. 757–766. Available at: <https://doi.org/10.1115/1.2768111>.
- Stewart, B.F. *et al.* (1997) 'Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease', *Circulation*, 95(11), pp. 1203–1211. This study was supported in part by Contracts NO1-HC85079 through HC-850086 from the National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.', *Journal of the American College of Cardiology*, 29(3), pp. 630–634. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(96\)00563-3](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(96)00563-3).
- Stratton, I.M. (2000) 'Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study', *BMJ*, 321(7258), pp. 405–412. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.405>.
- Suda, R.K. *et al.* (2009) 'Circulating Osteogenic Precursor Cells in Heterotopic Bone Formation', *Stem Cells*, 27(9), pp. 2209–2219. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.150>.

Sweat, V. *et al.* (2008) 'C-Reactive Protein is Linked to Lower Cognitive Performance in Overweight and Obese Women', *Inflammation*, 31(3), pp. 198–207. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10753-008-9065-3>.

Tamayo, T. *et al.* (2016) 'The Prevalence and Incidence of Diabetes in Germany', *Deutsches Ärzteblatt International*, 113(11), pp. 177–182. Available at: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0177>.

Taniguchi, T. *et al.* (2022) 'Sudden Death in Patients With Severe Aortic Stenosis: Observations From the CURRENT AS Registry', *Journal of the American Heart Association*, 7(11), p. e008397. Available at: <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.008397>.

Taylor, P.M. *et al.* (2003) 'The cardiac valve interstitial cell', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(2), pp. 113–118. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00100-0).

Taylor, P.M., Allen, S.P. and Yacoub, M.H. (2000) 'Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin', *The Journal of Heart Valve Disease*, 9(1), pp. 150–158.

Théorêt, J.-F. *et al.* (2011) 'P-selectin ligation induces platelet activation and enhances microaggregate and thrombus formation', *Thrombosis Research*, 128(3), pp. 243–250. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.04.018>.

Thiem, K. *et al.* (2021) 'Hyperglycemic Memory of Innate Immune Cells Promotes In Vitro Proinflammatory Responses of Human Monocytes and Murine Macrophages', *The Journal of Immunology*, 206(4), pp. 807–813. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901348>.

Tolani, S. *et al.* (2013) 'Hypercholesterolemia and reduced HDL-C promote hematopoietic stem cell proliferation and monocytosis: Studies in mice and FH children', *Atherosclerosis*, 229(1), pp. 79–85. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.031>.

Tschoepe, D. *et al.* (1990) 'Evidence for abnormal platelet glycoprotein expression in diabetes mellitus', *European Journal of Clinical Investigation*, 20(2Part1), pp. 166–170. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1990.tb02264.x>.

Turina, J. *et al.* (1987) 'Spontaneous course of aortic valve disease', *European Heart Journal*, 8(5), pp. 471–483. Available at: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a062307>.

Vahanian, A. *et al.* (2021) '2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the

European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)', *European Heart Journal*, p. ehab395. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab395>.

Valtierra-Alvarado, M.A. *et al.* (2020) 'Type 2 diabetes mellitus metabolic control correlates with the phenotype of human monocytes and monocyte-derived macrophages', *Journal of Diabetes and its Complications*, 34(11), p. 107708. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2020.107708>.

Véricel, E. *et al.* (2004) 'Diabetic Patients Without Vascular Complications Display Enhanced Basal Platelet Activation and Decreased Antioxidant Status', *Diabetes*, 53(4), pp. 1046–1051. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.4.1046>.

Viney, N.J. *et al.* (2016) 'Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials', *The Lancet*, 388(10057), pp. 2239–2253. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31009-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31009-1).

Visser, M. *et al.* (1999) 'Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults', *JAMA*, 282(22), pp. 2131–2135. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.282.22.2131>.

Volpe, C.M.O. *et al.* (2018) 'Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications', *Cell Death & Disease*, 9(2), p. 119. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>.

Vos, T. *et al.* (2017) 'Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *The Lancet*, 390(10100), pp. 1211–1259. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2).

Ward, C. (2000) 'Clinical significance of the bicuspid aortic valve', *Heart*, 83(1), pp. 81–85. Available at: <https://doi.org/10.1136/heart.83.1.81>.

Wildgruber, M. *et al.* (2016) 'The "Intermediate" CD14++CD16+ monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans', *Scientific Reports*, 6(1), p. 39483. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep39483>.

Yadgir, S. *et al.* (2020) 'Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990–2017', *Circulation*, 141(21), pp. 1670–1680. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043391>.

Yan, A.T. *et al.* (2017) 'Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study', *Journal of the American College of Cardiology*, 69(12), pp. 1523–1532. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.01.025>.

Yngen, M. *et al.* (2006) 'Effects of improved metabolic control on platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus following coronary angioplasty', *Diabetes and Vascular Disease Research*, 3(1), pp. 52–56. Available at: <https://doi.org/10.3132/dvdr.2006.008>.

Zahran, A.M. *et al.* (2018) 'Platelet Activation and Platelet–Leukocyte Aggregates in Type I Diabetes Mellitus', *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 24(9 Suppl), pp. 230S-239S. Available at: <https://doi.org/10.1177/1076029618805861>.

Zamorano, J.L. and Goncalves, A. (2010) 'Exercise echocardiography in aortic stenosis: one more piece in the puzzle', *European Heart Journal*, 31(11), pp. 1295–1297. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq078>.

## 7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Frau PD Dr. Karin Müller durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau PD Dr. Karin Müller. Die Rekrutierung der Patienten wurde durch die Abteilung für Kardiologie und Angiologie des Universitätsklinikums Tübingen in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Herzchirurgie durchgeführt. Die Materialgewinnung erfolgte durch die Mitarbeiter beider Abteilungen. Die Asservierung des Aortenklappenmaterials in Formaldehyd-Lösung wurde durch Frau Sarah Gekeler (MTA) durchgeführt. An der Paraffineinbettung der hier analysierten Aortenklappen waren Herr Bo Li (PhD), Frau Sarah Gekeler (MTA), Frau Zeanub Khan (medizinische Doktorandin) und ich beteiligt. Die weiteren Schritte der histopathologischen Analyse der hier untersuchten Aortenklappen (Anfertigen von Schnitten, HE-Färbung und Immunhistochemie) sowie die Auswertung (Mikroskopie, Anfertigen von Bildern der Präparate, manuelles Auszählen von Zellen, manuelles Ausmessen der Flächen, Zuschneiden von Flächen im Bildbearbeitungsprogramm, Durchführung der Messung der gefärbten Fläche) wurden eigenständig von mir durchgeführt. Alle Schritte der Durchflusszytometrie (Probenvorbereitung, Färbung, alle Analyseschritte) wurden durch Frau Carolin Prang (naturwissenschaftliche Doktorandin) durchgeführt. Das Einpflegen aller gesammelter Daten in eine Excel- und eine SPSS-Tabelle wurde durch Frau Sophia Didra, Frau Carolin Prang, Frau Sarah Gekeler und mich durchgeführt. Die statistische Analyse aller hier untersuchten Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit und unter Anleitung von Frau PD Dr. Müller. Für die mit der OMIQ-Software erstellten Abbildungen von Durchflusszytometrie-Daten ist Frau Carolin Prang verantwortlich, alle anderen Abbildungen und Tabellen wurden von mir angefertigt.

## Danksagung

An vorrangiger Stelle möchte ich Frau PD Dr. Karin Müller für die Möglichkeit, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen, die freundliche Betreuung dieser Arbeit und die Unterstützung danken. Auch Frau Dr. Tatsiana Castor danke ich herzlich für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und konstruktive Kritik danken.

Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Müller und dem gesamten Labor Gawaz. Insbesondere möchte mich für die stete Hilfsbereitschaft und den lieben Austausch bei Sarah Gekeler und Carolin Prang bedanken. Ich danke auch Zeanub Khan, die mich auf die Arbeit erst aufmerksam gemacht und mich auf dem Weg der Promotion begleitet hat. Daneben danke ich den FVDA, die manch eine späte Stunde im Labor versüßt haben.

Ausdrücklicher Dank gilt meinen Freunden und Familie, die mir stets ein wichtiger Rückhalt sind.

Besonders möchte ich mich bei meinem Ehemann bedanken, der mir mit seiner Unterstützung in allen Lebenslagen ein Fels in der Brandung ist und insbesondere in den letzten Zügen dieser Arbeit mit seinem Rat und Verständnis eine große Hilfe war.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für Ihre bedingungslose Liebe, Zuversicht und unaufhörlichen Beistand in jedweder Form und Hinsicht. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

## Anhang

### Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Auswertung der CD3-Immunfärbung .....	I
Anhang 2: Auswertung der CD14-Immunfärbung .....	II
Anhang 3: Auswertung der CD16-Immunfärbung .....	IV
Anhang 4: Auswertung der CD68-Immunfärbung .....	V
Anhang 5: Auswertung der CD42b-Immunfärbung .....	VI
Anhang 6: Auswertung manuelles Gating - klassische Monozyten .....	VII
Anhang 7: Auswertung manuelles Gating - intermediäre Monozyten .....	IX
Anhang 8: Auswertung manuelles Gating - nicht-klassische Monozyten.....	XI
Anhang 9: Auswertung manuelles Gating - Thrombozyten.....	XII
Anhang 10: Auswertung manuelles Gating - Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate .	XIII

### Anhang 1: Auswertung der CD3-Immunfärbung

		Alle Patienten	nDMT2	DMT2	p-Wert
CD3		n=86	n=61	n=24	
<b>Ganze Klappe</b>	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	18.3 (4.3 - 49.1)	21.1 (6.6 - 47.4)	9.9 (1.4 - 46.5)	0.234
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	718.8 (519.9 - 1023.6)	639 (471.9 - 995.8)	901.3 (659.7 - 1128.3)	<b>0.043</b>
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2.6 (0.6 - 6.1)	3.5 (0.7 - 7.7)	1.3 (0.2 - 4.2)	<b>0.038</b>
<b>aortal</b>	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	9.9 (3.7 - 32)	14.1 (4.6 - 31.8)	7.6 (2.1 - 46.1)	0.284
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	541.4 (304.2 - 918.6)	489.3 (293.8 - 754.4)	708.1 (382.1 - 1101.1)	0.263
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2.7 (0.7 - 7.3)	3.2 (0.9 - 7.9)	1.1 (0.6 - 5.6)	0.119
<b>- a1</b>	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	10.6 (4.1 - 30.3)	14.5 (5 - 36.4)	4.9 (2.7 - 14.7)	<b>0.041</b>
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	528 (325.3 - 817.1)	501.1 (314.4 - 810)	554.4 (361.9 - 886.2)	0.463
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2.1 (0.8 - 6.9)	3 (0.9 - 7)	1 (0.4 - 3.3)	<b>0.031</b>
<b>- a2</b>	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	8 (3.3 - 31.3)	9.5 (3.3 - 37.2)	4.4 (3.5 - 13.5)	0.426
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	432.1(259.2 - 820.6)	431.1 (252.1 - 758.1)	499.8 (314.2 - 1109.4)	0.32
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2 (0.8 - 7.4)	2.3 (0.9 - 7.9)	1.3 (0.6 - 4.8)	0.179
<b>- a3</b>	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	8.8 (2.7 - 32.1)	11 (2.9 - 32.9)	3.9 (2.4 - 13.5)	0.207
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	558 (318.2 - 902.3)	557.1 (302.7 - 793)	563.4 (287.1 - 1126.2)	0.469
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2.2 (0.7 - 6.1)	2.5 (1.3 - 0.6)	1.1 (0.5 - 3.7)	0.056
<b>mittig</b>	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	12.4 (3.2 - 50.3)	14 (4.3 - 51.6)	11.6 (1.8 - 46.3)	0.492

	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	671 (385.9 - 1049.7)	545.1 (315.2 - 981.1)	820.1(623 - 1269.8)	<b>0.037</b>
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2.5 (0.5 - 7)	3 (0.6 - 9.8)	1 (0.4 - 4.1)	0.074
- m1	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	11.7(5.7 - 43.8)	12.2 (5.9 - 65.2)	8.8 (5.2 - 25.8)	0.47
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	653.6(411.3 - 1133.7)	603.6 (374 - 1098.1)	771 (577.3 - 1350.4)	0.316
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2.3 (0.8 - 5.5)	2.6 (0.9 - 7.9)	1.8 (0.6 - 3.6)	0.22
- m2	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	9.2 (4.7 - 47.1)	9.5 (4 - 58.2)	8.5 (4.8 - 38.9)	0.683
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	665.1(298.4 - 1095.8)	616.9 (271.7 - 938.4)	698.4 (536.8 - 1392.1)	0.065
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.8(0.8 - 8.2)	2.3 (0.9 - 9)	1.3 (0.6 - 3.2)	0.1
- m3	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	13.4 (4.4 - 42)	13.3 (4.4 - 47.2)	15.7 (4.1 - 29.4)	0.63
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	630.5 (365.4 - 945)	510.3 (312 - 811.7)	781.3 (468.6 - 1269.6)	0.094
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2.7 (0.9 - 8.5)	3.6 (1 - 9.4)	2.3 (0.6 - 4.8)	0.17
ventrikulär	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	17.8 (2.7 - 59.8)	18.3 (5.8 - 63.9)	6.7 (1.6 - 32.8)	0.153
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1015.1 (610.3 - 1449.3)	984.1 (589 - 1460.1)	1214.8 (712.8 - 1444.4)	0.43
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.6 (0.4 - 6)	2.4 (0.6 - 7)	1 (0.2 - 3.3)	0.055
- v1	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	14 (4.3 - 46.3)	15.5 (4.6 - 42.4)	10.3 (3.6 - 59.3)	0.418
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	981.6 (576.7 - 1410.1)	865.1 (553.5 - 1309.1)	1154.8 (811 - 1801.4)	0.156
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2.1 (0.6 - 5.1)	2.1 (0.7 - 5.1)	1.7 (0.4 - 4.5)	0.273
- v2	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	16.5 (5.7 - 56.9)	19.8 (7.9 - 57)	7.5 (3.8 - 34.7)	0.142
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1042 (607.5 - 1515.9)	1020.9 (592.3 - 1517)	1204.7 (801.8 - 1551)	0.396
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	2.2 (0.6 - 6.8)	2.8 (0.7 - 7.9)	0.9 (0.4 - 4.1)	0.078
- v3	CD3 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	9.2 (3.5 - 35.6)	13.3 (3.4 - 42.8)	6.2 (3 - 13.3)	0.159
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	988.5 (553.8 - 1507.5)	902 (553.2 - 1680.8)	1120.2 (581.6 - 1392.1)	0.593
	CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.2 (0.5 - 4)	1.5 (0.5 - 5)	0.8 (0.4 - 1.7)	0.079

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben.  
Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.

## Anhang 2: Auswertung der CD14-Immunfärbung

		Alle Patienten	nDMT2	DMT2	p-Wert
<b>CD14</b>		<b>n=87</b>	<b>n=61</b>	<b>n=25</b>	
<b>Ganze Klappe</b>	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	5.8 (2.4 - 16.8)	5.8 (2.5 - 18.5)	6.6 (1.8 - 15.9)	0.888
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	775.2 (438.8 - 1002.8)	775.2 (432 - 990.6)	792 (446.9 - 1033.4)	0.608
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1 (0.4 - 2)	1.1 (0.3 - 2)	0.9 (0.4 - 2.2)	0.875
<b>ortal</b>	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	4.7 (1.3 - 14.6)	4.6 (1.2 - 13.8)	9 (1.5 - 17)	0.603



	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	496.5 (286.5 - 775)	471.3 (279.6 - 744.7)	527.8 (284.7 - 895.8)	0.805
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.1 (0.3 - 2.9)	1.1 (0.3 - 2.9)	1.2 (0.4 - 3.5)	0.5
- a1	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	4.8 (2.2 - 14.3)	4.5 (2.2 - 14.2)	6.4 (2.2 - 19.1)	0.745
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	501.8 (236.6 - 772.8)	495.6 (234.3 - 791.3)	497.4 (240 - 697.4)	0.525
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.3 (0.5 - 3.9)	1 (0.5 - 3)	1.4 (0.7 - 5.7)	0.216
- a2	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	4.1 (2.3 - 15)	4.1 (2.3 - 14.3)	4.3 (2.6 - 16.2)	0.294
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	469.2 (273.1 - 766.3)	469 (251.7 - 775.9)	511.5 (322.1 - 886.6)	0.667
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.1 (0.5 - 2.5)	1.2 (0.4 - 2.5)	1 (0.5 - 2.4)	0.724
- a3	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	4.8 (2.4 - 17.3)	4.8 (2.3 - 19.7)	5 (2.9 - 16.5)	0.579
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	496.6 (292.2 - 919.5)	478.7 (282.3 - 857.7)	550.4 (304.9 - 1165.5)	0.588
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.1 (0.6 - 2.7)	1.1 (0.6 - 2.6)	1 (0.4 - 3.3)	0.435
mittig	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	6.5 (2.1 - 19.1)	6.6 (2 - 19)	5.6 (3.3 - 33.1)	0.857
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	633.5 (360.1 - 972.3)	592.2 (341.3 - 995.5)	763.4 (540.6 - 1019.2)	0.138
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.4 (0.5 - 2.9)	1.4 (0.5 - 3.2)	2.5 (0.5 - 2.4)	0.73
- m1	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	6.9 (3.6 - 21.7)	6.9 (3.6 - 25.7)	7.5 (4.1 - 13.6)	0.467
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	695.9 (337.7 - 1121.7)	596 (303.8 - 1018.5)	836.3 (523.7 - 1314.1)	0.106
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.7 (0.7 - 4.3)	1.7 (0.8 - 4.6)	1.4 (0.4 - 3.4)	0.448
- m2	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	6.2 (4.1 - 15.1)	6.1 (4 - 11.5)	8 (5.2 - 16.7)	0.251
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	621 (322.6 - 999.1)	471.3 (301 - 947.3)	716 (618.6 - 1242)	0.071
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.3 (0.6 - 3.6)	1.4 (0.6 - 3.7)	1.3 (0.6 - 3.8)	0.908
- m3	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	7.6 (3.6 - 19.5)	7.3 (3.6 - 20.2)	9.2 (4.1 - 23.3)	0.763
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	598.7 (318.3 - 951.6)	599.6 (345.4 - 1015.5)	598.7 (295.5 - 757.3)	0.465
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	1.8 (0.8 - 3.7)	1.6 (0.6 - 4.2)	1.9 (0.9 - 2.7)	0.57
ventrikulär	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	5.1 (1.5 - 20.7)	5.5 (1.5 - 21.7)	4.9 (1.2 - 16.2)	0.682
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1052.1 (611.1 - 1569.8)	1009.8 (624 - 1672.6)	1230.6 (502.7 - 1329.9)	0.53
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	0.6 (0.2 - 1.7)	0.7 (0.2 - 1.6)	0.5 (0.2 - 1.9)	0.971
- v1	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	5.3 (3.4 - 18.6)	5.1 (3 - 19.4)	5.6 (4.1 - 19)	0.36
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1081.2 (477.8 - 1700.8)	1004.5 (455.8 - 1660.9)	1262.3 (554 - 1739.9)	0.662
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	0.7 (0.4 - 2.2)	0.6 (0.4 - 1.9)	0.8 (0.3 - 3)	0.826
- v2	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	7.9 (3.8 - 20.1)	8.2 (3.9 - 21.8)	7.7 (2.7 - 19.5)	0.23
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1042.2 (587.6 - 1609.8)	1063 (592 - 1743)	1035.4 (426.7 - 1556)	0.505
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	0.8 (0.4 - 2.1)	0.8 (0.4 - 2.2)	0.8 (0.4 - 2)	0.712
- v3	CD14 <sup>+</sup> - Zellen/mm <sup>2</sup>	6.2 (3.1 - 15.4)	6.2 (3.1 - 19)	6 (3.1 - 11)	0.647
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	937.7 (571.2 - 1335.4)	958.7 (571.2 - 1423.7)	937.7 (550.3 - 1329.7)	0.519
	CD14 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	0.8 (0.3 - 1.9)	0.8 (0.3 - 2)	0.8 (0.4 - 1.6)	0.559

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben.  
Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.

### Anhang 3: Auswertung der CD16-Immunfärbung

		Alle Patienten	nDMT2	DMT2	p-Wert
CD16		n=85	n=60	n=24	
<b>Ganze Klappe</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	39.7 (10.3 - 100.8)	36.7 (13.1 - 104.4)	40.4 (6.4 - 105.7)	0.537
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	793.7 (491.4 - 1038.2)	740 (462.1 - 990.4)	875.7 (672.7 - 1105.1)	0.311
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	5.9 (2.2 - 11.7)	6.4 (2.8 - 10.7)	3.7 (0.8 - 11.8)	0.139
<b>aortal</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	22.8 (7 - 74.9)	31.1 (7.6 - 57.9)	17.6 (3.7 - 83)	0.51
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	541.7 (323.5 - 875.7)	554.3 (321.2 - 852.1)	581.5 (332.4 - 907.7)	0.642
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	4.9 (1.9 - 13.5)	5.7 (2 - 13.5)	3.6 (0.8 - 12)	0.241
- <b>a1</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	20.9 (5.9 - 78.3)	24 (5.8 - 80.5)	17.7 (5.8 - 89.2)	0.751
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	538.4 (329.1 - 948)	522 (305.7 - 994.7)	561.8 (392.4 - 860.3)	0.906
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	5.3 (1.1 - 13.8)	5.5 (1.1 - 13.9)	3.5 (1.1 - 12.4)	0.493
- <b>a2</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	18.1 (4.1 - 76.9)	18.7 (4.1 - 67.3)	15.6 (3.8 - 121.4)	0.776
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	573.1 (293.8 - 787.6)	510.8 (286.3 - 830)	625 (296.8 - 756.3)	0.929
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	3.7 (0.1 - 12.8)	3.7 (1 - 13.2)	3.4 (1.1 - 13.2)	0.876
- <b>a3</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	20.1 (5.2 - 61)	23.9 (4.9 - 63.8)	11.8 (5.3 - 37.2)	0.408
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	518.1 (308.4 - 848.5)	507 (318.1 - 768.1)	783.2 (310.2 - 1374.7)	0.156
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	4.6 (1.4 - 10.5)	5.4 (1.7 - 12.1)	2.2 (1.2 - 6.9)	0.067
<b>mittig</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	32.1 (5.1 - 101.8)	34.3 (5 - 137.7)	16.11 (4.9 - 95.2)	0.723
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	703.4 (406.9 - 1132.9)	661.4 (308.3 - 1177.7)	820.8 (568.1 - 1123.7)	0.33
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	5.8 (0.9 - 13.7)	4.8 (1.5 - 13.9)	4.4 (0.7 - 10.4)	0.482
- <b>m1</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	25.2 (6 - 103)	31.6 (5.9 - 109.6)	16.7 (7.5 - 105.3)	0.342
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	730.3 (395.8 - 1239.7)	671 (320.4 - 1264.1)	869 (517.5 - 1239.7)	0.239
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	4.5 (1.3 - 11.6)	5 (1.3 - 12)	3.8 (1.1 - 11.5)	0.405
- <b>m2</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	14.7 (5 - 91.8)	16.7 (4.6 - 95.6)	11.9 (5.1 - 35.2)	0.539
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	632.3 (363.4 - 1175.4)	588.5 (340 - 1234.9)	699.5 (516 - 1153.5)	0.604
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	3.4 (1.3 - 11.8)	3.7 (1.3 - 14)	2 (0.9 - 6.2)	0.173
- <b>m3</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	21.3 (6.2 - 122.4)	22.9 (5 - 152.9)	14.9 (8 - 101.4)	0.567
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	710.8 (349.3 - 1052.9)	746.4 (306.2 - 1105.7)	695.7 (513.2 - 1023.5)	0.761
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	4.4 (1.2 - 15.4)	4.8 (1.1 - 13.3)	4.3 (1.4 - 16.7)	0.59
<b>ventrikulär</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	48.6 (9.2 - 129.6)	49.9 (13.7 - 133)	36.3 (4 - 97)	0.33
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1060.3 (640.2 - 1499.6)	1031.8 (643.1 - 1484.9)	1131.1 (673.9 - 1515.2)	0.418
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	5.9 (0.9 - 11.1)	6.4 (1.7 - 11.2)	3.5 (0.3 - 10.5)	0.165
- <b>v1</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	36.8 (7 - 118.5)	37.5 (7.9 - 140)	23.3 (6.2 - 102.3)	0.787
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1096.8 (539.3 - 1746.3)	940.6 (515.7 - 1568.1)	1344.4 (630.3 - 2030.2)	0.392
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	4 (1 - 11.5)	3.2 (1.2 - 12.1)	3 (0.5 - 11.1)	0.57
- <b>v2</b>	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	53.9 (10.5 - 136.4)	53 (12.9 - 139.9)	37.9 (5.7 - 134.3)	0.57

	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1002.9 (714.1 - 1519.7)	999.3 (700 - 1594.5)	1133.5 (805.5 - 1463.2)	0.402
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	5 (1 - 12.9)	5.1 (1.4 - 12.4)	2.9 (0.7 - 12.1)	0.188
- v3	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	43.5 (7 - 130.5)	48.6 (9.5 - 133.1)	8 (5.5 - 56.8)	0.064
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1055.9 (588.1 - 1629)	1060.9 (581.1 - 1875.1)	1074.2 (804.1 - 1307.4)	0.485
	CD16 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	4.7 (0.8 - 10.1)	5.3 (1.1 - 10.1)	1 (0.7 - 8.2)	<b>0.035</b>

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben.  
Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.

#### Anhang 4: Auswertung der CD68-Immunfärbung

		<b>Ale Patienten</b>	<b>nDMT2</b>	<b>DMT2</b>	<b>P-Wert</b>
<b>CD68</b>		<b>n=88</b>	<b>n=62</b>	<b>n=25</b>	
<b>Ganze Klappe</b>	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	111.7 (50.6 - 188.3)	114.9 (50.9 - 188.8)	110 (46.9 - 202.3)	0.925
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	836.3 (552.1 - 1189)	802.1 (535.3 - 1168.1)	895.5 (646.9 - 1224.1)	0.41
	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	15.2 (8.3 - 21.9)	16.2 (9.1 - 22.7)	12.9 (6.5 - 21)	0.436
<b>aortal</b>	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	77.7 (30.8 - 184)	80.3 (29.8 - 182.6)	67.8 (36.8 - 245.4)	0.75
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	568.1 (327.2 - 947.7)	495.8 (323.1 - 931)	641.3 (379.1 - 1015.6)	0.652
	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	16.3 (7.5 - 26.9)	15.7 (9 - 24.1)	19.2 (6.3 - 32.2)	0.576
- <b>a1</b>	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	92.4 (32.6 - 179.6)	92.4 (32.1 - 174.2)	83.6 (34.3 - 241.8)	0.919
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	530.3 (370.8 - 974.9)	515.3 (344.3 - 967.6)	597 (403.5 - 1181.4)	0.688
	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	17 (7.2 - 31.4)	15.6 (7.2 - 29.2)	22.6 (6.4 - 34.4)	0.772
- <b>a2</b>	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	68 (20.2 - 163)	60.3 (19.8 - 163)	84.2 (28 - 175.7)	0.853
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	489.9 (290 - 891.9)	454.9 (267.2 - 891.9)	532.3 (476.7 - 939.2)	0.48
	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	14.7 (6.2 - 26.5)	14.8 (5.7 - 24.7)	11.6 (6.6 - 36.2)	0.737
- <b>a3</b>	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	64.2 (23.3 - 170.4)	62.4 (22.3 - 161.8)	71.6 (34.7 - 224.4)	0.483
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	610.3 (377.5 - 918.9)	571.5 (308.6 - 891)	733.8 (403.8 - 1170.4)	0.329
	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	13.6 (5.6 - 28.2)	14.8 (5.6 - 28.2)	11 (7.7 - 33.8)	0.731
<b>mittig</b>	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	108 (36.4 - 212.7)	133.4 (35.2 - 223.8)	98.5 (35.2 - 195.9)	0.987
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	768.1 (439.5 - 1218.7)	723.6 (396.2 - 1277.8)	836.8 (643.8 - 1173.4)	0.48
	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	15.8 (6.7 - 26.7)	15.5 (6.7 - 27.8)	17.2 (6.6 - 24.9)	0.848
- <b>m1</b>	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	85.5 (23.9 - 253.6)	85.5 (18.9 - 251)	76.2 (39.5 - 292.5)	0.672
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	769.2 (454.9 - 1267.6)	688.4 (411.5 - 1242.7)	1022.6 (698.3 - 1321.2)	0.316
	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	12.8 (4.8 - 27)	12.2 (3.9 - 25.8)	13.9 (5.9 - 28)	0.686
- <b>m2</b>	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup>	80.6 (19 - 235.8)	82.2 (19.3 - 230.2)	128.3 (11.9 - 347.2)	0.95
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	711.8 (433.1 - 1118.2)	629.1 (428.2 - 1251.7)	807.4 (439.5 - 1039.3)	0.607
	CD68 <sup>+</sup> -Zellen/ Gesamtzellzahl	16.7 (3.3 - 28)	15.8 (3.6 - 27.7)	12.6 (2.6 - 33)	0.774

- m3	CD68*-Zellen/mm <sup>2</sup>	84.4 (27.8 - 232.6)	84.4 (28.4 - 251.3)	82.7 (22 - 175.6)	0.95
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	667.7 (375.7 - 1219.4)	762.5 (377.8 - 1277.3)	577.7 (326.5 - 1168.9)	0.601
	CD68*-Zellen/ Gesamtzellzahl	14.7 (4.3 - 28.7)	16 (0.4 - 28.6)	10 (4.1 - 19.7)	0.659
ventrikulär	CD68*-Zellen/mm <sup>2</sup>	108.1 (53.4 - 193.6)	105.7 (55.5 - 193.7)	128.2 (41.7 - 214.2)	0.925
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1167.2 (675.5 - 1729.6)	1100.6 (658.7 - 1703.1)	1309 (789.2 - 2046)	0.41
	CD68*-Zellen/ Gesamtzellzahl	11.3 (6 - 17.4)	13.2 (6 - 17.8)	9 (5.5 - 15)	0.436
- v1	CD68*-Zellen/mm <sup>2</sup>	102.7 (32.7 - 211.8)	102.7 (32.4 - 199.5)	86.9 (33.2 - 256.3)	0.787
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1096.5 (666.1 - 1739.7)	1081.4 (662.2 - 1655.7)	1446.8 (690.3 - 2050)	0.602
	CD68*-Zellen/ Gesamtzellzahl	9.9 (3.8 - 16.2)	8.7 (3.5 - 16)	10.2 (3.2 - 20.1)	0.638
- v2	CD68*-Zellen/mm <sup>2</sup>	121.8 (38.2 - 218.2)	132.8 (42.1 - 216.1)	76.2 (24.6 - 215)	0.467
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1085.2 (692.4 - 1749.5)	1035.4 (680.7 - 1671.3)	1131.1 (679 - 2025.2)	0.891
	CD68*-Zellen/ Gesamtzellzahl	10.3 (4.6 - 19.9)	11.8 (5.1 - 19.6)	8.7 (4 - 20)	0.343
- v3	CD68*-Zellen/mm <sup>2</sup>	106.2 (37.6 - 195.4)	107.3 (32.6 - 209.4)	106.3 (39 - 173)	0.733
	Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	1185.6 (646.2 - 1691.4)	1089.8 (631 - 1780)	1276 (730 - 1654.3)	0.396
	CD68*-Zellen/ Gesamtzellzahl	10.5 (4.2 - 18.4)	12.3 (4 - 21)	7.6 (4.3 - 12.3)	0.231

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben.  
Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.

#### Anhang 5: Auswertung der CD42b-Immunfärbung

		Alle Patienten	nDMT2	DMT2	p-Wert
<b>CD42b</b>		<b>n=88</b>	<b>n=62</b>	<b>n=25</b>	
<b>Gesamte Klappe</b>	CD42b*-Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.3 (0.1 - 0.5)	0.3 (0.1 - 0.5)	0.2 (0.08 - 0.4)	0.111
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	1.6 (1.3 - 1.8)	1.6 (1.2 - 1.8)	1.6 (1.3 - 1.8)	0.28
	CD42b*-Fläche/Gesamte Fläche (%)	20.1 (8.1 - 35)	22.6 (9.6 - 36.9)	12.2 (4.8 - 28.3)	0.176
<b>aortal</b>	CD42b*-Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.1 (0.03 - 0.2)	0.1 (0.03 - 0.2)	0.1 (0.03 - 0.3)	0.798
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.7 (0.5 - 0.8)	0.7 (0.5 - 0.8)	0.7 (0.6 - 0.7)	0.95
	CD42b*-Fläche/Gesamte Fläche (%)	21.2 (6.3 - 37.7)	23 (6.8 - 35.5)	16.7 (4.6 - 49.8)	0.95
- a1	CD42b*-Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.03 (0.009 - 0.09)	0.05 (0.01 - 0.09)	0.02 (0.008 - 0.1)	0.669
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.2 (0.2 - 0.3)	0.2 (0.2 - 0.3)	0.2 (0.2 - 0.3)	0.48
	CD42b*-Fläche/Gesamte Fläche (%)	21.5 (5 - 44.8)	23.3 (5.4 - 44.6)	10.2 (3.6 - 47.9)	0.664
- a2	CD42b*-Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.05 (0.008 - 0.9)	0.05 (0.008 - 0.09)	0.03 (0.008 - 0.9)	0.864
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.2 (0.2 - 0.3)	0.2 (0.2 - 0.3)	0.2 (0.2 - 0.3)	0.295
	CD42b*-Fläche/Gesamte Fläche (%)	20.2 (4.3 - 46.1)	20.4 (4.6 - 45.7)	13 (3.6 - 48.3)	0.941

- a3	CD42b <sup>+</sup> -Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.04 (0.01 - 0.8)	0.04 (0.02 - 0.08)	0.04 (0.004 - 0.09)	0.869
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.2 (0.2 - 0.3)	0.2 (0.2 - 0.3)	0.2 (0.2 - 0.3)	0.176
	CD42b <sup>+</sup> -Fläche/Gesamte Fläche (%)	16.7 (6.1 - 37.1)	15.7 (7.3 - 37.8)	20 (16.6 - 43.2)	0.997
Mittig	CD42b <sup>+</sup> -Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.07 (0.02 - 0.2)	0.08 (0.02 - 0.2)	0.04 (0.02 - 0.1)	0.27
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.4 (0.3 - 0.6)	0.4 (0.3 - 0.6)	0.4 (0.3 - 0.6)	0.363
	CD42b <sup>+</sup> -Fläche/Gesamte Fläche (%)	17.3 (5.1 - 33.1)	21 (5.6 - 32.2)	12.7 (3 - 39.2)	0.938
- m1	CD42b <sup>+</sup> -Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.02 (0.006 - 0.05)	0.02 (0.006 - 0.05)	0.02 (0.004 - 0.04)	0.389
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.1 (0.09 - 0.2)	0.1 (0.08 - 0.2)	0.2 (0.1 - 0.3)	0.081
	CD42b <sup>+</sup> -Fläche/Gesamte Fläche (%)	16.8 (5 - 38.3)	18.2 (6.4 - 38.3)	14.8 (2.7 - 39.6)	0.54
- m2	CD42b <sup>+</sup> -Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.02 (0.005 - 0.05)	0.02 (0.006 - 0.05)	0.01 (0.002 - 0.04)	0.368
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.1 (0.1 - 0.2)	0.1 (0.1 - 0.2)	0.1 (0.1 - 0.2)	0.339
	CD42b <sup>+</sup> -Fläche/Gesamte Fläche (%)	15.4 (2.7 - 29.2)	15.4 (2.9 - 29.4)	14.3 (1.5 - 33.8)	0.682
- m3	CD42b <sup>+</sup> -Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.02 (0.003 - 0.06)	0.02 (0.004 - 0.06)	0.02 (0.002 - 0.04)	0.519
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.136 (0.09 - 0.2)	0.1 (0.09 - 0.2)	0.1 (0.08 - 0.2)	0.305
	CD42b <sup>+</sup> -Fläche/Gesamte Fläche (%)	16.7 (2.5 - 38.4)	17.3 (3.1 - 38.7)	9.6 (1.1 - 40.3)	0.938
ventrikulär	CD42b <sup>+</sup> -Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.1 (0.05 - 0.2)	0.1 (0.06 - 0.2)	0.06 (0.02 - 0.2)	0.053
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.3 (0.1 - 0.5)	0.3 (0.14 - 0.5)	0.1 (0.04 - 0.4)	0.454
	CD42b <sup>+</sup> -Fläche/Gesamte Fläche (%)	28 (10.2 - 51.6)	29.1 (13.8 - 52.9)	12.7 (0.4 - 41.3)	0.105
- v1	CD42b <sup>+</sup> -Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.05 (0.008 - 0.08)	0.05 (0.02 - 0.08)	0.01 (0.004 - 0.07)	0.14
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.2 (0.1 - 0.2)	0.2 (0.1 - 0.21)	0.2 (0.1 - 0.2)	0.577
	CD42b <sup>+</sup> -Fläche/Gesamte Fläche (%)	26 (5.6 - 57.9)	33.3 (11.2 - 61.8)	5.9 (2 - 48.1)	0.092
- v2	CD42b <sup>+</sup> -Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.03 (0.01 - 0.06)	0.04 (0.01 - 0.06)	0.02 (0.003 - 0.05)	0.075
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.2 (0.1 - 0.2)	0.1 (0.09 - 0.2)	0.2 (0.1 - 0.3)	0.199
	CD42b <sup>+</sup> -Fläche/Gesamte Fläche (%)	24.1 (6.6 - 49.7)	25.5 (7.5 - 54.1)	9 (1.8 - 36.8)	0.125
- v3	CD42b <sup>+</sup> -Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.04 (0.01 - 0.07)	0.04 (0.02 - 0.07)	0.02 (0.004 - 0.06)	0.098
	Gesamte Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.1 (0.09 - 0.2)	0.1 (0.1 - 0.2)	0.1 (0.09 - 0.2)	0.524
	CD42b <sup>+</sup> -Fläche/Gesamte Fläche (%)	28.7 (8.9 - 56.3)	34.7 (14.8 - 57.7)	12.7 (3 - 56.3)	0.186

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben.  
Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.

## Anhang 6: Auswertung manuelles Gating - klassische Monozyten

	Alle Patienten	nDMT2	DMT2	p-Wert
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	n=292	n=218	n=74	

<b>CD14</b>	Anteil (lebend) (%)	6.2 (4.5 - 7.6)	6.3 (4.8 - 7.8)	5.5 (3.7 - 6.9)	<b>0.003</b>
	Median Zellzahl	32x10 <sup>6</sup> (22x10 <sup>6</sup> - 41x10 <sup>6</sup> )	32x10 <sup>6</sup> (24x10 <sup>6</sup> - 41x10 <sup>6</sup> )	32x10 <sup>6</sup> (19x10 <sup>6</sup> - 42x10 <sup>6</sup> )	0.591
<b>HLA-DR</b>	Anteil (lebend) (%)	5.9 (4.5 - 7.3)	6.1 (4.7 - 7.7)	5.3 (4 - 6.4)	<b>0.001</b>
	Median Zellzahl	6146 (4507 - 8148.5)	6260 (4761 - 8171)	5486 (4105.5 - 8058.5)	0.084
<b>CD40</b>	Anteil (lebend) (%)	3.5 (1.5 - 5.4)	3.9 (1.5 - 5.6)	3 (1.4 - 5.1)	0.14
	Median Zellzahl	1045 (899 - 1318)	1036 (894.5 - 1310.5)	1055 (923.3 - 1360.6)	0.353
<b>CD80</b>	Anteil (lebend) (%)	2.1 (0.9 - 3.3)	2.2 (1.1 - 3.5)	1.6 (0.6 - 2.9)	<b>0.003</b>
	Median Zellzahl	1722 (1627.8 - 1867)	1728 (1634.5 - 1874)	1720 (1618 - 1856.5)	0.416
<b>CD11a</b>	Anteil (lebend) (%)	5.9 (4.6 - 7.3)	6.1 (4.7 - 7.7)	5.3 (4 - 6.4)	<b>0.001</b>
	Median Zellzahl	14217 (11560 - 21796.3)	14006 (11481 - 21110)	14283 (1287.5 - 22040)	0.678
<b>CD11b</b>	Anteil (lebend) (%)	6.1 (4.5 - 7.5)	6.2 (4.7 - 7.8)	5.4 (3.7 - 6.9)	<b>0.002</b>
	Median Zellzahl	23791 (19019.8 - 29044.5)	23594 (18853 - 28648.5)	24919 (19346.5 - 30854)	0.244
<b>CD49a</b>	Anteil (lebend) (%)	2.2 (1.2 - 3.3)	2.4 (1.2 - 3.5)	1.7 (1 - 2.8)	<b>0.033</b>
	Median Zellzahl	696 (648.3 - 759)	694 (649 - 756.8)	697.5 (638 - 776)	0.876
<b>CD54</b>	Anteil (lebend) (%)	5.9 (4.6 - 7.3)	6.1 (4.7 - 7.7)	5.4 (4 - 6.4)	<b>0.001</b>
	Median Zellzahl	10041.5 (8180.3 - 12538.8)	9751 (7965.3 - 12025)	10995 (8819.3 - 13740)	<b>0.003</b>
<b>CD62L</b>	Anteil (lebend) (%)	2.2 (1.4 - 3.4)	2.3 (1.5 - 3.6)	1.8 (1.1 - 3)	<b>0.017</b>
	Median Zellzahl	1216 (973.5 - 1574.3)	1232 (971.8 - 1604.8)	1173 (976.8 - 1517.8)	0.581
<b>CD106</b>	Anteil (lebend) (%)	3.4 (1.7 - 5.3)	3.6 (1.9 - 5.4)	3.1 (1.3 - 5.3)	0.222
	Median Zellzahl	1292 (1152 - 1564)	1292 (1156 - 1561)	1292.5 (1146.5 - 1573.8)	0.881
<b>CCR2</b>	Anteil (lebend) (%)	5.8 (4.5 - 7.3)	6.1 (4.7 - 7.7)	5.2 (3.9 - 6.4)	<b>&lt;0.001</b>
	Median Zellzahl	52214.5 (42857 - 61530)	52024 (43273 - 61268.5)	54218 (37847.5 - 82627)	0.863
<b>CCR7</b>	Anteil (lebend) (%)	4.7 (3.2 - 6.6)	5 (3.4 - 6.6)	4.3 (3 - 6)	0.076
	Median Zellzahl	3299 (2467.3 - 4623)	3299 (2437.8 - 4616.3)	3299.5 (2491.3 - 5136)	0.439
<b>CXCR4</b>	Anteil (lebend) (%)	6 (4.1 - 7.3)	6.2 (4.6 - 7.5)	5.1 (3.4 - 6.9)	<b>0.003</b>
	Median Zellzahl	5774.5 (4340.8 - 12332.8)	5774.5 (4290 - 12889.5)	5850.5 (4416 - 10063.5)	0.78
<b>CXCR7</b>	Anteil (lebend) (%)	6.1 (4.4 - 7.5)	6.3 (4.3 - 7.8)	5.4 (3.7 - 6.8)	<b>0.003</b>

	Median Zellzahl	6609 (4038 - 10029.8)	6595 (4050.8 - 10225.8)	6881.5 (3922 - 9795.3)	0.938
<b>CX<sub>3</sub>CR1</b>	Anteil (lebend) (%)	5.9 (4.6 - 7.3)	6.1 (4.7 - 7.7)	5.2 (4 - 6.4)	<b>&lt;0.001</b>
	Median Zellzahl	16574 (13403.5 - 20460)	16613 (13380.3 - 20985.8)	16307 (13670 - 20256)	0.843
<b>CXCL12</b>	Anteil (lebend) (%)	4.8 (3.1 - 6.5)	5.1 (3.2 - 6.9)	4.2 (2.7 - 5.9)	<b>0.041</b>
	Median Zellzahl	1984 (1527.5 - 3174.5)	1989.5 (1531.5 - 3192)	1950 (1519.8 - 3130.8)	0.885
<b>CXCL14</b>	Anteil (lebend) (%)	6 (4.4 - 7.5)	6.2 (4.6 - 7.7)	5.4 (3.5 - 6.7)	<b>0.006</b>
	Median Zellzahl	2485 (1924 - 3040)	2495 (1890 - 3046)	2476 (1955.5-3013)	0.978
<b>MIF</b>	Anteil (lebend) (%)	6.1 (4.5 - 7.6)	6.3 (4.7 - 7.8)	5.5 (3.7 - 6.9)	<b>0.004</b>
	Median Zellzahl	12611 (10294 - 17035)	12539 (10150.3 - 16691)	12815.5 (10542.3 - 17925)	0.568

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben.  
Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.

#### Anhang 7: Auswertung manuelles Gating - intermediäre Monozyten

		Alle Patienten	nDMT2	DMT2	p-Wert
<b>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup></b>		n=292	n=218	n=74	
<b>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup></b>	Anteil (lebend) (%)	0.9 (0.6-1.3)	1 (0.6-1.4)	0.9 (0.6-1.2)	0.331
	Median Zellzahl	5x10 <sup>6</sup> (3x10 <sup>6</sup> - 7x10 <sup>6</sup> )	5x10 <sup>6</sup> (3x10 <sup>6</sup> - 7x10 <sup>6</sup> )	5x10 <sup>6</sup> (3x10 <sup>6</sup> - 7x10 <sup>6</sup> )	0.89
<b>HLA-DR</b>	Anteil (lebend) (%)	0.7 (0.5 – 1.1)	0.7 (0.5 – 1.1)	0.6 (0.3 – 0.9)	<b>0.012</b>
	Median Zellzahl	35464 (27085 – 43430.5)	35421 (27020.8 – 44467)	35850 (27069 – 43090.3)	0.662
<b>CD40</b>	Anteil (lebend) (%)	0.6 (0.4 – 1)	0.7 (0.4 – 1)	0.5 (0.3 – 0.9)	<b>0.037</b>
	Median Zellzahl	1942.5 (1405.5 – 2821)	1915 (1383.3 – 2741.8)	2032.5 (1597 – 3061)	0.192
<b>CD80</b>	Anteil (lebend) (%)	0.03 (0.004 – 0.2)	0.03 (0.004 – 0.2)	0.04 (0.003 – 0.1)	0.781
	Median Zellzahl	5114 (4924 – 5550)	5125 (4924 – 5530)	5093 (4913 – 5574)	0.895
<b>CD11a</b>	Anteil (lebend) (%)	0.7 (0.5 – 1.1)	0.7 (0.5 – 1.2)	0.6 (0.3 – 0.9)	<b>0.012</b>
	Median Zellzahl	18200 (15171 – 27004.8)	18115.5 (115056.5 – 27004.5)	18415.5 (15357 – 27053.3)	0.906

<b>CD11b</b>	Anteil (lebend) (%)	0.9 (0.6-1.3)	1 (0.6-1.4)	0.8 (0.6 - 1.2)	0.26
	Median Zellzahl	20351 (16022.8-24551.5)	20113.5 (15948.5-23960.5)	20617 (16060-28802.8)	0.255
<b>CD49a</b>	Anteil (lebend) (%)	0.4 (0.1 – 0.7)	0.4 (0.1 – 0.7)	0.3 (0.07 – 0.6)	<b>0.019</b>
	Median Zellzahl	839 (679 – 1204)	842 (681.5 – 1197)	820.5 (648.8 – 1246)	0.421
<b>CD54</b>	Anteil (lebend) (%)	0.7 (0.5 – 1.1)	0.7 (0.5 – 1.2)	0.6 (0.3 – 0.9)	<b>0.013</b>
	Median Zellzahl	18941 (15285.8 – 24435.5)	18480 (15108.8 – 23650.3)	21742.5 (16936.3 – 26716)	<b>0.01</b>
<b>CD62L</b>	Anteil (lebend) (%)	0.3 (0.1-0.6)	0.3 (0.1-0.6)	0.2 (0.1-0.5)	0.218
	Median Zellzahl	953 (863.3-1109.5)	952 (868-1108)	964 (840.5-1110.5)	0.628
<b>CD106</b>	Anteil (lebend) (%)	0.5 (0.3 – 0.8)	0.5 (0.3 – 0.9)	0.4 (0.2 – 0.7)	<b>0.049</b>
	Median Zellzahl	1664 (1290 – 2179)	1664 (1290 – 2177)	1662.5 (1274.5 – 2187.3)	0.961
<b>CCR2</b>	Anteil (lebend) (%)	0.6 (0.4 – 1)	0.7 (0.4 – 1.1)	0.5 (0.3 – 0.9)	<b>0.007</b>
	Median Zellzahl	26041 (16163.5 – 48021.8)	27739.5 (16710.5 – 49619.3)	20399.5 (15241.5-34545)	0.054
<b>CCR7</b>	Anteil (lebend) (%)	0.7 (0.4 - 1.1)	0.8 (0.4 - 1.2)	0.7 (0.4 + 1.1)	0.512
	Median Zellzahl	3430.5 (2649-4758.5)	3430.5 (2687.5-4751)	3407.5 (2576-5044.3)	0.687
<b>CXCR4</b>	Anteil (lebend) (%)	0.9 (0.5-1.3)	0.9 (0.5-1.3)	0.8 (0.5-1.1)	0.244
	Median Zellzahl	6659.5 (4391.3-13916)	6710.5 (4404.8-14925.8)	6280.5 (4191.3-10805.5)	0.666
<b>CXCR7</b>	Anteil (lebend) (%)	0.9 (0.6-1.3)	0.9 (0.5-1.3)	0.8 (0.6-1.2)	0.396
	Median Zellzahl	8290 (4577.5-11507.8)	8145.5 (4572.8-11990)	8639 (4558.8-11108)	0.682
<b>CX<sub>3</sub>CR1</b>	Anteil (lebend) (%)	0.7 (0.5 – 1.1)	0.7 (0.5 – 1.1)	0.6 (0.3 – 0.9)	<b>0.009</b>
	Median Zellzahl	27475.5 (21022.5 – 34228.5)	27312.5 (20886.5 – 34085)	27973.5 (21197.5 – 37215.5)	0.433
<b>CXCL12</b>	Anteil (lebend) (%)	0.7 (0.4-1.1)	0.7 (0.4-1.1)	0.7 (0.5-1.1)	0.709
	Median Zellzahl	2174.5 (1623.3-3330.3)	2174.5 (1636.8-3311.8)	2132.5 (1561.3-3345)	0.911
<b>CXCL14</b>	Anteil (lebend) (%)	0.9 (0.5-1.3)	0.9 (0.5-1.3)	0.8 (0.5-1.2)	0.35
	Median Zellzahl	2085 (1639-2634)	2083.5 (1599.3-2624)	2089 (1668.5-2653.3)	0.848
<b>MIF</b>	Anteil (lebend) (%)	0.9 (0.6-1.3)	1 (0.5-1.4)	0.8 (0.6-1.2)	0.392
	Median Zellzahl	12919 (10346.8-17336.8)	12889 (17185.3)	13008.5 (10883-17846)	0.602

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben. Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.



## Anhang 8: Auswertung manuelles Gating - nicht-klassische Monozyten

		Alle Patienten	nDMT2	DMT2	p-Wert
<b>CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup></b>		<b>n=292</b>	<b>n=218</b>	<b>n=74</b>	
	Anteil (lebend) (%)	0.5 (0.3-0.8)	0.5 (0.3-0.8)	0.5 (0.3-0.9)	0.582
	Median Zellzahl	3x10 <sup>6</sup> (1x10 <sup>6</sup> - 4x10 <sup>6</sup> )	3x10 <sup>6</sup> (1x10 <sup>6</sup> - 4x10 <sup>6</sup> )	3x10 <sup>6</sup> (2x10 <sup>6</sup> - 5x10 <sup>6</sup> )	0.146
<b>HLA-DR</b>	Anteil (lebend) (%)	0.5 (0.3 – 0.8)	0.5 (0.3 – 0.8)	0.5 (0.3 – 0.9)	0.623
	Median Zellzahl	13669 (9587.8 – 20184)	14217 (9636.5 – 21122.5)	12625.5 (8779.5 – 17532)	0.06
<b>CD40</b>	Anteil (lebend) (%)	0.4 (0.2 – 0.6)	0.4 (0.2 – 0.6)	0.3 (0.2 – 0.7)	0.926
	Median Zellzahl	1506 (1059 – 2114)	1452 (1038 – 2112)	1681.5 (1126.8 – 2175)	0.267
<b>CD80</b>	Anteil (lebend) (%)	0.03 (0.004 – 0.1)	0.03 (0.004 – 0.1)	0.04 (0.006 – 0.1)	0.669
	Median Zellzahl	4389 (4206.5 – 4867)	4389 (4202 -3874.5)	4407 (4211 – 4847)	0.93
<b>CD11a</b>	Anteil (lebend) (%)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.4 (0.2 – 0.8)	0.547
	Median Zellzahl	14856.5 (12531.3 – 20172.8)	14805.5 (12517 – 20291.8)	14856.5 (12589.3 – 19518.5)	0.983
<b>CD11b</b>	Anteil (lebend) (%)	0.3 (0.1 – 0.5)	0.3 (0.2 – 0.5)	0.3 (0.1 – 0.5)	0.814
	Median Zellzahl	4589.5 (3804 – 5488.3)	4604 (3855 – 5453.8)	4523.5 (3763.5 – 5595)	0.742
<b>CD49a</b>	Anteil (lebend) (%)	0.03 (0.02 – 0.1)	0.03 (0.003 – 0.1)	0.02 (0.001 – 0.1)	0.203
	Median Zellzahl	1119 (1010 – 1269)	1127 (1011.5 – 1292.8)	1108 (988 – 1217)	0.156
<b>CD54</b>	Anteil (lebend) (%)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.4 (0.2 – 0.8)	0.603
	Median Zellzahl	12240 (9491 – 15384)	12198 (9459.3 – 15038.8)	12669 (9620.3 – 16837.5)	0.164
<b>CD62L</b>	Anteil (lebend) (%)	0.1 (0.04 – 0.2)	0.1 (0.04 – 0.2)	0.1 (0.04 – 0.2)	0.916
	Median Zellzahl	1202.5 (1000 – 1540.3)	1206 (1002 – 1574.5)	1193.5 (985.5 – 1507.5)	0.628
<b>CD106</b>	Anteil (lebend) (%)	0.3 (0.1 – 0.6)	0.3 (0.2 – 0.6)	0.3 (0.1 – 0.6)	0.673
	Median Zellzahl	1720 (1320.5 – 2107)	1723.5 (1309.5 – 2108)	1645.5 (1345 – 2068)	0.857
<b>CCR2</b>	Anteil (lebend) (%)	0.2 (0.1 – 0.3)	0.2 (0.1 – 0.4)	0.2 (0.1 – 0.3)	0.488
	Median Zellzahl	3590 (2826 – 18254)	3746.5 (2854.3 – 20363.3)	3249.5 (2732.3 – 10856.8)	0.072
<b>CCR7</b>	Anteil (lebend) (%)	0.2 (0.1 – 0.5)	0.2 (0.1 – 0.5)	0.3 (0.1 – 0.4)	0.716
	Median Zellzahl	2357 (2091 – 3013)	2370.5 (2091 – 3060)	2301 (2100.3 – 2866.8)	0.567
<b>CXCR4</b>	Anteil (lebend) (%)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.971
	Median Zellzahl	4388.5 (3080 – 8928)	4633 (3068.5 – 9172)	4224 (3170 – 8126.3)	0.387

<b>CXCR7</b>	Anteil (lebend) (%)	0.5 (0.3 – 0.8)	0.5 (0.3 – 0.8)	0.4 (0.3 – 0.9)	0.565
	Median Zellzahl	7939 (4783.5 – 11038.8)	8072 (4872.5 – 11312)	6866 (4500.5 – 10405.5)	0.307
<b>CX<sub>3</sub>CR1</b>	Anteil (lebend) (%)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.3 (0.2 – 0.8)	0.596
	Median Zellzahl	28682.5 (18147 – 37778.3)	27876 (17225.8 – 37348)	31339 (19155.3 – 39054)	0.264
<b>CXCL12</b>	Anteil (lebend) (%)	0.3 (0.1 – 0.5)	0.3 (0.1 – 0.5)	0.3 (0.1 – 0.5)	0.823
	Median Zellzahl	1721.5 (1400.4 – 2397.8)	1713.5 (1408 – 2365)	1782.5 (1383.3 – 2480.8)	0.983
<b>CXCL14</b>	Anteil (lebend) (%)	0.4 (0.3- 0.8)	0.4 (0.2 – 0.7)	0.4 (0.3 – 0.8)	0.53
	Median Zellzahl	1579 (1189.5 – 2053)	1579 (1189 – 2072)	1576 (1172.5 – 2013.5)	0.806
<b>MIF</b>	Anteil (lebend) (%)	0.5 (0.3 – 0.8)	0.5 (0.3 – 0.7)	0.5 (0.3 – 0.9)	0.451
	Median Zellzahl	7948 (5836.5 – 10608)	7903.5 (5811.5 – 10518)	8117 (5938.5 – 11165)	0.759

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben.  
Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.

#### Anhang 9: Auswertung manuelles Gating - Thrombozyten

		<b>Alle Patienten</b>	<b>nDMT2</b>	<b>DMT2</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Thrombozyten</b>		<b>n=292</b>	<b>n=218</b>	<b>n=74</b>	
	Zellzahl	13x10 <sup>9</sup> (10x10 <sup>9</sup> – 16x10 <sup>9</sup> )	13x10 <sup>9</sup> (10x10 <sup>9</sup> – 16x10 <sup>9</sup> )	13x10 <sup>9</sup> (10x10 <sup>9</sup> – 17x10 <sup>9</sup> )	0.367
<b>_CD42b</b>	Anteil (lebend) (%)	81.5 (76.5 – 85.1)	81.3 (76.8 – 85.4)	80.9 (75.2 – 84.5)	0.421
	Median Zellzahl	7654.5 (4666.8 – 9051.8)	7739.5 (4775.5 – 9218)	6603.5 (4534.8 – 8701.8)	0.081
<b>_CD41</b>	Anteil (lebend) (%)	74.6 (61.7 – 80.9)	76.2 (65.5 – 81.2)	70.5 (53.5 – 79.8)	<b>0.013</b>
	Median Zellzahl	3778.5 (2429.3 – 5870.8)	4025 (2608.3 – 6003.5)	3276.5 (1852.8 – 5519.8)	<b>0.037</b>
<b>_CD31</b>	Anteil (lebend) (%)	80.8 (75.8 – 84.6)	81 (774)	80.5 (74.5 – 84.4)	0.309
	Median Zellzahl	4356.5 (3192 – 5912)	4356.5 (3254.8 – 6099.8)	4357 (3019 – 5649)	0.422
<b>_CD61</b>	Anteil (lebend) (%)	81.2 (76.4 – 85)	81.3 (76.8 – 85.4)	80.9 (75.2 – 84.5)	0.411
	Median Zellzahl	11045 (7122.8 – 13174)	11095 (8103.5 – 13174)	10945 (6093 – 13465.8)	0.295
<b>_CD62P</b>	Anteil (lebend) (%)	18.6 (12.3 – 26.4)	28.5 (11.6 – 26.2)	18.8 (12.5 – 28.3)	0.459

	Median Zellzahl	650.5 (589.5 – 747.3)	646.5 (589.8 – 748.8)	674 (610 – 746.3)	0.108
<b>_CXCL12</b>	Anteil (lebend) (%)	8.4 (2.3 – 20.2)	7.2 (2.2 – 19.1)	12.3 (2.9 – 23.7)	<b>0.036</b>
	Median Zellzahl	751 (663 – 1009)	742 (659.5 – 979)	862 (683.3 – 1119.5)	<b>0.025</b>
<b>_CXCL14</b>	Anteil (lebend) (%)	3 (1.4 – 5.7)	3 (1.4 – 5.8)	3 (1.4 – 5.4)	0.872
	Median Zellzahl	681 (653 – 730)	681 (652 – 720)	691 (659.5 – 758.5)	0.109
<b>_MIF</b>	Anteil (lebend) (%)	3.6 (1.1 – 7.3)	3.5 (1 – 7.3)	3.9 (1.2 – 8.4)	0.417
	Median Zellzahl	770 (714 – 819.8)	767.5 (708 – 814)	779 (731.5 – 836.3)	0.078

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben.  
Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.

#### Anhang 10: Auswertung manuelles Gating - Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate

		Alle Patienten	nDMT2	DMT2	p-Wert
<b>Thrombozyten- Leukozyten- Aggregate</b>		<b>n=292</b>	<b>n=218</b>	<b>n=74</b>	
	Zellzahl	9x10 <sup>9</sup> (5x10 <sup>8</sup> -13x10 <sup>9</sup> )	8x10 <sup>9</sup> (5x10 <sup>8</sup> -13x10 <sup>9</sup> )	9x10 <sup>8</sup> (5x10 <sup>8</sup> -15x10 <sup>9</sup> )	0.59
<b>CD42b</b>	Anteil (lebend) (%)	5.2 (3.3 – 8.9)	5.3 (3.2 – 8.9)	4.6 (3.6 – 9.1)	0.973
	Median Zellzahl	12324.5 (5063.3 – 18611)	12008 (5001.8 – 18094.3)	12438 (5571.5 – 20923.5)	0.282
<b>CD41</b>	Anteil (lebend) (%)	4.7 (3.2 – 8)	4.8 (3 – 8)	4.1 (3.3 – 7.7)	0.617
	Median Zellzahl	5512 (3251.8 – 10504.8)	5642 (3169 – 11023)	5499.5 (3904.8 – 9821.3)	0.794
<b>CD31</b>	Anteil (lebend) (%)	5.2 (3.3 – 8.8)	5.3 (3.2 – 8.7)	4.6 (3.6 – 9)	0.992
	Median Zellzahl	13372.5 (10729 – 17643.8)	13159 (10638 – 17449)	14037.5 (11127.8 – 18577.8)	0.38
<b>CD61</b>	Anteil (lebend) (%)	5.1 (3.3 – 8.8)	5.2 (3.2 – 8.8)	4.6 (3.5 – 9.1)	0.933
	Median Zellzahl	18222.5 (5960.5 – 30450.3)	17904.5 (5938 – 30304.8)	20703.5 (7639.8 – 31594.8)	0.478
<b>CD62P</b>	Anteil (lebend) (%)	2.4 (1.5 – 3.5)	2.3 (1.5 – 3.4)	2.7 (1.8 – 3.7)	0.188
	Median Zellzahl	1286 (852 – 2186)	1240 (828.5 – 2034)	1586.5 (993.3 – 2966)	<b>0.016</b>
<b>CXCL12</b>	Anteil (lebend) (%)	3.3 (2.1 – 5.8)	3.3 (2 – 5.9)	3.3 (2.2 – 5.2)	0.673
	Median Zellzahl	1990.5 (1321.3 – 2702)	1911.5 (1308 – 2678)	2091.5 (1389.8 – 3265.8)	0.108

<b>CXCL14</b>	Anteil (lebend) (%)	3 (1.4 – 6.6)	3.2 (1.3 – 6.6)	2.7 (1.6 – 6.2)	0.914
	Median Zellzahl	4692 (1683 – 9095)	4771 (1691 – 9146)	4672 (1668.3 – 8943)	0.736
<b>MIF</b>	Anteil (lebend) (%)	3.4 (1.7 – 6.8)	3.6 (1.7 – 6.7)	3.2 (1.8 – 7.2)	0.907
	Median Zellzahl	4071 (2018 – 5451)	4143 (1804.5 – 5467.5)	3481 (2254 – 5473.3)	0.819

Die Werte sind als absolute Anzahl (n), Median + Interquartilbereich (IQR) angegeben.  
Abkürzungen: a – aortal, m – mittig, v – ventrikulär.