

Zusammenhang von Struktur und Funktion im Myokard  
bei Patienten mit hochgradiger Aortenstenose und  
erhaltener systolischer Herzfunktion unter besonderer  
Berücksichtigung der B-Typ natriuretischen Peptide

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
**Bastian Schmack**  
aus Bonn

Gießen 2010

Aus dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung  
Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Braun

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. J. Schaper

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Krombach

Tag der Disputation: 26.10.2010

Für meine Schwestern Vanessa und Coco-Eileen

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

---

1	Einleitung.....	1
1.1	Aortenstenose.....	1
1.1.1	Definition .....	1
1.1.2	Ätiologie und Epidemiologie der Aortenstenose .....	1
1.1.3	Pathophysiologie der Aortenstenose .....	1
1.1.4	Klinik, Klassifikation und Therapieoptionen der valvulären Aortenstenose .....	3
1.2	Strukturelle Integrität des Myokards .....	6
1.2.1	Myozyten.....	6
1.2.2	Alpha-Aktinin .....	7
1.2.3	Extrazellulärmatrix.....	7
1.2.4	Myokardiale Fibrose und zelluläre Degeneration .....	9
1.3	Biomarker .....	10
1.3.1	B-Typ natriuretische Peptide.....	10
1.3.2	Atrial-natriuretisches Peptid.....	11
1.3.3	Klinische Anwendung der natriuretischen Peptide, Assoziation mit Klappenvitien .....	12
1.4	Überlegungen zum Operationszeitpunkt der Aortenstenose.....	12
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit .....	14
2	Material und Methoden .....	16
2.1	Kollektive.....	16
2.1.1	Studienkollektiv .....	16
2.1.2	Kontrollkollektiv .....	16
2.2	Präoperative Evaluation des Studienkollektivs.....	17
2.2.1	Elektrokardiographie.....	17
2.2.2	Echokardiographie .....	17
2.2.3	Koronarangiographie.....	18
2.2.4	Kardiale Magnetresonanztomographie .....	18
2.2.5	Laborchemische Blutuntersuchung .....	19
2.3	Herzmuskelgewebe, Biopsie .....	20
2.4	Histologische Aufarbeitung der myokardialen Gewebeproben .....	20
2.4.1	Hämatoxilin-Eosin Färbung .....	20
2.4.1.1	Prinzip der Hämatoxilin-Eosin Färbung.....	20

---

2.4.1.2	Protokoll der Hämatoxilin-Eosin Färbung .....	20
2.4.2	Immunhistochemie .....	21
2.4.2.1	Prinzip und Methodik immunhistologischer Färbungen .....	21
2.4.2.2	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und deren Anregungsbereiche .....	21
2.4.3	Technischer Ablauf .....	21
2.4.3.1	Herstellung immunhistologischer Präparate .....	22
2.4.3.1.1	Gewebeschnitte .....	22
2.4.3.1.2	Fixierung .....	22
2.4.3.1.3	Färbung .....	22
2.4.3.1.4	Lagerung und Konservierung .....	22
2.4.4	Technisches Gerät .....	23
2.4.4.1	Fluoreszenzmikroskop .....	23
2.4.4.2	Konfokale Mikroskopie .....	23
2.4.4.3	Digitale Fotografie .....	24
2.4.5	Antikörper .....	24
2.4.5.1	Primäre Antikörper .....	24
2.4.5.2	Sekundäre Antikörper .....	25
2.4.5.3	Farbstoffe .....	25
2.4.5.4	Hilfssubstanzen .....	25
2.4.5.4.1	Phosphate balanced salt solution .....	25
2.4.5.4.2	Mowiol Einbettmedium .....	26
2.4.6	Färbeprotokolle Immunhistochemie .....	26
2.4.6.1	Bestandteile der Extrazellulärmatrix .....	26
2.4.6.2	Marker der zellulären Degeneration .....	27
2.4.6.2.1	Alpha-Aktinin 1 .....	27
2.4.6.2.2	Alpha-Aktinin 2 .....	27
2.4.6.3	Kapillardichte .....	28
2.4.6.4	Natriuretische Hormone .....	29
2.4.6.4.1	B-Typ natriuretisches Peptid .....	29
2.4.6.4.2	Atrial-natriuretisches Peptid .....	29
2.4.7	Morphometrie, Auswertung der Immunhistochemie .....	30
2.5	<i>In situ</i> Hybridisierung .....	30
2.5.1	Anwendung in dieser Studie .....	30

---

2.5.2	Prinzip der <i>In situ</i> Hybridisierung .....	31
2.5.3	Herstellung der DIG-markierten Sonde .....	31
2.5.4	Verwendete Substanzen .....	31
2.5.5	Protokoll der <i>In situ</i> Hybridisierung .....	32
2.6	Statistik .....	33
3	Ergebnisse .....	34
3.1	Ergebnisse der präoperativen klinischen Evaluation des Studienkollektivs .....	34
3.2	Allgemeine Histologie .....	36
3.2.1	Hämatoxilin-Eosin-Färbung .....	36
3.3	Spezielle Histologie, Immunhistochemie .....	36
3.3.1	Extrazellulärmatrix .....	36
3.3.1.1	Fibronectin .....	36
3.3.1.2	Kollagen I .....	37
3.3.1.3	Kollagen III .....	38
3.3.1.4	Kollagen VI .....	39
3.3.1.5	Übersicht Kollagen I-VI .....	40
3.3.1.6	Prokollagen-I-Propeptid .....	41
3.3.1.7	Prokollagen-III-Propeptid .....	42
3.3.1.8	Kapillardichte .....	43
3.3.2	Zelluläre Degeneration, Alpha-Aktinin 1 und 2 .....	44
3.3.2.1	Quantifikation .....	45
3.3.2.2	Darstellung (Immunhistochemie) .....	45
3.3.3	Natriuretische Peptide (Histologie) .....	47
3.3.3.1	B-Typ natriuretisches Peptid .....	47
3.3.3.2	Atrial-natriuretisches Peptid .....	47
3.4	Ergebnisse der laborchemischen Blutuntersuchung .....	48
3.4.1	BNP und NTproBNP im Serum der Studienpatienten (präoperativ) .....	48
3.4.2	Prokollagen I und III im Serum der Studienpatienten .....	49
3.4.3	Korrelation der Prokollagene PIP und PIIP mit NTproBNP im Serum .....	50
3.5	Myokardiale Biomarker (NTproBNP) und histologische Befunde .....	50
3.5.1	NTproBNP-Konzentration im Serum und Marker der zellulärer Degeneration .....	51
3.5.2	NTproBNP-Konzentration im Serum bei histologischem Nachweis der Biomarker ANP/BNP ....	51

3.5.3	Korrelation der NTproBNP Serumkonzentration mit Bestandteilen der Extrazellulärmatrix .....	52
3.6	Korrelation von Prokollagenen im Serum und der Morphologie .....	53
3.6.1	Serumkonzentration der Prokollagene und Marker der myokardialen Degeneration.....	53
3.6.2	Serumkonzentration der Prokollagene und Bestandteile der Extrazellulärmatrix .....	54
3.6.2.1	Korrelation von Prokollagen-I-Propeptid mit der Extrazellulärmatrix .....	54
3.6.2.2	Korrelation von Prokollagen-III-Propeptid mit der Extrazellulärmatrix .....	55
3.7	Relation und Korrelation der Kapillardichte mit unterschiedlichen Messparametern.....	56
3.7.1	Korrelation von Kapillardichte und Biomarkern (NTproBNP) .....	56
3.7.2	Kapillardichte und Marker der myokardialen zellulären Desorganisation .....	56
3.7.3	Korrelation der Kapillardichte mit PIP und PIIP im Serum .....	57
3.8	<i>In situ</i> Hybridisierung .....	57
4	Diskussion .....	59
4.1	Klinische Problemstellung .....	60
4.2	Strukturdefizit des Myokards bei Aortenstenose und erhaltener systolischer Herzleistung.....	62
4.2.1	Myokardiale Fibrose .....	62
4.2.2	Sarkomerische Desorganisation .....	64
4.3	Rolle der natriuretischen Biomarker BNP und ANP bei Vorliegen einer Aortenstenose .....	66
4.4	Prokollagene als Serummarker des Strukturdefizits bei erhaltener systolischer Herzfunktion .....	68
4.5	Diskussionsbeitrag zum Operationszeitpunkt der Aortenstenose .....	70
5	Zusammenfassung .....	73
6	Summary .....	75
7	Literaturverzeichnis .....	77
8	Abkürzungsverzeichnis .....	87
9	Danksagung .....	90
10	Lebenslauf .....	91

# **1 Einleitung**

## **1.1 Aortenstenose**

### **1.1.1 Definition**

Die Aortenstenose ist definiert als angeborene oder erworbene Verengung des Ausflusstraktes des linken Ventrikels. Hierbei kann zwischen valvulären, supra- und subvalvulären Stenosen unterschieden werden. Gegenstand dieser Arbeit waren Untersuchungen an Patienten mit erworbener valvulärer Aortenstenose.

### **1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie der Aortenstenose**

Zur Ätiologie der valvulären Aortenstenose zählen rheumatische Erkrankungen und die idiopathische Degeneration des Klappenapparates. In der Vergangenheit wurden vornehmlich degenerative Prozesse als Ursache für eine Aortenstenose angenommen. Dagegen stehen heute inflammatorische Prozesse, ähnlich der Arteriosklerose, im Vordergrund<sup>1,2</sup>. Daher kommt diesem Mechanismus ein ähnliches Risikoprofil zu wie der koronaren Herzkrankheit unter Ausbildung von Kalzifikationen<sup>3-5</sup>. Die angeborene bikuspidale Aortenklappe stellt einen weiteren Risikofaktor für die Entwicklung einer Aortenstenose dar. Dieser Vorgang tritt häufig bereits zwei Jahrzehnte früher auf und wird auf ungünstige Strömungsverhältnisse zurückgeführt<sup>6,7</sup>.

Die Aortenstenose ist mit einer Prävalenz von 2-7 % in der europäischen und nordamerikanischen Bevölkerung älter als 65 Jahre das häufigste Klappenvitium. Es findet sich ein Altersgipfel in der sechsten bis achten Lebensdekade<sup>5,6</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Patienten mit erworbener valvulärer Aortenstenose untersucht, weshalb im Folgenden genauer auf dieses Krankheitsbild eingegangen wird.

### **1.1.3 Pathophysiologie der Aortenstenose**

Die Aortenstenose führt zu einer kardialen Hypertrophie. Als kardiale Hypertrophie wird der Zustand des Anstiegs der Herzmuskelmasse aufgrund einer Vergrößerung der Herzmuskelzellen und der Zunahme extrazellulärer Gewebebestandteile bezeichnet.

---

Dieser adaptive Vorgang ist die Antwort auf eine gesteigerte hämodynamische Belastung. Stimuli können hierbei prinzipiell sowohl physiologische als auch pathophysiologische Umstände sein. Wachstum, Ausdauertraining und Schwangerschaft führen physiologisch zu einer Zunahme der Herzmuskelmasse<sup>8</sup>. Pathophysiologisch können neben der Aortenstenose auch verschiedene Herzmuskelerkrankungen oder abnormale mechanische Überlastungen zu einer ventrikulären Hypertrophie führen. Hierzu zählen angeborene Vitien, arterielle Hypertonie, Kardiomyopathien, Shuntdefekte und weitere Klappenvitien. Beim Übergang von Adaptation zu Maladaptation entsteht schließlich eine Herzinsuffizienz, charakterisiert durch zelluläre Degeneration und Fibrosierung<sup>9</sup>.

Die eingeschränkte Klappenöffnung der Aortenklappe führt zu einer Strömungsbehinderung, deren Schweregrad man im Echokardiogramm durch die Flussbeschleunigung im Bereich der Stenose messen kann. Die invasive Bestimmung im Katheterlabor erfolgt über die Bestimmung des sogenannten Rückzugsgradienten mit einem Pigtailkatheter. Die erste Messung wird im linken Ventrikel vorgenommen, anschließend wird der Katheter über die Aortenklappe zurückgezogen und der Druck in der Aorta gemessen. Eine normale Aortenklappe erzeugt dabei einen Gradienten (pLV-pAo) von weniger als 3 mmHg. Bei Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose kann im Laufe der Jahre der Gradient über 130 mmHg ansteigen, was für den linken Ventrikel eine massive Druckbelastung darstellt. Da dieser Prozess über Jahre voranschreitet, entwickelt sich parallel eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie und ein Remodeling der Kammergeometrie. Über eine Abnahme der Kavumgröße und eine Zunahme der Wanddicke wird die Wandspannung bei massiv erhöhtem endsystolischen Druck in normalen Bereichen gehalten. Die systolische Funktion des linken Ventrikels bleibt dabei erhalten, während die diastolische Funktion durch die Entstehung einer Fibrose bereits gestört ist<sup>9</sup>.

Neben diesen makroskopisch sichtbaren Veränderungen finden auch auf zellulärer Ebene erhebliche Umbauten statt, die von der Arbeitsgruppe um Krayenbühl und Hess sowie unserer eigenen, gut beschrieben sind. Die Zunahme der relativen Wanddicke (Wanddicke Septum + Wanddicke Hinterwand/Cavumdiameter + Wanddicken) führt über konzentrisches Remodeling zu einer Störung der diastolischen Funktion des linken Ventrikels. Diese kann im Echokardiogramm mit der diastolischen Strömungsgeschwindigkeit im Bereich der Pulmonalvenen oder der Mitralklappe bestimmt werden.

---

Erfolgt bei einem normalen Ventrikel der maximale Einstrom in der frühen Diastole (early E Welle), so verschiebt sich dieser bei einem konzentrisch hypertrophierten Ventrikel in die späte Diastole, in der auch die atriale Kontraktion stattfindet (atrial A Welle). Kennzeichen einer normalen diastolischen Funktion ist ein Verhältnis von E zu A von über 1,3. Eine Störung der linksventrikulären Compliance ist bei Werten unter 0,8 anzunehmen.

Die Abnahme der Klappenöffnungsfläche bei Patienten mit Aortenklappenstenose ist ein langsam fortschreitender Prozeß. Ausgehend von einer Öffnungsfläche von 3-4 cm<sup>2</sup> beträgt diese im Mittel 0,1-0,2 cm<sup>2</sup> pro Jahr, so daß ohne Intervention irgendwann ein kritisches Maß unter 1,0 cm<sup>2</sup> Klappenöffnungsfläche erreicht wird.

Die Möglichkeiten der ventrikulären Adaptation sind dabei durch die massive Nachlasterrhöhung erschöpft, was schließlich auch zu einer Reduktion der systolischen Funktion mit einem Remodeling des linken Ventrikels im Sinne einer Dilatation führt. Die fünf Jahre Überlebensrate dieser Patienten liegt ohne Klappeneingriff bei unter 20 %. Hier jedoch wurden Patienten mit gestörter diastolischer, aber erhaltener systolischer, Funktion untersucht.

#### **1.1.4 Klinik, Klassifikation und Therapieoptionen der valvulären Aortenstenose**

Klinisch imponiert die Aortenstenose durch die Symptomtrias Angina pectoris, Dyspnoe und Schwindel bis hin zur Synkope. Nicht selten jedoch entwickeln sich klinische Symptome erst nach langjähriger Erkrankung. Neben der Anamnese ist die klinische Untersuchung in den meisten Fällen richtungsweisend. Hier kommt der Auskultation ein hoher Stellenwert zu. Auskultatorisch imponiert die Aortenstenose mit einem (deutlichen) Holosystolikum mit punctum maximum im zweiten Intercostalraum rechts.

Nicht selten wird dieses Herzgeräusch bis in die Halsschlagadern fortgeleitet. Neben weiterer nicht-apparativer Diagnostik und Leistungstests ist jedoch die Echokardiographie (transthorakal und gegebenenfalls transösophageal) für eine genaue Einschätzung des Krankheitsbildes obligat.

Eine Klassifikation der valvulären Aortenstenose erfolgt gemäß aktueller Leitlinien (ACC/AHA/ESC) in drei Schweregrade: leichtgradig, mittelgradig und hochgradig<sup>10,11</sup>. Bei der Einteilung werden echokardiographisch-planimetrisch sowie mit der

Magnetresonanztomographie die Aortenklappenöffnungsfläche sowie der Druckgradient und die Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe einbezogen.

Von einer schwergradigen Aortenstenose kann bei Reduktion der Aortenöffnungsfläche auf Werte kleiner  $1 \text{ cm}^2$  und Anstieg des transvalvulären Druckgradienten auf mittlere Messwerte größer  $40 \text{ mmHg}$  (AHA  $> 40 \text{ mmHg}$ , ESC  $> 50 \text{ mmHg}$ ), beziehungsweise einer Flussbeschleunigung von über  $4 \text{ m/sec}$  ausgegangen werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick der Einteilung der Schweregrade einer Aortenstenose anhand echokardiographisch erhobener Messparameter <sup>11,12</sup>.

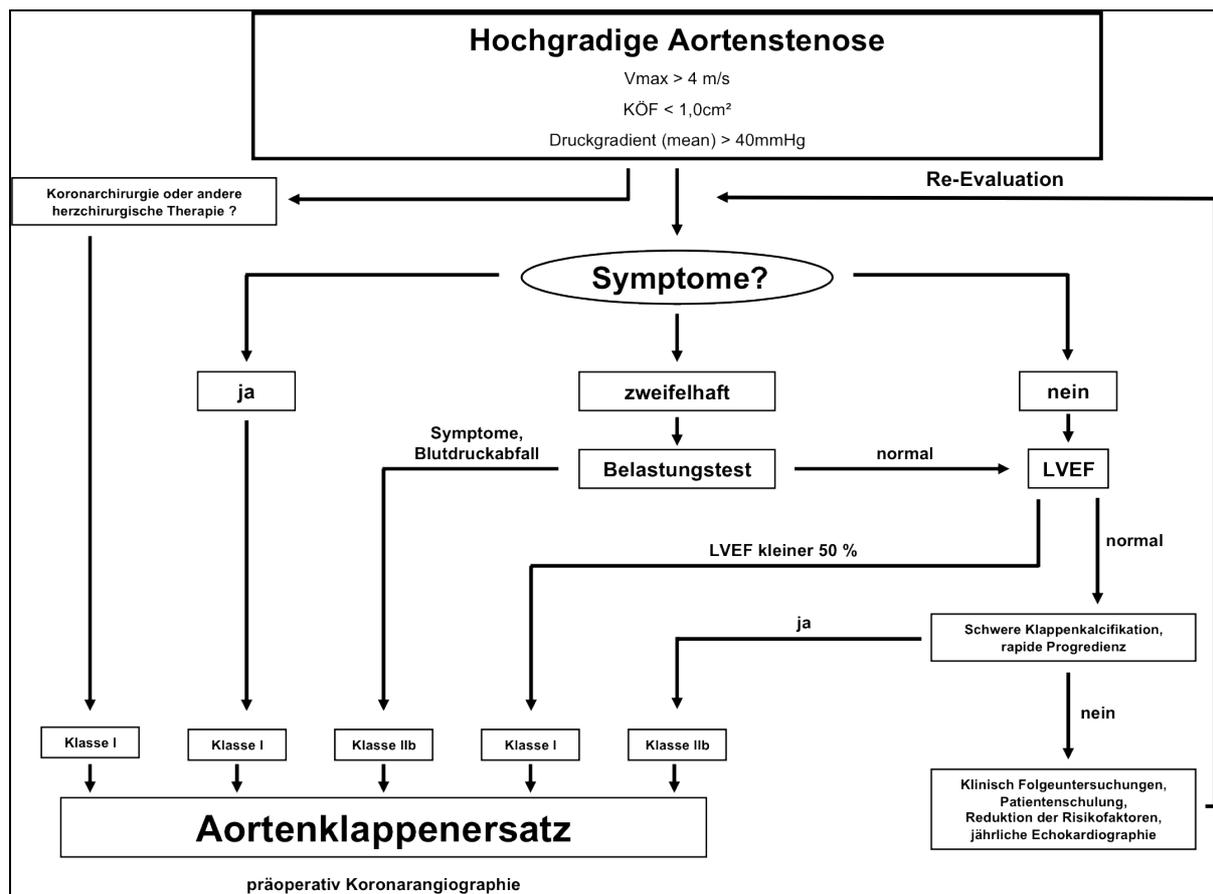
	<b>KÖF (<math>\text{cm}^2</math>)</b>	<b>AVAI (<math>\text{cm}^2/\text{m}^2</math>)</b>	<b>Mittlerer <math>\Delta p</math> (<math>\text{mmHg}</math>)</b>	<b><math>v_{\text{max}}</math> (m/s)</b>
Leichte Aortenstenose	$> 1,5$	$> 1,0$	$< 25$	$< 3,0$
Mittelgradige Aortenstenose	1-1,5	0,6-1	25-50	3,0-4,0
Schwere Aortenstenose	$< 1$	$< 0,6$	$> 50$	$> 4,0$

**Tabelle 1:** Schweregrade der Aortenklappenstenose (ESC Leitlinien 2007).

Die Indikation zum Aortenklappenersatz bei hochgradiger Aortenstenose ist in jedem Fall gegeben, wenn sich auf dem Boden der Druckbelastung eine symptomatische Herzinsuffizienz ausbildet. Fehlt eine adäquate Symptomatik, wird die individuelle Indikation bei Präsenz von linksventrikulärer systolischer Dysfunktion und/oder bestehender Indikation zur operativen koronaren Revaskularisation bei begleitender koronarer Herzkrankheit gestellt (Evidenzgrad I) <sup>10,11</sup>. Abbildung 1 zeigt das Vorgehen bei Aortenstenose in Form eines Flussdiagramms (nach AHA) <sup>10</sup>.

Den Goldstandard in der Therapie der schweren oder symptomatischen Aortenstenose stellt heutzutage der operative Aortenklappenersatz dar <sup>10,11</sup>. Die Operation verbessert valide die klinische Situation und das Langzeitüberleben des Patienten <sup>13,14</sup>. Hierbei wird im Verlauf eines herzchirurgischen Eingriffes mit extrakorporaler Zirkulation die stenosierte Herzklappe exzidiert und durch eine künstliche oder eine biologische Klappenprothese ersetzt. Der operative offene Aortenklappenersatz ist ein sicheres Verfahren mit einer intrahospitalen Mortalität bei Ersteinriff von  $4 \%$  und weniger <sup>15,16</sup>.

In Einzelfällen stehen interventionelle Klappenersatzverfahren zur Verfügung<sup>17,18</sup>. Einen palliativen Therapieansatz stellen die konservative medikamentöse Therapie oder die Valvuloplastie dar, die beide mit einer deutlich schlechteren Lebenserwartung im Vergleich zum Klappenersatz verbunden sind<sup>19-21</sup>.



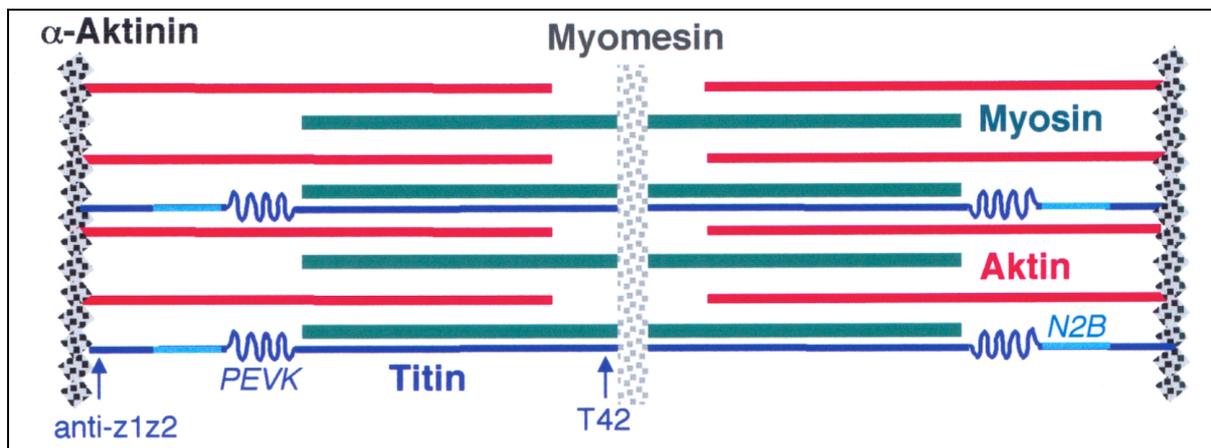
**Abbildung 1:** Flussdiagramm des therapeutischen Procedere bei schwergradiger Aortenstenose unter Berücksichtigung der aktuell gültigen Evidenzklassen (AHA) nach Bonow et al.<sup>10</sup>.

## 1.2 Strukturelle Integrität des Myokards

Die Integrität des Herzmuskels wird durch den Zustand aller Bestandteile des Myokards bestimmt. Dazu gehören die Myozyten, das Interstitium, das aus der Extrazellulärmatrix, den Fibroblasten, Mastzellen und Nervenendigungen besteht, und die Mikrovaskulatur.

### 1.2.1 Myozyten

Zur Struktur eines Myozyten gehören die kontraktilen Proteine, das Zytoskelett, die Membranproteine und der Zellkern. Die kleinste funktionelle kontraktile Einheit des Herzmuskels ist dabei das Sarkomer (Schema siehe Abbildung 2). Für eine Kontraktion ist der präzise Aufbau des Sarkomers und das Zusammenspiel aller beteiligten Komponenten erforderlich.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der wichtigsten Bestandteile eines Sarkomers nach Person<sup>22</sup>. (Abbildung mit freundlichem Einverständnis der Autorin).

Die Proteine des Myozyten können nach Funktion und Ort in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Abbildung 3 gibt hierzu einen Überblick. Kommt es zu Abberationen, ist eine suffiziente Kontraktilität gefährdet. Veränderungen der Bestandteile der Sarkomere sind repräsentativ für myozytäre zelluläre Degeneration. Auf der Suche nach Markern einer derartigen Degeneration hat sich die Untersuchung von Alpha-Aktinin als besonders geeignet gezeigt, um den Zustand des Sarkomers zu erfassen<sup>9,23</sup>. Veränderungen der Lokalisation von Myosin oder Aktin sind jedoch gleichfalls als Marker geeignet.

Eine genaue Beschreibung von Alpha-Aktinin folgt in Kapitel 1.2.2.

<b>Kontraktile Proteine</b>	Aktin, Troponin, Tropomyosin, Myosin
<b>Sarkomere Gerüstproteine</b>	Alpha- Aktinin, Titin, Myomesin, M-Protein, H-Protein, C-Protein
<b>Proteine des Zytoskeletts</b>	Intermediärfilamente (Desmin, Vimentin, Keratin) Mikrotubuli (Tubulin) zytoskelettäres Aktin
<b>Membranassoziierte Proteine</b>	Dystrophin, Vinculin, Talin, Spektrin
<b>Proteine des Glanzstreifens</b>	Connexin 43, Cadherin, Catenin, Desmoplakin

*Abbildung 3: Proteine des Kardiomyozyten nach Kostin <sup>24</sup>. (Abbildung mit freundlichem Einverständnis des Autors).*

### 1.2.2 Alpha-Aktinin

Alpha-Aktinin ist ein ubiquitär vorkommendes, Aktin-bindendes Protein, von dem bis heute beim Menschen vier Isoformen gefunden worden sind. Die Homodimere Alpha-Aktinin 2 und 3 (ACTN-2 und ACTN-3) sind sarkomer-assoziierte Gerüstproteine, wobei physiologisch nur ACTN-2 in Herzmuskelzellen und ACTN-3 nur in Skelettmuskelzellen nachweisbar ist. Alpha-Aktinin 1 (ACTN-1) ist eine nicht-sarkomerische Isoform mit Vorkommen in der glatten Muskulatur <sup>23,25</sup>. Die Isoform Alpha-Aktinin 4 (ACTN-4) ist eine nicht-muskuläre Isoform, die in metastasierenden Tumorzellen, in Makrophagen, Thrombozyten und Fibroblasten nachweisbar ist <sup>26</sup>. ACTN-1 kommt physiologisch in den Endothelzellen des Myokards und den glatten Muskelzellen der Gefäße vor. Die Sarkomere des Kardiomyozyten verfügen mit ACTN-2 über ein Gerüstprotein, das Aktinfilamente in Höhe der Z-Scheibe in einer stabilen Position hält. Darüber hinaus ist ACTN-2 an der Verbindung von Aktin mit der Zellmembran beteiligt und interagiert in der Kommunikation von intra- und extrazellulären Kompartimenten <sup>27-31</sup>.

### 1.2.3 Extrazellulärmatrix

Der Begriff Extrazellulärmatrix (EZM) wird synonym mit Interzellulärsubstanz verwendet und umfasst das interparenchymatöse Bindegewebe. Die Extrazellulärmatrix besteht aus der

---

Grundsubstanz sowie den faserigen Bestandteilen. EZM wird in allen parenchymatösen Geweben gefunden.

Zu unterscheiden ist die amorphe Grundsubstanz, die aus Fibronectin, Proteoglykanen und anderen Proteinen besteht, und die spezifischen (Faser-) Proteine, vor allem den Kollagenen. Fibronectin ist ein Glykoprotein und hat einen vielseitigen Einfluss auf den Stoffwechsel der Extrazellulärmatrix. Fibronectin wird zellulär sezerniert und fungiert als Adhäsionsprotein für Fibroblasten und Endothelzellen. In der Grundsubstanz selbst ermöglicht Fibronectin die Brückenbildung und Vernetzung der faserigen Bestandteile der Extrazellulärmatrix und ist im menschlichem Herzmuskel physiologischerweise mit einem Anteil von circa 12 % des gesamten Myokards nachweisbar<sup>9</sup>.

Zweite wesentliche Komponente der Extrazellulärmatrix sind die Faserproteine, wobei die Kollagene die wichtigsten Bestandteile sind. In dieser Arbeit wurde deshalb ein Schwerpunkt auf diese unterschiedlichen Kollagene gelegt. In der Familie der Kollagene werden 28 (I-XXVIII) verschiedene Faserproteine unterschieden, während in der Extrazellulärmatrix des Myokards die Kollagene I, III, IV, V und VI beschrieben sind<sup>32</sup>. Im Folgenden werden die Eigenschaften und Funktionen der in dieser Arbeit behandelten Kollagene I, III und VI charakterisiert.

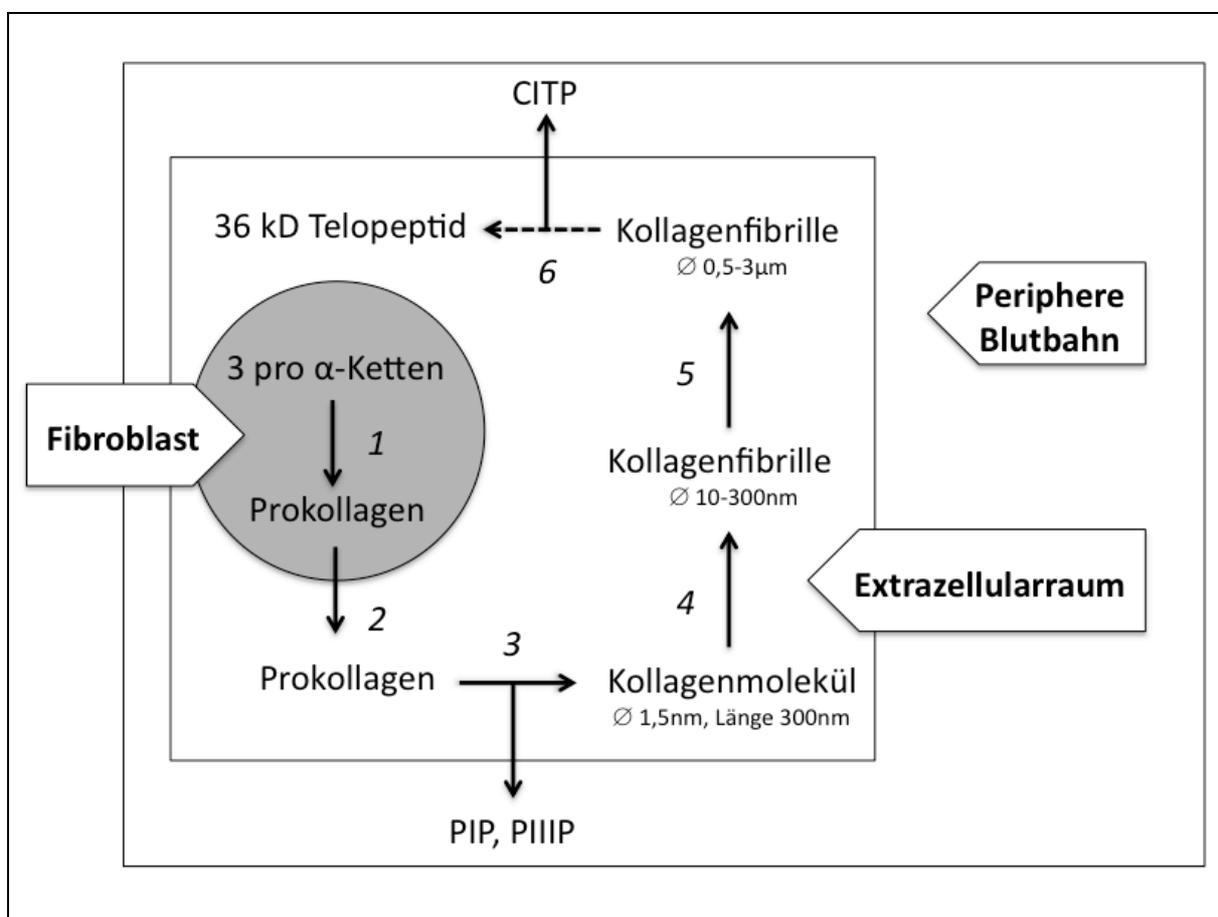
Kollagen I gehört wie Kollagen III zu den fibrillären Kollagenen. Kollagen I ist ein komplexes Molekül in Form einer seilförmigen Tripelhelixstruktur. Diese Helix wird aus den Aminosäuren Prolin, Alanin und Glycin aufgebaut. Kollagen I ist das am häufigsten anzutreffende Kollagen im menschlichen Organismus und ist Bestandteil von Knochen, Sehnen, Bändern und der Cornea. Kollagen I sowie das globuläre Kollagen III gewährleisten in großem Maße die Zugfestigkeit des Gewebes, auch die des Herzmuskels.

Kollagen VI gehört zur Gruppe der nicht-fibrillären Kollagene und hat seine Funktion in der Zelladhäsion, also der Verbindung von Zellen und Extrazellulärmatrix. Die Extrazellulärmatrix übernimmt neben stützender und versorgender Funktion noch weitere Aufgaben: Sie kommuniziert und interagiert mit dem umgebenden Parenchym (zum Beispiel Laminin) und alteriert in ihrer Zusammensetzung ständig, wobei es physiologischer Weise zu einem relativen Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau kommt.

## 1.2.4 Myokardiale Fibrose und zelluläre Degeneration

Myokardiale Fibrose und zelluläre Degeneration sind die typischen strukturellen Veränderungen bei chronischer kardialer Überlastung. Hierbei kommt es im Sinne eines „Cardiac Remodeling“ zu strukturellen Umbauprozessen innerhalb des Myokards<sup>32-34</sup>.

Fortgeschrittene Stadien dieser Vorgänge können klinisch anhand bildgebender diagnostischer Messmethoden, insbesondere der Echokardiographie, mit Hilfe spezifischer Messparameter beobachtet werden. Frühe Veränderungen, vor allem der Übergang zwischen gesteigerter Kollagensynthese und Degeneration, entgehen jedoch der Bildgebung, können allerdings prinzipiell anhand spezifischer im Blut zirkulierender Marker erfasst werden<sup>35</sup>.



**Abbildung 4:** Schema der fibrillären Kollagensynthese und der Meßorte der Kollagenstoffwechselprodukte nach Hein et al.: 1 Formation der Prokollagen-Tripelhelix; 2 Sekretion von Prokollagen (PIP, PIIP); 3 Spaltung des Prokollagens; 4 Selbstanordnung in fibrilläre Struktur; 5 Aggregation zur Fibrille; 6 Spaltung von Kollagen I durch Kollagenasen (CITP= C-Telozeptid von Kollagen I). („The extracellular matrix in normal and diseased myocardium“<sup>36</sup>. Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Autors).

---

Biomarker des Stoffwechsels spezifischer Kollagentypen sind bekannt, hierzu zählen die im Serum erfassbaren Konzentrationen des aminoterminalen Prokollagen-Propeptid I (PINP, PIP), des aminoterminalen Prokollagen-Propeptid III (PIIINP, PIIP) und des Typ-I-Kollagen-Telopeptid (ICTP, CITP). Die Bestimmung der Konzentrationen dieser Prokollagene ist durch kommerzielle Messverfahren zugänglich geworden. Abbildung 4 zeigt schematisch den (fibrillären) Kollagenstoffwechsel. Der Prokollagenstoffwechsel ist unter anderem von Bedeutung bei Erkrankungen der Leber<sup>37-39</sup>. Herzkrankheiten, zum Beispiel eine chronische Druckbelastung oder ein Myokardinfarkt, können ebenfalls durch Veränderungen der Prokollagenkonzentrationen im Serum erkannt werden<sup>40-45</sup>.

### **1.3 Biomarker**

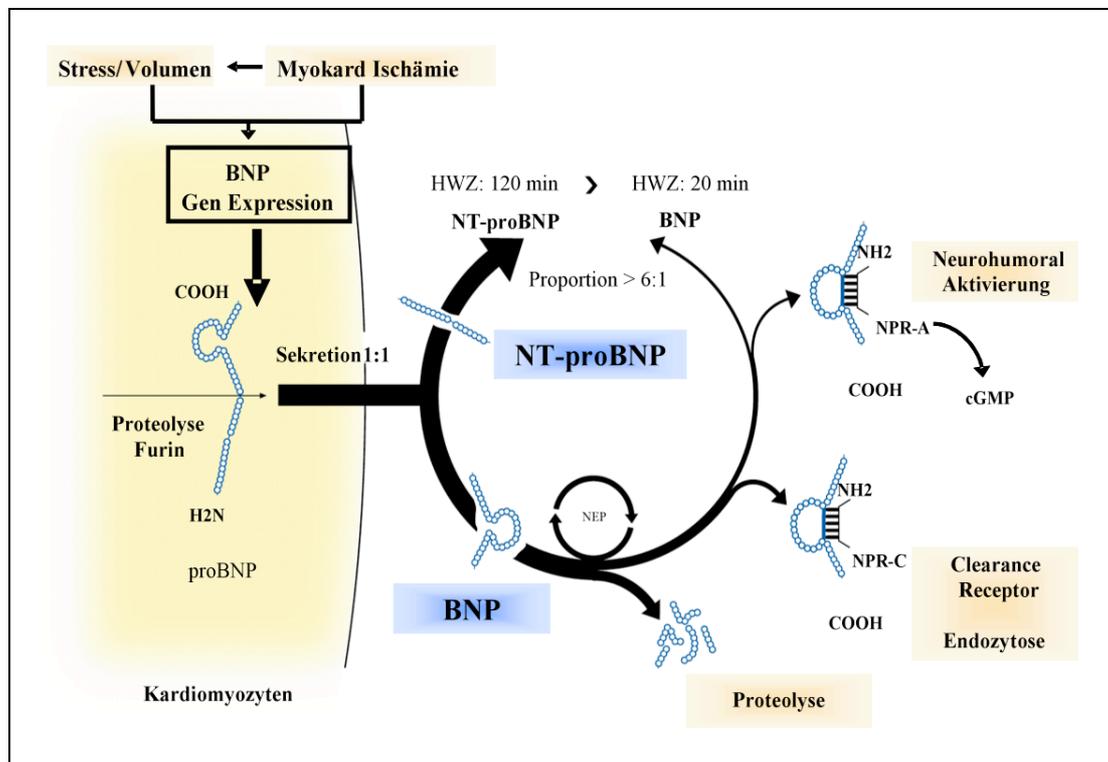
Unter dem Begriff Biomarker werden alle objektivierbaren Verfahren zusammengefasst, die biologische Prozesse abbilden und quantifizieren, zum Beispiel eine Blutdruckmessung oder eine Stress-MRT Myokardperfusion. Im engeren Sinne werden im Blut (Serum/Plasma) messbare Stoffe wie Elektrolyte, zelluläre Bestandteile oder Proteine (Enzyme, Strukturproteine, Zytokine und Mediatoren) mit der Bezeichnung Biomarker versehen. In dieser Arbeit werden die natriuretischen Peptide (B-Typ-natriuretisch und atrial-natriuretisch) untersucht. In dieser Gruppe körpereigener Substanzen nimmt in der klinischen Routine vor allem das B-Typ natriuretische Peptid eine wichtige Rolle ein.

#### **1.3.1 B-Typ natriuretische Peptide**

Die B-Typ natriuretischen Peptide (BNP, NtproBNP) gehören der Gruppe der natriuretischen Peptidhormone an und werden hauptsächlich im Ventrikelmyokard gebildet, wobei als adäquater Stimulus eine Zunahme der Wandspannung im Rahmen von Volumen- oder Druckbelastung angegeben wird<sup>46</sup>. B-Typ natriuretische Peptide werden physiologisch in geringer Menge und Konzentration im Serum nachgewiesen, steigen jedoch bei verschiedenen kardialen Erkrankungen deutlich an<sup>47</sup>.

Nach Freisetzung des Pro-Peptids kommt es zu einer äquimolaren Spaltung in das biologisch aktive C-terminale-Fragment und das biologisch inaktive N-terminale-Fragment. Die Wirkung des zirkulierenden BNP ist mannigfaltig und führt neben einer verstärkten Diurese und Natriurese zu einer peripheren Vasodilatation, sowie zur Inhibierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS).

Die Elimination des Biomarkers BNP erfolgt durch Bindung an den Rezeptor und durch Proteolyse durch neutrale Endopeptidasen, wobei NTproBNP über eine sechs- bis zehnmal längere (120 Minuten) Halbwertszeit gegenüber BNP verfügt <sup>48</sup>. Ein Schaubild des Stoffwechsels von BNP ist in Abbildung 5 zu sehen.



**Abbildung 5:** Schaubild zum Stoffwechsel der Biomarker BNP und NTproBNP nach Weber. (Abbildung nach persönlicher Mitteilung und mit freundlicher Genehmigung des Autors).

### 1.3.2 Atrial-natriuretisches Peptid

Das atrial-natriuretische Peptid (ANP), synonym bezeichnet als atrialer natriuretischer Faktor (ANF), ist ebenfalls ein Peptidhormon und wird analog zum Flüssigkeitshaushalt des Organismus auf Dehnungsreiz durch Myozyten des Atriums ausgeschüttet. ANP wird physiologisch in geringer Menge und Konzentration nachgewiesen, steigt jedoch signifikant bei kardialen Erkrankungsformen mit Rückstau von Volumen in das linke Atrium an <sup>47</sup>. Das im Blutkreislauf des Organismus zirkulierende ANP wirkt einerseits direkt relaxierend auf glatte Muskelzellen der Gefäße und somit vasodilatativ, andererseits an der Niere durch Hemmung der Natriumrückresorption natriuretisch. Analog zum BNP entsteht das wirksame ANP unter Abspaltung eines N-terminalen-ProANP Fragments (NTproANP). Dieses Fragment ist, wie auch das NTproBNP, länger im Organismus nachweisbar.

---

Immunhistochemisch wird ANP im gesunden Atrium, aber nicht im gesunden Ventrikel gefunden. ANP Granula können jedoch im Rahmen einer Herzinsuffizienz auch ventrikulär detektiert werden <sup>49</sup>.

### **1.3.3 Klinische Anwendung der natriuretischen Peptide, Assoziation mit Klappenvitien**

Seit der Entdeckung der natriuretischen Peptide vor circa 30 Jahren werden diese Peptidhormone in Verbindung mit pathologischen Vorgängen am Herzen gebracht <sup>50</sup>. Untersuchungen konnten zeigen, dass BNP und NTproBNP verlässliche Biomarker für myokardialen Stress und Herzinsuffizienz darstellen und dass beide Fragmente über gleichbedeutende Aussagekraft verfügen. NTproBNP besitzt eine, bezüglich der technischen Messmethodik, günstigere Struktur und bessere Nachweisbarkeit bei längerer Halbwertszeit <sup>51,52</sup>.

Bei Vorliegen einer Druck- und/oder Volumenbelastung des Herzens bei einer Klappenerkrankung wird über die Anwendung von Biomarkern auch auf diesem Gebiet diskutiert <sup>53-56</sup>. Besonders für die Aortenstenose sind eine Reihe klinischer Arbeiten vorhanden, die einen Zusammenhang zwischen der BNP/NTproBNP Konzentration und der Schwere des Klappenvitiums, der klinischer Symptomatik und der Progression des Krankheitsprozesses aufzeigen <sup>57-61</sup>.

Auch bei klinischer Inapparenz der Erkrankung kann die Messung des Biomarkers BNP/NTproBNP die therapeutischen Überlegungen beeinflussen <sup>62,63</sup>.

In der klinischen Routine betreffend Klappenerkrankungen sind Biomarker jedoch bis dato noch nicht Inhalt der aktuellen Leitlinien <sup>10,11</sup>.

Die Anwendung von ANP in der alltäglichen klinischen Diagnostik ist noch nicht etabliert. Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass der Nachweis spezieller Formen des NTproANP im Serum über Aussagekraft in der Diagnostik der Herzinsuffizienz, vor allem in der Akutmedizin, verfügen <sup>64</sup>.

## **1.4 Überlegungen zum Operationszeitpunkt der Aortenstenose**

Der Klappenersatz bei Stenose verfolgt die Optimierung der klinischen Situation des Patienten. Eine frühzeitige Vermeidung maladaptiver Vorgänge, wie einer hochgradigen Hypertrophie mit dem Risiko der Ausbildung einer Herzinsuffizienz, wird angestrebt.

---

Gleiches gilt auch für die Verhinderung eines plötzlichen Herztodes. Weiterhin ermöglicht eine frühzeitige Verringerung der Druckbelastung eine klinische Erholung und günstigere strukturelle Rehabilitation<sup>65,66</sup>.

Betrachtet man die Struktur und Funktion des Myokards, so kann man erkennen, dass der Verlust an kontraktilen Gewebe mit konsekutivem Ersatz durch nicht-kontraktilen fibrotisches Gewebe zu einer kardialen Funktionsminderung führt. Die Frage nach einer postoperativen Reversibilität dieser präoperativen strukturellen Veränderungen ist außerordentlich wichtig, da nur strukturelle Integrität eine optimale Funktion gewährleisten kann<sup>67</sup>. Diese Problematik wurde von Krayenbuehl et al. bereits im Jahre 1989 untersucht. Diese Forschergruppe konnte in ihren Studien mit Folgeuntersuchungen bei Patienten nach Aortenklappenersatz bei Aortenstenose nach einem Zeitraum von circa sechs Jahren (Follow-Up 70 Monate) zeigen, dass die Korrektur der stenotischen Strombahn sowohl zu einer partiellen Rehabilitation der Herzleistung und zu einer langsamen Reduktion der Herzmasse, als auch zu einer Reduktion der relativen Fibrose im Interstitium führte. Es kam jedoch nicht zu einer vollständigen Restitutio ad integrum<sup>66</sup>. Weidemann et al. konnten diese Beobachtung 2009 auch in einem kürzeren Folgeintervall bestätigen: Neun Monate nach einem operativen Aortenklappenersatz wurde eine nicht reversible linksventrikuläre Fibrosierung dokumentiert<sup>68</sup>.

Lund et al. untersuchten 1998 die Struktur-Funktion-Relation an Patienten mit reduzierter systolischer Herzfunktion mit der Analyse von transmuralen Nadelbiopsien. Hier konnte gezeigt werden, dass die dem Operationszeitpunkt vorausgehende chronische Druckbelastung bei Aortenstenose eine möglicherweise irreversible Herzmuskelschädigung auf Zellniveau generiert, die entscheidenden Einfluss auf die perioperative Sterblichkeit nimmt<sup>69</sup>.

Eine Studie der Arbeitsgruppe von Hein et al. verfolgte diese Problematik an einem Patientenkollektiv mit sowohl erhaltener (n=12) als auch reduzierter systolischer Herzfunktion (n=22). Durch morphologische Analysen konnte eine signifikante Fibrosierung und Degeneration der Herzmuskelzellen im druckbelasteten Myokard nachgewiesen werden. Hein et al. konnten eine deutliche Korrelation zwischen relativer Einschränkung der Herzfunktion auf der einen Seite und myokardialen Strukturdefiziten auf der anderen Seite beschreiben<sup>9</sup>.

---

Die Erkenntnis, dass strukturelle Veränderungen zu einem Zeitpunkt stattfinden, an dem bildgebende Verfahren wie die Echokardiographie diese nicht oder nur unzureichend darstellen können, führte die Arbeitsgruppe um Hein zu einer erneuten Auseinandersetzung bezüglich eines idealen Operationszeitpunktes für einen Klappenersatz. Sie begründeten diesen Gedankengang mit den Ergebnissen ihrer Studie, bei der die funktionelle Erholung nach Operation bei Patienten mit signifikanter Vorschädigung schlechter war als erwartet. Weidemann et al. stellen ebenfalls Überlegungen zu einem rechtzeitigen Operationszeitpunkt vor Auftreten eines ernsthaften myokardialen Strukturdefizits mit konsekutivem Krankheitsprogress an <sup>68</sup>. Trotz weitgehender Festlegung durch die verantwortlichen Fachgesellschaften, haben die oben genannten Arbeiten noch einmal die Diskussion über den idealen Operationszeitpunkt bei Aortenstenose angeregt <sup>9,70</sup>.

## **1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Zur Thematik der strukturell-funktionellen Korrelationen im menschlichen Herzens bei chronischer Druckbelastung durch Aortenstenose sind, wie beschrieben, verschiedene wissenschaftliche Arbeiten bekannt. Untersuchungen zu diesem Sachverhalt an Patienten mit erhaltener systolischer Herzfunktion und Studien zur Korrelation von Biomarkern (B-Typ natriuretischen Peptiden und Markern des Kollagenstoffwechsels PIP, PIIP) mit der Analyse von myokardialer Zelldegeneration und Fibrose im Gewebe selbst waren bisher jedoch noch nicht Gegenstand von Publikationen.

Aufgabe der vorliegenden klinisch-experimentellen Arbeit war es daher, die Zusammenhänge von Struktur und Funktion des auf Grund einer hochgradigen valvulären Aortenstenose chronisch druckbelasteten menschlichen Herzens zu untersuchen. Im Gegensatz und in Ergänzung zu der Arbeit von Hein et al. wurde dies unter besonderer Beachtung der Vorgänge bei Patienten mit erhaltener systolischer Herzfunktion durchgeführt.

Hierbei sollten zunächst nicht nur Untersuchungen zur strukturellen Integrität des belasteten Herzmuskels durchgeführt werden, sondern auch Korrelationen der Biomarker der B-Typ natriuretischen Peptide mit zellulären Bestandteilen, Strukturen der Extrazellulärmatrix und funktionellen Parametern etabliert werden.

Zugleich sollte die Auswirkung der Aortenstenose auf den Kollagenstoffwechsel beschrieben und, durch Relation und Korrelation mit verschiedenen Kofaktoren, die Aussagekraft der im Blutplasma zirkulierenden und somit messbaren Prokollagen-Stoffwechselprodukte auf die Struktur-Funktion-Korrelation bei diesem Krankheitsbild bewertet werden.

Es sollte zudem geprüft werden, ob Surrogatmarker wie zum Beispiel ANP verfügbar sind, die einfach anzuwenden sowie risikolos zu gewinnen sind und außerdem valide Auskunft über den strukturellen Zustand des Myokards geben können.

Ziel dieser Dissertationsschrift war schließlich, anhand multipler Struktur-Funktions-Analysen an Patienten mit hochgradiger Aortenstenose und erhaltener systolischer Herzfunktion einen Beitrag zur laufenden und kontrovers geführten Diskussion über den optimalen Operationszeitpunkt eines Aortenklappenersatzes bei Aortenstenose zu leisten.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Kollektive**

#### **2.1.1 Studienkollektiv**

In die Studie wurden 31 Patienten mit isolierter valvulärer Aortenstenose und einer chronischen adaptierten Druckhypertrophie eingeschlossen. Die Patienten unterzogen sich in der Abteilung für Herzchirurgie der Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim, einem elektiven konventionell-operativen Aortenklappenersatz unter Zuhilfenahme der Herz-Lungen-Maschine. Die Biopsieentnahme und Bereitstellung der Gewebeproben wurde von Herrn Dr. med. Stefan Hein, Oberarzt der Klinik für Herzchirurgie, koordiniert.

Einschlußkriterium in das Studienkollektiv war das Bestehen einer hochgradigen isolierten Aortenstenose bei erhaltener systolischer Herzfunktion mit Indikation zum elektiven operativen Aortenklappenersatz und subvalvulärer Myektomie.

Ausschlußkriterien waren das gleichzeitige Vorkommen von einer koronarer Herzkrankheit mit einem Stenosegrad größer 50 %, einer höhergradigen ( $> 2^\circ$ ) Aortenklappen- oder Mitralklappeninsuffizienz, ein akutes oder chronisches Nierenversagen (Kreatinin  $> 1,5$  mg/dl), eine vorangegangene Herzoperationen sowie ein akutes Koronarsyndrom innerhalb von sechs Monaten vor Operation.

Die Studie wurde von der institutionellen Ethikkommission genehmigt. Alle Patienten gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme und den notwendigen Untersuchungen.

#### **2.1.2 Kontrollkollektiv**

Um eine vergleichende Aussage in Bezug auf die Morphologie treffen zu können, wurden eine Reihe von Kontrollgeweben untersucht. Bei diesen Proben handelte es sich um Gewebe von sechs menschlichen Spenderherzen, zu deren Transplantation es nicht gekommen war. Alle Kontrollgewebe wurden auch schon in früheren Studien als adäquate Kontrollen herangezogen.

Serumparameter wurden mit den jeweilig vorgegebenen gültigen Referenzwerten verglichen.

## **2.2 Präoperative Evaluation des Studienkollektivs**

Präoperativ wurden alle Patienten innerhalb eines Zeitraumes von acht Wochen vor Operationstermin mithilfe invasiver und nicht-invasiver sowie apparativer und nicht-apparativer Diagnostik untersucht. Die klinischen und hämodynamischen Parameter wurden unter Koordination von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Weber in der Abteilung für Kardiologie der Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim, erhoben, zur Verfügung gestellt und unter seiner Anleitung von mir gesichtet und beurteilt.

### **2.2.1 Elektrokardiographie**

Bei allen Patienten des Studienkollektivs wurde vor der Operation ein Standard 12-Kanal Ruheelektrokardiogramm mit Einthoven und Goldberger Extremitätenableitungen sowie Wilson Brustwandableitungen angefertigt. Das Elektrokardiogramm (EKG) wurde im Verlauf der Studie ausgewertet und im Hinblick auf Arrhythmien und Erregungsbildungs- und/oder Erregungsleitungsstörungen analysiert.

### **2.2.2 Echokardiographie**

Bei allen Studienpatienten wurde ein strukturiertes Echokardiogramm in Ruhe durchgeführt. Hierbei wurden folgende Messungen berücksichtigt:

- arterieller Blutdruck nach Riva-Rocci
- linksventrikulärer Diameter enddiastolisch und endsystolisch
- linksventrikuläre Wandstärke (IVS und PW)
- linksventrikuläre Funktion quantitativ berechnet über die Verkürzungsfraction und nach Quinones
- regionale Wandbewegungsanalyse
- maximale und mittlere transvalvuläre Flussgeschwindigkeit
- farbdopplerechokardiographische Untersuchung der Mitral-, Trikuspidal- und Aortenklappe
- Berechnung des maximalen und mittleren transvalvulären Druckgradienten nach der Bernoulli-Gleichung
- Berechnung der Aortenklappenöffnungsfläche nach der Kontinuitätsgleichung
- Berechnung des linksventrikulären Wallstress nach der Methode von Gossmann et al. und Reichel et al.

### **2.2.3 Koronarangiographie**

Zum Ausschluß einer begleitenden koronaren Herzerkrankung (KHK) unterzogen sich alle Studienteilnehmer einer, im Vorfeld eines Aortenklappenersatzes obligaten, Koronarangiographie.

Die Koronarangiographie erfolgte in allgemein üblicher Technik mit Darstellung der linken Koronararterie in mindestens fünf standardisierten Projektionen und der rechten Koronararterie in mindestens zwei standardisierten Projektionen. Der Stenosegrad der Koronarien wurde visuell durch den durchführenden Kardiologen quantifiziert.

Da die diagnostische retrograde Katheterpassage der Aortenklappe mit einem erhöhten Risiko der Mikroembolie einhergeht, war die invasive Druckgradientenmessung und die Ventrikulographie optional und nicht Bestandteil des Untersuchungsprotokolls.

### **2.2.4 Kardiale Magnetresonanztomographie**

Alle Patienten unterzogen sich einer kardialen Magnetresonanztomographie (MRT) zur objektiven Darstellung der Herzfunktion.

In der Untersuchung wurden folgende Parameter erfasst:

- Kardiale Funktion und Vermessung der Herzhöhlen und Wandstärken mittels True FISP Cine Sequenz (EKG-getriggert, zeitliche Auflösung 30 ms) in Längsachsenorientierung (drei-, zwei- und vier-Kammerblick) und in Kurzachsenorientierung
- Beurteilung der Wandbewegungsstörungen des linken Ventrikels in der Cine Sequenz
- Darstellung der Aortenklappe und Planimetrie der Aortenklappenöffnungsfläche
- Volumetrische Analyse der linksventrikulären Funktion mit der TrueFisp Sequenz in Kurzachsenorientierung und Aquisition von acht bis zehn konsekutiven Kurzachsenschnitten
- Darstellung der myokardialen Perfusion in Ruhe mit einer TrueFISP Sequenz und Bolusgabe von 0,1 mmol/kgKG Gd-DTPA (Magnevist/Schering) mit nachfolgender EKG-getriggelter Messung von 60 RR-Intervallen in der basalen, midventrikulären und apikalen Kurzachse

- Darstellung myokardialer Narben mittels sogenannter LATE-Enhancement Sequenzen, die auf einer pathologischen Signalanhebung im Bereich avitalen Myokards im Vergleich zu vitalem Myokard beruhen.

### 2.2.5 Laborchemische Blutuntersuchung

Bei jedem Patienten der Studiengruppe wurde eine Routine Blutuntersuchung durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte während der präoperativen Umfelddiagnostik aus subkutanen antecubital gelegenen Venen in Gel-gefüllte Probenröhrchen. Die Proben wurden unmittelbar nach Entnahme zentrifugiert und das Serum bei -80° Celsius bis zur Analyse eingefroren. Im Rahmen der laborchemischen Untersuchung wurden folgende Parameter erhoben:

- Routinelabor (Blutbild, Elektrolyte, Nierenfunktion, Gerinnungsanalyse)
- NTproBNP und BNP im Serum

Zur Analyse von NTproBNP und BNP wurde ein kommerzieller Elektrochemieluminiszenz-Sandwich-Immunoassay auf einem Elecsys Vollautomaten (Roche Diagnostics, Mannheim) genutzt.

Als Referenzwerte der oben genannten Biomarker werden im Allgemeinen angenommen:

BNP 0,5-30 pg/ml (0,15-8,7 pmol/l)

NTproBNP 68-112 pg/ml (8,2-13,3 pmol/l) <sup>71</sup>

(Anmerkung: Die ausgegebenen BNP- und NTproBNP-Referenzwerte im Serum sind ausgesprochen variabel und sind abhängig von Messverfahren, Alter, Geschlecht und Kontrollpopulation).

- Prokollagen Typ-I-aminoterminals Propeptid (PIP) im Serum

Zur Analyse von PIP wurde ein Radioimmunassay mit kommerziellem Antiserum gegen das amino-terminale Peptid (Orion Diagnostics, Finnland) nach der Methode Melkko et al. verwendet <sup>72</sup>.

- Prokollagen Typ-III-aminoterminals Propeptid (PIIP) im Serum

Zur Analyse von PIIP wurde ein Radioimmunoassay mit kommerziellem Antiserum gegen das amino-terminale Peptid (Orion Diagnostics, Finnland) nach der Methode von Risteli et al. eingesetzt <sup>73</sup>.

## 2.3 Herzmuskelgewebe, Biopsie

Bei dem Probengewebe handelte es sich ausschließlich um humanes Herzmuskelgewebe, das perioperativ mittels subvalvulärer septaler Myektomie unter Sicht gewonnen wurde. Die septale Myektomie ist Gegenstand des Operationsprotokolls bei Aortenklappenersatz. Allen Gewebeproben wurden umgehend Studiennummern zugeordnet. Das Probenmaterial wurde unmittelbar nach Gewinnung nativ, das heißt ohne weitere chemische Behandlung, in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}$  Celsius tiefgefroren und, um postmortale Veränderungen wie unter anderem Autolyse und Ischämie zu verhindern, bei  $-80^{\circ}$  Celsius bis zur Weiterverarbeitung kryokonserviert.

## 2.4 Histologische Aufarbeitung der myokardialen Gewebeproben

### 2.4.1 Hämatoxilin-Eosin Färbung

#### 2.4.1.1 Prinzip der Hämatoxilin-Eosin Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxilin-Eosin Färbung (HE-Färbung) gelingt eine gute Übersicht des histologisch zu untersuchenden Gewebes. Hierbei werden nach Anfertigung des Gewebeschnittes nacheinander zwei Einzelfärbungen durchgeführt. Hämatoxilin färbt basophile Strukturen wie Zellkern, Desoxyribonukleinsäure und das (raue) endoplasmatische Retikulum blau, wohingegen die Gegenfärbung mit Eosin eosinophile Strukturen, zum Beispiel Zellplasmaproteine, rot anfärbt. Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 2 angegeben.

#### 2.4.1.2 Protokoll der Hämatoxilin-Eosin Färbung

Schritt	Aktivität	Zeit	Temperatur
1.	Benetzung des Gewebeschnittes mit Hämatoxilin-Lösung, Inkubation	10 min	RT
2.	Mehrfach Spülen mit PBS	-	RT
3.	Überschichten des Gewebeschnittes mit Eosin-Lösung, Inkubation	6 min	RT
4.	Waschen in 95 Vol% Alkohol	-	RT
5.-6.	Waschen in 100 Vol% Alkohol	-	RT
7.	In Xylol baden	5 min	RT
8.	Eindeckeln	-	RT

*Tabelle 2: Färbeprotokoll der Hämatoxilin-Eosin Färbung.*

## 2.4.2 Immunhistochemie

### 2.4.2.1 Prinzip und Methodik immunhistologischer Färbungen

Grundprinzip der Immunfluoreszenz ist die Bindung spezifischer Antikörper (AK) an antigene Komponenten und somit deren Markierung in Zellen und Gewebeschnitten.

Während bei der direkten Färbemethode der Antikörper selbst mit einem Farbstoff gekoppelt ist und somit die Markierung sichtbar macht, ist bei der indirekten Färbemethode ein weiterer, sogenannter zweiter Antikörper (Sekundäntikörper) nötig. Dieser bindet an den primären Antikörper (Strukturantikörper) und ist seinerseits mit fluoreszierendem Farbstoff gekoppelt. Dieser Farbstoff kann mit Hilfe von Licht verschiedener Wellenlängen sichtbar gemacht werden, wobei diverse Filter verschiedener Wellenlängen eine spezifische Darstellung ermöglichen. Eine Übersicht der in dieser Studie verwendeten Farbstoffe gibt Tabelle 3.

### 2.4.2.2 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und deren Anregungsbereiche

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungsbereich/Wellenlänge	Farbe
CY2-conjugated Streptavidin	488	Grün
CY3-conjugated Streptavidin	550	Rot
4'6-Diamidino-2'-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	359	Blau
Deep-red-fluorescing bisalkylaminoanthraquinone (DRAQ5)	679	(Pseudo-) Blau

*Tabelle 3: Verwendete Farbstoffe und deren Anregungsbereiche.*

### 2.4.3 Technischer Ablauf

Alle Proben wurden in jeweils identischer Technik histologisch mittels direkter und/oder indirekter Immunhistochemie aufgearbeitet und gefärbt, um zuverlässig vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Zur Sicherung der Qualität und zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit innerhalb der Färbereihen wurde eine Standardisierung bezüglich des zeitlichen Ablaufs (Trockenzeiten, Einwirkzeiten der unterschiedlichen Lösungen et cetera) sowie der genutzten Medien (Antikörper- und Farbstofflösungen, Konzentrationen, Spüllösungen, pH-Werte et cetera) vorgenommen.

### 2.4.3.1 Herstellung immunhistologischer Präparate

#### 2.4.3.1.1 Gewebeschnitte

Nach Einbettung in Tissue-Tec® Einbettmedium und Aufblockung auf Metallhalter wurde das zuvor entnommene Gewebe in einem Kryotom (Leica® Kryostat CM3000, der Firma Leica Microsystems®) in 4-6 µm dicke Schnitte geschnitten und dann auf zuvor mit Silikon beschichtete Objektträger der Marke Menzel® (Super Frost) aufgebracht. Eine detaillierte Aufstellung der Einstellungen des Kryotoms gibt Tabelle 4.

Objekttemperatur	-26° Celsius
Kühltemperatur	-28° Celsius
Objekttischtemperatur	-21° Celsius
Schichtdicke	6 µm

*Tabelle 4: Einstellungen des Kryotoms.*

#### 2.4.3.1.2 Fixierung

Die Auswahl des jeweiligen Fixierungsverfahrens war von dem verwendeten Antikörper und dessen unterschiedlich starken Affinität gegenüber der spezifischen Bindungsstelle abhängig.

Unmittelbar nach dem Schneiden wurden die Schnitte daher entweder mit Aceton oder mit Paraformaldehyd (PFA) 4 % fixiert.

PFA-fixierte Schnitte wurden nach zehn Minuten Fixierung für zwei Mal drei Minuten in PBS-Lösung gewaschen.

#### 2.4.3.1.3 Färbung

Die individuellen immunhistochemischen Färbungen sind in detaillierten Protokollen (2.4.6) aufgeführt.

#### 2.4.3.1.4 Lagerung und Konservierung

Die Präparate wurden bei 4° Celsius in speziellen Lagerungsmappen bedeckt und vor Tageslicht geschützt in einem Kühlschrank gelagert, um Veränderungen der morphologischen Struktur und Intensitätsverlust der Fluoreszenzfärbung vorzubeugen.

## 2.4.4 Technisches Gerät

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Darstellung immunhistologisch-markierter Strukturen.

Um eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle Präparate mit identischen technischen Geräten ausgewertet und bewertet. Hierbei fanden Fluoreszenzmikroskope der Firma Leitz® Verwendung.

### 2.4.4.1 Fluoreszenzmikroskop

Zur Beurteilung der Präparate wurde ein Fluoreszenzmikroskop des Typs DM-RB der Firma Leitz® genutzt. Strahlungsquelle war eine 100 Watt Quecksilber-Dampf-Lampe, deren emittierte Strahlung durch Filter verschiedener Wellenlängen von oben auf das Präparat geleitet wurde. Die verwendeten Filter ermöglichten eine spezifische Darstellung antikörpermarkierter Strukturen. Die in diesem Zusammenhang eingesetzten Okulare sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Objektiv/Okular	Vergößerung/Brennweite	Hersteller
PL Fluortar	25x/0,75 Oil	Leica Microsystems®
PL Fluortar	40x/1,00 – 0,50 Oil	Leica Microsystems®
HCX PL APO	63x/1,32 – 0,60 Oil	Leica Microsystems®
Okkular	10x/25 L-Plan	Leica Microsystems®

*Tabelle 5: Optischer Apparat Leica® DM-RB.*

### 2.4.4.2 Konfokale Mikroskopie

Die Schnitte wurden mittels eines konfokalen Lasermikroskops vom Typ TCS NT der Firma Leica® untersucht. Das Mikroskop war mit Argon/Krypton und Helium/Neon Lasern ausgestattet, die eine Signalseparation von FITC oder Cy2, von TRITC oder Cy3 und von DRAQ5 Fluoreszenz ermöglichten. Digitale Bilder wurden mittels dreier konfokaler Detektoren für reflektierte Fluoreszenz und einem Detektor für Licht dargestellt.

Folgendes Objektiv wurde hierbei verwendet:

Leica® PL Fluotar x10/0.30, x16/0.5, x25/0.75, x40/1.00-0.50.

### 2.4.4.3 Digitale Fotografie

Für die Erstellung digitaler Fotografien der Präparate fand das digitale Bildaufnahmesystem DC-200 der Firma Leica Microsystems® in Kombination mit dem digitalen Bildaufnahmeprogramm IM500 und dem oben genannten Mikroskop Leitz® DM-RB Anwendung. Die digitalen Fotografien hatten dabei eine Auflösung von mindestens 1024 x 1024 Pixel.

### 2.4.5 Antikörper

Die verwendeten Antikörper und Detektionssysteme sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgelistet. Sie wurden mit Ausnahme des BNP-Antikörpers kommerziell hergestellt.

#### 2.4.5.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Host	Fixierung	Verdünnung	Hersteller	ProductID
Kollagen I	Rabbit	PFA 4 %	1: 100	Rockland	600-406-103
Kollagen III	Rabbit	PFA 4 %	1:100	Rockland	600-401-105
Kollagen VI	Rabbit	PFA 4 %	1:50	Rockland	600-401-108
PECAM (CD31)	Mouse	PFA 4 %	1:50	Dako	M0823
Alpha-Aktinin 1 Clon EA 53.3	Mouse	PFA 4 %	1:50	Sigma	A7811
Alpha-Aktinin 2 Clon BM 75.2	Mouse	PFA 4 %	1:100	Sigma	A5044
Fibronectin	Rabbit	PFA 4 %	1:100	ICN	688062
PIP amino-terminal	Rat	PFA 4 %	1:1000	Chemicon	MAB1912
PIIP amino-terminal	Mouse	PFA 4 %	1:100	Abcam	Ab21302
ANP	Rabbit	PFA 4 % (ad.Triton 0,1%)	1:100	Abcam	AB5490
BNP	Mouse			Nicht gewerblich	N/A

**Tabelle 6:** Primäre Antikörper (Strukturantikörper).

### 2.4.5.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Host	Verdünnung	Hersteller	Bemerkung
anti-donkey-Biotin	Rat	1:100	Jackson ImmunoResearch	Sekundärantikörper
anti-donkey-Biotin	Rabbit	1:100	Jackson ImmunoResearch	Sekundärantikörper
anti-donkey-Biotin	Mouse	1:100	Jackson ImmunoResearch	Sekundärantikörper

*Tabelle 7: Sekundäre Antikörper.*

### 2.4.5.3 Farbstoffe

Farbstoff	Verdünnung	Hersteller	Bemerkung
CY2-conjugated-Streptavidin	1:100	Rockland	Fluoreszenzfarbstoff
4'6-Diamidino-2'-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	1:1000	Invitrogen	Kernfarbstoff
Phalloidin FITC Labeled	1:300	Sigma	Fluoreszenz-Aktin-Farbstoff
Deep-red-fluorescing bisalkylaminoanthraquinone	1:1000	Invitrogen	Fluoreszenzfarbstoff

*Tabelle 8: Farbstoffe.*

### 2.4.5.4 Hilfssubstanzen

#### 2.4.5.4.1 Phosphate balanced salt solution

Phosphate balanced salt solution (PBS-Lösung) ist eine Puffersubstanz und wird in Laboratorien eigenständig produziert und eingesetzt.

Zur Herstellung einer Stock-Lösung wurden folgende Inhaltsstoffe verwendet:

5 Liter destilliertes Wasser + 397,4 g NaCl  
 + 10,0 g KCL  
 + 10,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 + 88,75g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

Diese Stocklösung wurde durch Verdünnung mit 4,5 Liter destillierten Wassers und Einstellung auf einen pH-Wert von 7,4 zur gebrauchsfertigen Lösung fertiggestellt.

### 2.4.5.4.2 Mowiol Einbettmedium

Zur Einbettung der histologischen Schnitte wurde das Einbettmedium Mowiol verwendet.

Herstellung und Zusammensetzung von Mowiol:

1. 4 ml PBS-Lösung + 1 g Mowiol 16 Stunden miteinander verrühren
2. 2 ml H<sub>2</sub>O-freies Glycin zugeben und wieder 16 Stunden verrühren lassen
3. 15 Minuten bei 12000 rpm zentrifugieren
4. Überstand abgießen
5. Gebrauchsfertiges Mowiol (bis zur Verwendung Lagerung bei 4° Celsius)

### 2.4.6 Färbeprotokolle Immunhistochemie

Detaillierte Färbeprotokolle spezieller immunhistochemischer Färbungen sind in Tabelle 9 bis Tabelle 14 aufgeführt.

#### 2.4.6.1 Bestandteile der Extrazellulärmatrrix

##### Färbeprotokoll Extrazellulärmatrrix exemplarisch

Schritt	Substanz	Verdünnung	Zeit	Temperatur
Inkubation	variabel, 2.4.4.1	variabel	24 h	6° Celsius
Waschen	PBS-Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	variabel, 2.4.4.2	variabel	2 h	RT
Waschen	PBS-Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	variabel, 2.4.4.3	variabel	1 h	RT
Waschen	PBS-Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Kernfärbung DAPI	1:1000	10 min	RT
Waschen	PBS-Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Einbettung	Mowiol			RT

**Tabelle 9:** Färbeprotokoll zur immunhistochemischen Darstellung der Bestandteile der Extrazellulärmatrrix.

## 2.4.6.2 Marker der zellulären Degeneration

### 2.4.6.2.1 Alpha-Aktinin 1

#### Färbeprotokoll Alpha-Aktinin 1 (Clon BM 75.2)

Schritt	Substanz	Verdünnung	Zeit	Temperatur
Inkubation	Alpha-Aktinin-IG Clone BM 75.2 [Sigma] F schema	1:50	24 h	6° Celsius
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Donkey-Anti- Mouse-IG CY2	1:100	1 h	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	CY2-Streptavidin	1:100	1 h	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Kernfärbung DAPI	1:1000	10 min	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Eindeckeln	Mowiol			RT

*Tabelle 10: Färbeprotokoll zur Anfertigung einer immunhistochemischen Färbung von Alpha-Aktinin 1 mithilfe des Antikörpers Clon BM 75.2.*

### 2.4.6.2.2 Alpha-Aktinin 2

#### Färbeprotokoll Alpha-Aktinin 2 (Clon EA 53.3)

Schritt	Substanz	Verdünnung	Zeit	Temperatur
Inkubation	Alpha-Aktinin-IG Clone EA-53 [Sigma]	1:50	24 h	6° Celsius
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Donkey-Anti- Mouse-IG CY2	1:100	1 h	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT

Inkubation	CY2-Streptavidin	1:100	1 h	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Kernfärbung DAPI	1:1000	10 min	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Eindeckeln	Mowiol			RT

**Tabelle 11:** Färbeprotokoll zur Anfertigung einer immunhistochemischen Anfärbung von Alpha-Aktinin 2 mithilfe des Antikörpers Clon EA 53.3.

### 2.4.6.3 Kapillardichte

<b>Färbeprotokoll Kapillardichte, PECAM</b>				
<b>Schritt</b>	<b>Substanz</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Inkubation	PECAM (CD31) [Dako]	1:50	24 h	6° Celsius
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Donkey-Anti- Mouse-IG CY2	1:300	30 min	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	CY2-Streptavidin	1:100	1h	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Kernfärbung DAPI	1:1000	10 min	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Eindeckeln	Mowiol			RT

**Tabelle 12:** Färbeprotokoll zur Anfertigung einer immunhistochemischen Anfärbung von Endothelzellen.

## 2.4.6.4 Natriuretische Hormone

### 2.4.6.4.1 B-Typ natriuretisches Peptid

#### Färbeprotokoll B-Typ natriuretisches Peptid, BNP

Schritt	Substanz	Verdünnung	Zeit	Temperatur
Inkubation	Mouse-Ascitis Fluid Anti-BNP	1:1000	24 h	6° Celsius
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Donkey-Anti- Mouse-CY2	1:100	1 h	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x5 min	RT
Inkubation	CY2-Streptavidin Draq5 TRITC-Phalloidin	1:1000	45 min	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x10 min	RT
Eindeckeln	Mowiol			RT

*Tabelle 13: Färbeprotokoll zur Anfertigung von immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten zur Darstellung des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP).*

### 2.4.6.4.2 Atrial-natriuretisches Peptid

#### Färbeprotokoll Atriales-natriuretisches Peptid, ANP

Schritt	Substanz	Verdünnung	Zeit	Temperatur
Inkubation	Vimentin Anti- Mouse-IG-CY3- conjugated [Sigma]	1:400	24 h	6° Celsius
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Phalloidin FITC Aktinfärbung	1:300	30 min	RT
Waschen	PBS- Gebrauchslösung		3x3 min	RT
Inkubation	Kernfärbung DAPI	1:1000	10 min	RT

Waschen	PBS- Gebrauchslösung	3x3 min	RT
Eindeckeln	Mowiol		RT

**Table 14:** *Färbeprotokoll zur Anfertigung von immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten zur Darstellung des Atrialen-natriuretischen Peptids (ANP).*

#### 2.4.7 Morphometrie, Auswertung der Immunhistochemie

Die lichtmikroskopische morphometrische Untersuchung erfolgte an einem Aristoplan-Mikroskop oder an einem DM-Mikroskop der Firma Leitz®.

Dazu wurden für jeden Patienten sechs Gesichtsfelder von Schnitten, die zuvor für Fibronectin angefärbt worden waren, ausgewertet. Diese Gesichtsfelder wurden nach dem „random sampling“ Prinzip ausgewählt. Die Bestimmung des Fibrosegrades ( $V_{\text{fib}}$ ) erfolgte bei einer 250-fachen Vergrößerung. In einem Okular des Mikroskopes befand sich ein quadratisches Raster mit 144 Schnittpunkten, von denen schließlich 121 Schnittstellen zur Auswertung kamen. Nach den Prinzipien der Morphometrie werden die Schnittpunkte, die über dem zu zählenden Gewebsanteil lagen, gezählt und der Fibrosegrad als Prozent von diesen 121 Schnittpunkten ausgerechnet. Als Fibrose wurde das zwischen den Muskelfasern liegende Bindegewebe definiert, wobei Gefäße ausgeschlossen wurden.

Das gleiche Verfahren wurde angewandt, um die Prozentwerte für Kollagen I, III und VI sowie für die Prokollagene PIP und PIIP zu bestimmen.

Die Kapillardichte wurde an PECAM gefärbten Schnitten quantifiziert. Dabei wurden in sechs Gesichtsfeldern die Anzahl der Kapillaren bestimmt und schließlich auf  $\text{n/mm}^2$  umgerechnet.

## 2.5 *In situ* Hybridisierung

### 2.5.1 Anwendung in dieser Studie

Der Nachweis für die kardiale Expression von BNP im Myokard erfolgte mittels *In situ* Hybridisierung. Hierbei wurden exemplarisch einige Gewebeproben des Studienkollektivs

---

untersucht. Die Durchführung der *In situ* Hybridisierung in dieser Studie kann detailliert dem Protokoll unter Tabelle 15 entnommen werden.

### 2.5.2 Prinzip der *In situ* Hybridisierung

Mit Hilfe der *In situ* Hybridisierung können Nukleinsäuren spezifisch dargestellt werden. Das Prinzip der *In situ* Hybridisierung besteht darin, spezifische Poly- beziehungsweise Oligonukleotide, sogenannte Sonden, an eine gesuchte, komplementäre Gensequenz im Genom zu binden und diese dadurch zu detektieren. Die Sonde selbst ist hierbei markiert, wodurch mittels Mikroskopie eine Visualisierung gelingt.

### 2.5.3 Herstellung der DIG-markierten Sonde

Jeweils 40 µg Plasmid-DNA wurden mit HindIII beziehungsweise XhoI linearisiert. Nach einer Reinigung (Qiaquick Purification Kit, Qiagen) wurden nach dem Protokoll des DIG RNA Labeling Kits (SP6/T7) von Roche 1 µg linearisiertes Plasmid in einfach Transkriptionspuffer, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0,65 mM UTP, 0,35 mM DIG-11-UTP, 20 U RNase Inhibitor und 40 U SP6 RNA Polymerase (HindIII-Fragment) beziehungsweise T7 RNA Polymerase (XhoI-Fragment) *in vitro* transkribiert.

Die Sonde wurde freundlicher Weise von Dr. Izabela Piotrowska bereitgestellt.

### 2.5.4 Verwendete Substanzen

Für die *In situ* Hybridisierung wurden folgende Lösungen benötigt:

10x PBS: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

4 % PFA: 4 % PFA in PBS

Essigsäureanhydrid in TEA: 125 mM TEA, 25 mM Essigsäureanhydrid in DEPC H<sub>2</sub>O

Proteinase K: 1 µg/ml in PBS

Glycin: 2 mg/ml PBS

Prähybridisierungspuffer: 50 % Formamid, 5x SSC pH 4,5, 50 µg/ml Hefe RNA, 1 % SDS, 50 µg/ml Heparin

20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>citrat, pH 4,5

Lösung 1: 50 % Formamid, 5x SSC, 1 % SDS

Lösung 3: 50 % Formamid, 2x SSC

10 x TBS: 2 M NaCl, 25 mM KCl, 250 mM Tris, pH 7,5

TBST + Levamisol: einfach TBS, 1 % Tween 20, 2 mM Levamisol (Tetramisol-Hydrochlorid)

NTMT: 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris pH 9,5, 0,1 % Tween 20, 2 mM Levamisol

NBT/BCIP in NTMT: 4,5 µl/ml NBT, 3,5 µl/ml BCIP

Vorbehandlung des Antikörpers:

6 mg pulverisiertes Mausgewebe/ml TBST für 30 min bei 70° Celsius inkubieren,

+ 10 µl Schafserum (inaktiv)

+ 2 µl Anti-DIG Antikörper

1h bei 4° Celsius schütteln, 10 Minuten bei 4° Celsius mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren

Überstand auf 4 ml mit TBST (1 % Schafserum) auffüllen.

### 2.5.5 Protokoll der *In situ* Hybridisierung

#### Protokoll *In situ* Hybridisierung

1	Xylol	2x3 min	RT
2	100 % Ethanol	2x3 min	RT
3	95 % Ethanol	3 min	RT
4	70 % Ethanol	3 min	RT
5	50 % Ethanol	3 min	RT
6	4 % PFA	15 min	RT
7	PBS	5 min	RT
8	Proteinase K	10-15 min	RT
9	Glycin	10 min	RT
10	PBS	5 min	RT
11	PFA	15 min	RT
12	Essigsäureanhydrid in TEA	10 min	RT
13	PBS	2x5 min	RT
14	Prähybridisierungspuffer	15 min	65°
15	Sonde (50-150 µl/Objektträger)	über Nacht	65°

16	mit Lösung 1 (65° Celsius) Deckgläser abspülen	kurz	65°
17	Lösung 1	15 min	65°
18	Lösung 1	30 min	65°
19	Lösung 3	15 min	65°
20	Lösung 3	30 min	65°
21	TBST + Levamisol	3x10 min	RT
22	5 % Schafserum in TBST	30 min	RT
23	Anti-DIG-AP in TBST (150 µl/Objekträger)	über Nacht	4°
24	Mit TBST Deckgläser abspülen	kurz	RT
25	TBST + Levamisol	2x30 min	RT
26	NTMT	3x10 min	RT
27	NBT/BCIP in NTMT	über Nacht	RT
28	STOP: 4 % PFA	über Nacht	4°
29	PBS	15 min	RT
30	Eindeckeln oder Eosin-Färbung		RT

**Tabelle 15:** Protokoll der *In situ* Hybridisierung (Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch Dr. K. Troidl, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim).

## 2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS Statistics Version 16.0 (SPSS Inc, IBM Company), PASW Statistics Version 18.0 (IBM Company) und Prism Version 4.0c (GraphPad). Die Analysen waren zunächst rein deskriptiv (Mittelwerte, 95 %-Konfidenzintervalle, Standard Error of the Mean (SEM)). Der Kolmogorov-Smirnov Test und der Shapiro-Wilk Test wurden zur Untersuchung auf Normalverteilung verwendet.

Sofern keine Normalverteilung vorlag wurden Korrelationen nach Spearman berechnet. Ebenfalls wurde der Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben verwendet, um zu untersuchen, ob die Mediane der zugrunde liegenden Populationen identisch sind. Alle Untersuchungen wurden auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  durchgeführt.

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der präoperativen klinischen Evaluation des Studienkollektivs

Insgesamt wurden 31 Patienten in die Gruppe des Studienkollektivs eingeschlossen. Die Auswertung der präoperativen Evaluation des Studienkollektivs ergibt ein Durchschnittsalter von  $62,6 \pm 23,2$  Jahren und ein homogenes Geschlechterverhältnis von 15 männlichen versus 16 weiblichen Probanden.

Alle Probanden litten per definitionem zum Zeitpunkt der Untersuchung unter einer hochgradigen Aortenstenose (KÖF  $0,65 \pm 0,18$  cm<sup>2</sup>, AVAI  $0,34 \pm 0,023$ ,  $\Delta P_{\text{mean}}$   $60 \pm 14$  mmHg).

Bei einer durchschnittlichen Ejektionsfraktion von  $61 \pm 10$  % konnte von einer erhaltenen systolischen Herzfunktion ausgegangen werden. Die Mehrzahl der Studienpatienten ( $n=28$ , 90,3 %) konnte präoperativ in die NYHA-Klassen II oder III eingestuft werden. Zwei (6,5 %) Studienpatienten wurde NYHA I, ein (3,2 %) Patient wurde NYHA IV klassifiziert. Bei keinem der Probanden kam es im Vorfeld der Operation jemals zu einer Dekompensation kardialer Genese.

Die Erfassung der spezifischen kardialen Diameter und Druckverhältnisse entsprach im Allgemeinen der Norm. Kein Patient war zum Zeitpunkt der Datenerhebung niereninsuffizient. 20 (64,5 %) Probanden litten präoperativ unter einem manifesten arteriellen Hypertonus, drei (9,7 %) litten und einem permanenten Vorhofflimmern (sonst bestanden keine weiteren kardialen Arrhythmien). Die präoperative medikamentöse Einstellung der Patienten erfolgte standardisiert mit Diuretika, Beta-Blocker oder Hemmstoffen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (ACEI).

Eine detaillierte Aufstellung und Charakterisierung der Studienkollektivs ist in Tabelle 16 gegeben.

Auf die detaillierte Beschreibung der Ergebnisse der MRT-Untersuchungen wird in dieser Arbeit verzichtet. Die Auswertung dieser Datensätze ist Inhalt einer gesonderten wissenschaftlichen Arbeit und wird dort in einen erweiterten Kontext gesetzt.

Parameter		Studienkollektiv
n		31
Alter, Jahre		62,6±23,2
Männer/Frauen		15m/16w
BMI		27,3±4
EF %		61±10
NYHA	I	2 (6,5 %)
	II	15 (48,4 %)
	III	13 (41,9 %)
	IV	1 (3,2 %)
$\Delta P_{\text{mean AV}}$ , mmHg		60±14
KÖF AV, cm <sup>2</sup>		0,65±0,18
AVA Index (AVAI)		0,34±0,023
LVEDP, mmHg		21±9,1
PAPmean, mmHg		22±9,1
PCWP, mmHg		14±8,3
LVEDD, mm		48±5,7
LVESD, mm		31±6,7
LV Masse/m <sup>2</sup>		145±33
Kreatinin, mg/dl		0,9±0,22
Hypertonie, n		20 (64,5 %)
LV Dekompensation, n		0
VHF, n		3 (9,7 %)
ACEI, n		10 (32,3 %)
Beta-Blocker, n		12 (38,7 %)
Diuretikum, n		12 (38,7 %)

**Table 16:** Tabellarische Darstellung der präoperativen klinischen Evaluation der Patienten des Studienkollektivs.

## 3.2 Allgemeine Histologie

### 3.2.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

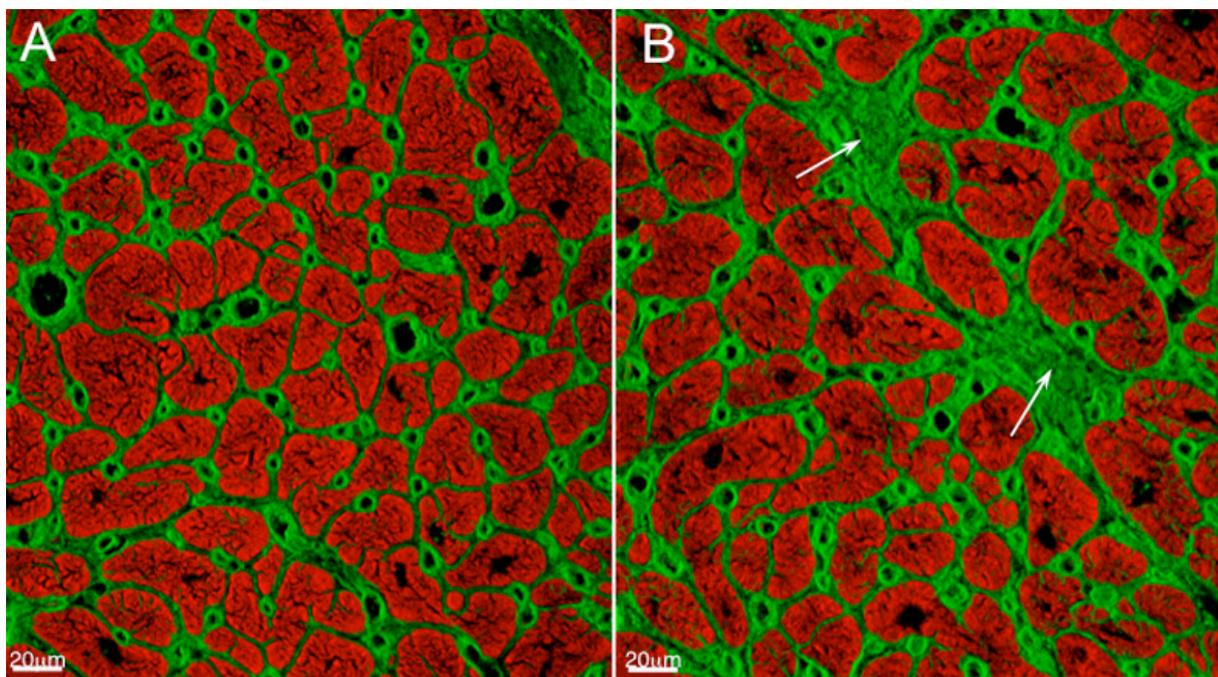
In der HE-Färbung zeigte sich eine Vergrößerung der Myozyten im Sinne einer zellulären Hypertrophie bei gleichzeitiger Vermehrung der Extrazellulärmatrix im Sinne einer kardialen Fibrosierung. Diese Veränderungen fehlten im Kontrollgewebe.

## 3.3 Spezielle Histologie, Immunhistochemie

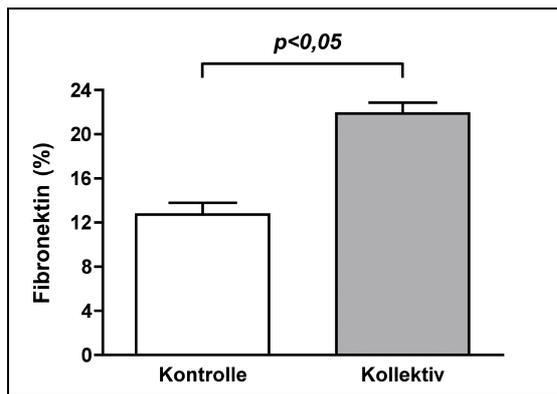
### 3.3.1 Extrazellulärmatrix

#### 3.3.1.1 Fibronektin

Die Darstellung der Grundsubstanz im Extrazellulärraum gelang durch spezifische Färbung von Fibronektin. Abbildung 6 zeigt die repräsentativen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung, Abbildung 7 die quantitative Analyse.



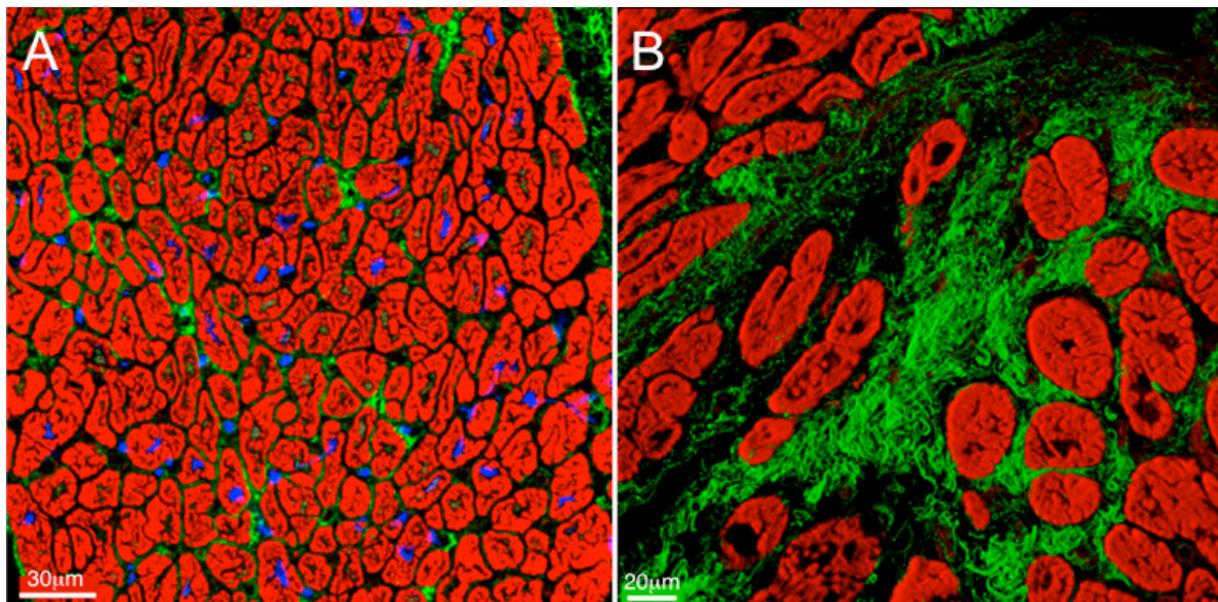
**Abbildung 6:** Immunhistochemischer spezifischer Nachweis der extrazellulären Grundsubstanz durch Fibronektin. **A** Anfärbung der extrazellulären Grundsubstanz (grün) im Kontrollgewebe. **B** Verstärkter Nachweis von Fibronektin (Pfeil) im Gewebe des Studienkollektivs. (Rot=F-Aktin).



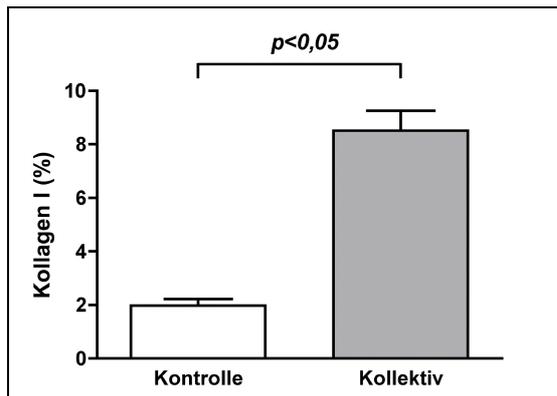
**Abbildung 7:** Quantitativer Nachweis von Fibronektin in der EZM mittels IHC (prozentual), Kontrolle versus Studiengruppe. Messergebnis in der Kontrollgruppe 12,7±1,0 %, Studiengruppe 21,9±0,97 %,  $p < 0,05$ .

### 3.3.1.2 Kollagen I

Das fibrilläre Faserprotein Kollagen I wurde spezifisch angefärbt. Abbildung 8 zeigt repräsentative Fotografien der Färbung von Kollagen I, Abbildung 9 die quantitative Auswertung.



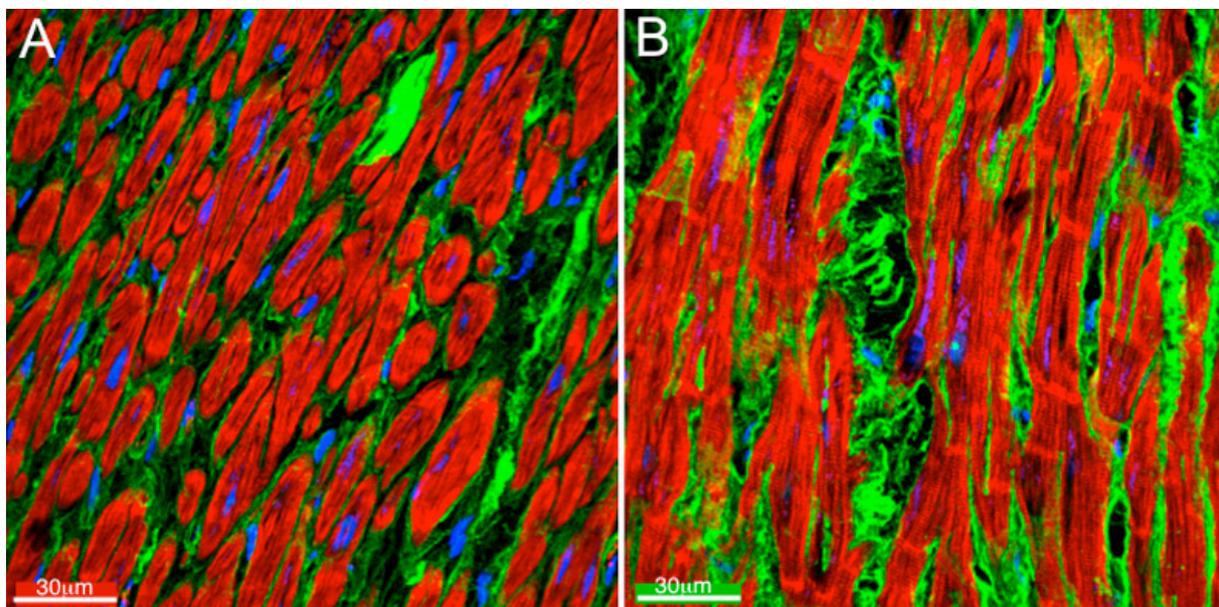
**Abbildung 8:** Immunhistochemischer spezifischer Nachweis des fibrillären Kollagen I. **A** Physiologisch ist im Vergleich zum myokardialen Parenchym eine geringere Menge an grün markiertem Kollagen I im Kontrollgewebe vorhanden. **B** Verstärkter Nachweis von Kollagen I (grün) im Gewebe des Studienkollektivs. (Rot=F-Aktin).



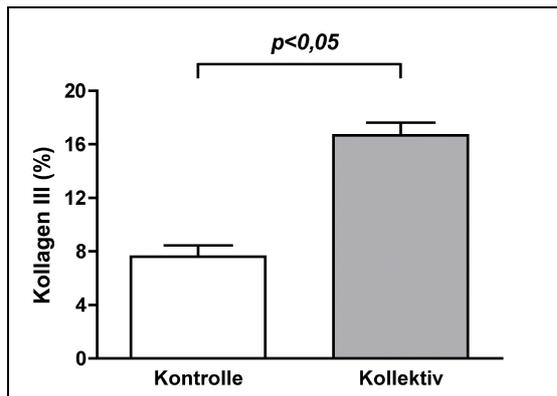
**Abbildung 9:** Quantitativer Nachweis von Kollagen I in der EZM mittels IHC (prozentual), Kontrolle versus Studiengruppe. Messergebnis in der Kontrollgruppe  $1,95 \pm 0,24$  % versus Studiengruppe  $8,51 \pm 0,74$  %,  $p < 0,05$ .

### 3.3.1.3 Kollagen III

Kollagen III besteht aus feineren Fasern als Kollagen I und kann als globuläres Kollagen mit Kollagen I kopolymerisieren. Exemplarische digitale Fotografien sind in Abbildung 10 gezeigt, die quantitative Auswertung der Gewebeschnitte nach Immunfärbung ist in Abbildung 11 abgebildet.



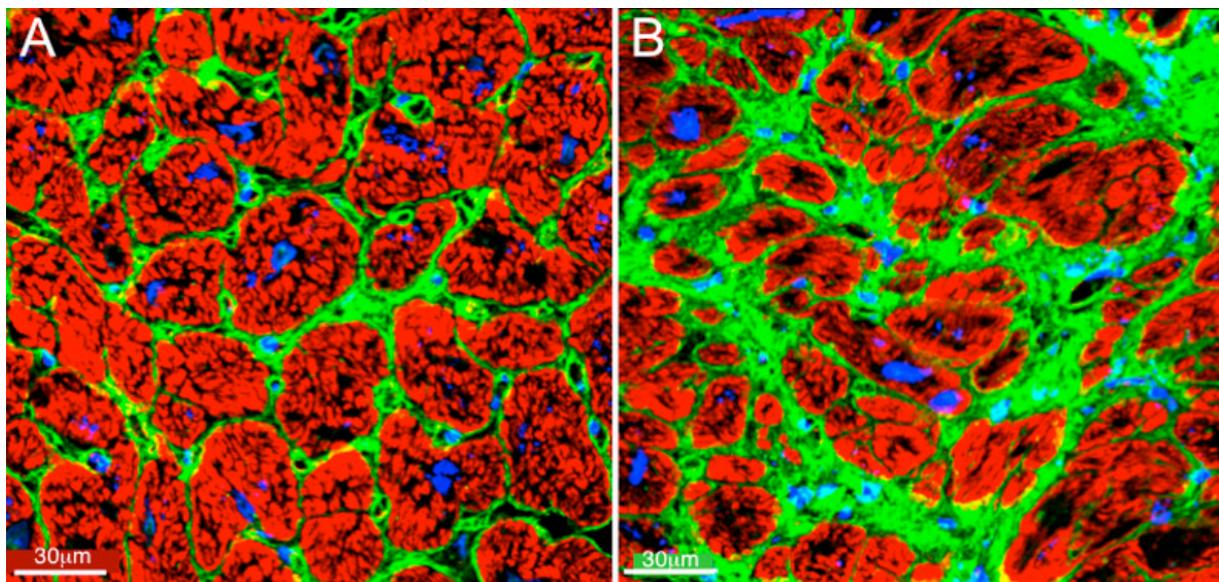
**Abbildung 10:** Immunhistochemische Darstellung von Kollagen III. **A** Physiologischer Grad an markierter Kollagen-I Fraktion (grün) in der Kontrolle. **B** Verstärkter Nachweis von Kollagen III (grün) im Gewebe des Studienkollektivs bei verminderter Myokarddichte. (Rot=F-Aktin).



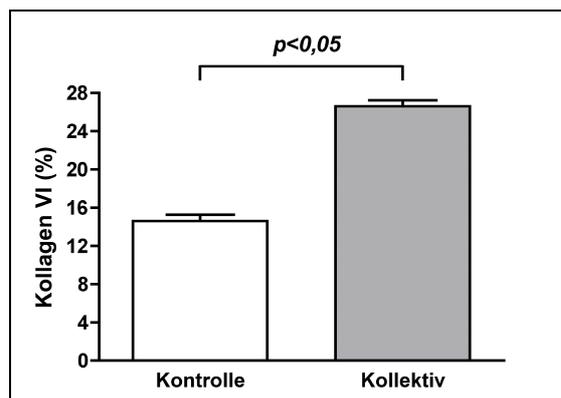
**Abbildung 11:** Quantitativer Nachweis von Kollagen III in der EZM mittels IHC (prozentual), Kontrolle versus Studiengruppe. Messergebnis in der Kontrollgruppe  $7,60 \pm 0,84$  % versus Studiengruppe  $16,67 \pm 0,95$  %,  $p < 0,05$ .

### 3.3.1.4 Kollagen VI

Kollagen VI ist ein Vertreter der nicht-fibrillären Kollagene. Abbildung 12 zeigt die Morphologie nach Immunhistochemie, Abbildung 13 die quantitative Auswertung der Gewebeschnitte.



**Abbildung 12:** Spezifischer Nachweis des nicht-fibrillären Faserproteins Kollagen VI in der EZM mittels IHC. **A** Regelmäßige Anfärbung des extrazellulär nachgewiesenen Kollagen VI (grün) im Kontrollgewebe bei organisierter Myokardstruktur. **B** Verstärkter Nachweis von Kollagen VI (grün) im Gewebe des Studienkollektivs. (Rot=F-Aktin).

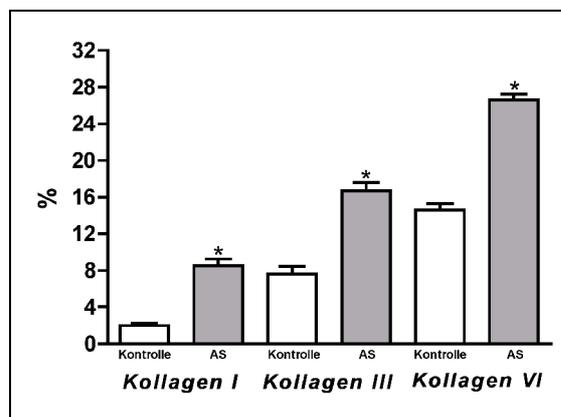


**Abbildung 13:** Quantitativer Nachweis von Kollagen VI in der EZM mittels IHC (prozentual), Kontrolle versus Studiengruppe. Messergebnis in der Kontrollgruppe  $14,59 \pm 0,69$  % versus Studiengruppe  $26,61 \pm 0,62$  %,  $p < 0,05$ .

### 3.3.1.5 Übersicht Kollagen I-VI

Abbildung 14 gibt einen vergleichenden Überblick bezüglich des prozentualen Kollagengehaltes in den untersuchten Geweben.

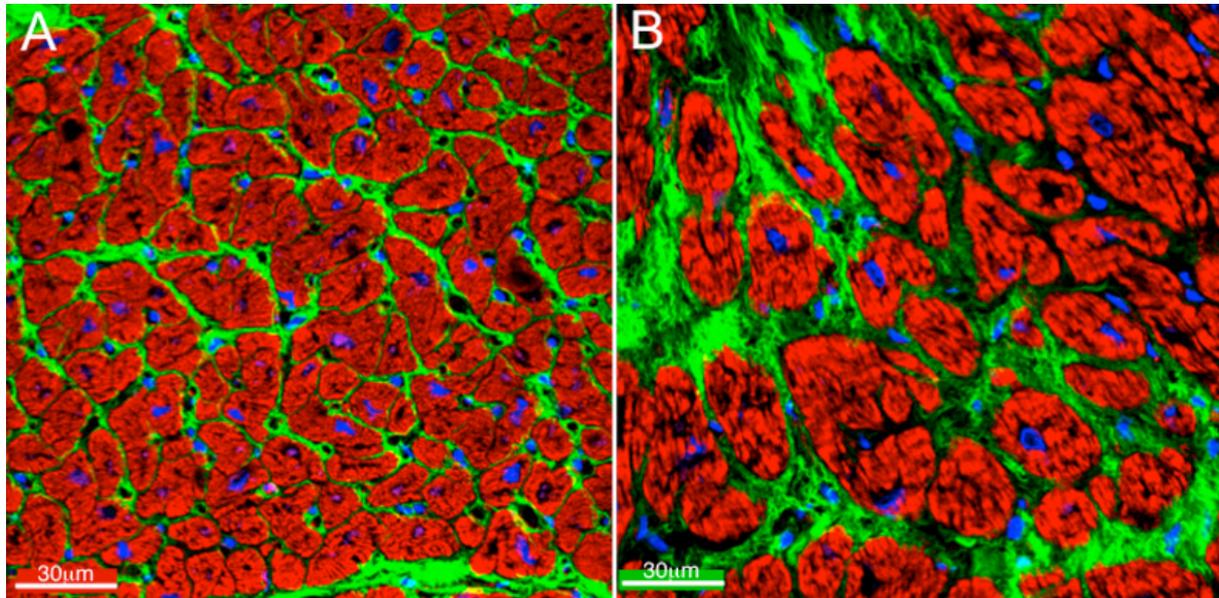
In der quantitativen Analyse zeigt sich folgende Verteilung: Kollagen VI ist im humanen Myokard am stärksten vertreten, gefolgt von Kollagen III und Kollagen I. Diese Verteilung kann sowohl in der Kontroll-, als auch in der Studiengruppe gezeigt werden.



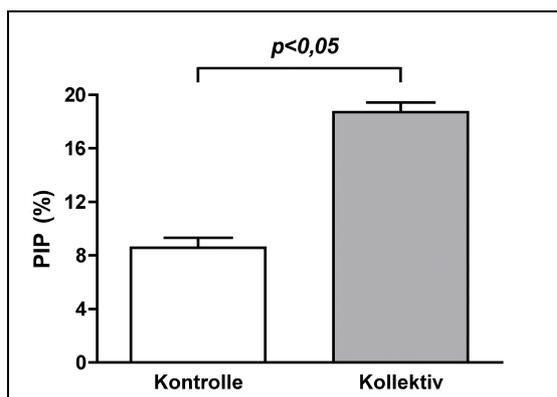
**Abbildung 14:** Vergleichende Übersichtsdarstellung der Kollagene I, III und VI, Kontrolle versus Studiengruppe. In allen drei Messreihen signifikanter Mehrnachweis der spezifischen Kollagene in der untersuchten Studiengruppe (\*  $p < 0,05$  versus Kontrolle).

### 3.3.1.6 Prokollagen-I-Propeptid

Prokollagen-I-Propeptid (PIP) ist als Stoffwechselintermediär ein Indikator für die Synthese von Kollagen I. Die Morphologie des Gewebes nach IHC ist in Abbildung 15 dargestellt, Abbildung 16 zeigt die quantitative Analyse.



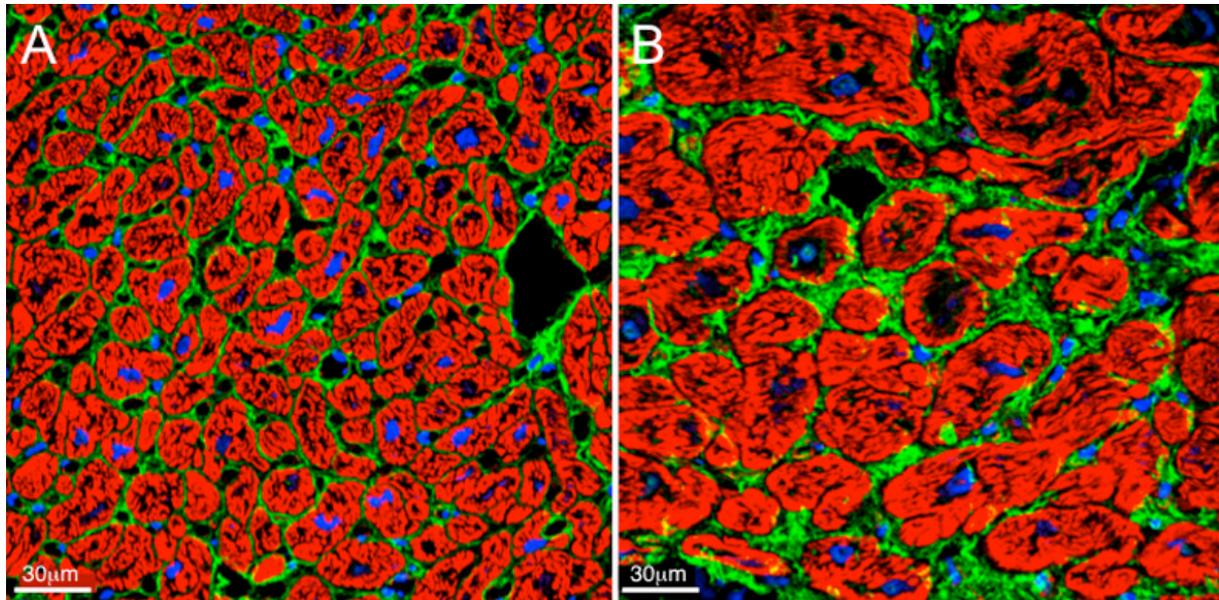
**Abbildung 15:** Spezifischer Nachweis des Prokollagen-I-Propeptids (PIP) mittels IHC. **A** Regelgerechte Anfärbung des extrazellulär nachgewiesenen PIP (grün) im Kontrollgewebe bei organisierter Myokardstruktur. **B** Verstärkter Nachweis von PIP (grün) im Gewebe des Studienkollektivs bei verminderter Myozytendichte. (Rot=F-Aktin).



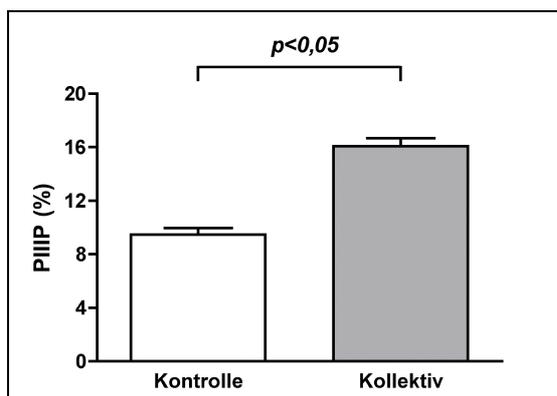
**Abbildung 16:** Quantitativer Nachweis von PIP in der EZM mittels IHC (prozentual), Kontrolle versus Studiengruppe. Messergebnis in der Kontrollgruppe 8,58±0,75 % versus Studiengruppe 18,71±0,70 %,  $p < 0,05$ .

### 3.3.1.7 Prokollagen-III-Propeptid

Prokollagen-III-Propeptid (PIIP) ist ein Indikator für die Neusynthese von Kollagen III. Abbildung 17 gibt Einblick in die Morphologie, Abbildung 18 zeigt die quantitative Analyse.



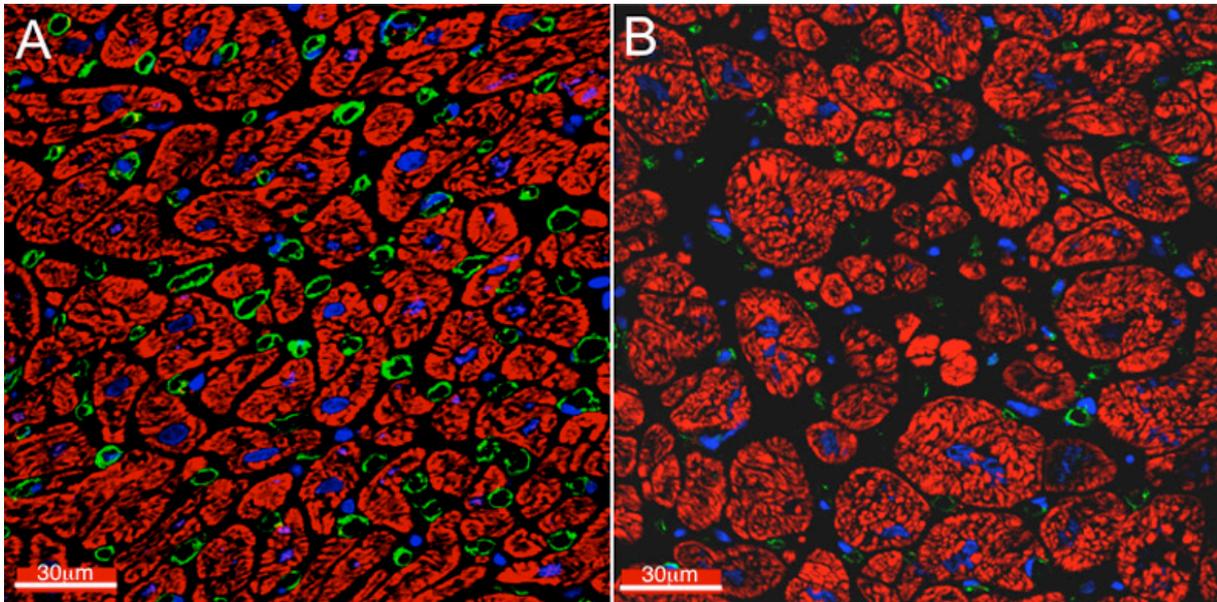
**Abbildung 17:** Spezifischer Nachweis des Prokollagen-III-Propeptids (PIIP) mittels IHC. **A** Regelgerechte Anfärbung des extrazellulär nachgewiesenen PIIP (grün) im Kontrollgewebe bei organisierter Myokardstruktur. **B** Verstärkter Nachweis von PIIP (grün) im Gewebe des Studienkollektivs. (Rot=F-Aktin).



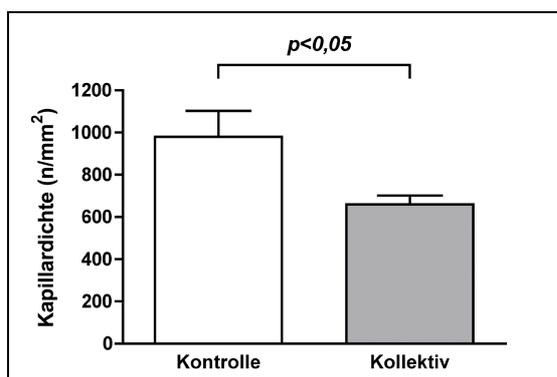
**Abbildung 18:** Quantitativer Nachweis von PIIP in der EZM mittels IHC (prozentual), Kontrolle versus Studiengruppe. Messergebnis in der Kontrollgruppe 9,47 ± 0,48 % versus Studiengruppe 16,70 ± 0,60 %,  $p < 0,05$ .

### 3.3.1.8 Kapillardichte

Der Endothelmarker PECAM (CD31) färbt spezifisch Endothelzellen, wodurch die Darstellung und quantitative Messung der Kapillardichte pro Fläche ( $\text{n/mm}^2$ ) gelingen konnte. Abbildung 19 zeigt die Morphologie, Abbildung 20 die quantitative Auswertung.



**Abbildung 19:** Darstellung und quantitative Messung ( $\text{n/mm}^2$ ) der Kapillardichte mittels Immunhistochemie (PECAM CD31 Antikörper) im myokardialen Probenewebe. **A** Physiologisch hohe Kapillardichte im Kontrollgewebe. **B** Reduzierte Kapillardichte im Myokard des Studienkollektivs. (Rot=F-Aktin).



**Abbildung 20:** Auszählung der Kapillardichte ( $\text{n/mm}^2$ ), Kontrolle versus Studiengruppe. Messergebnis in der Kontrollgruppe  $979 \pm 123 \text{ n/mm}^2$  versus Studiengruppe  $660 \pm 41 \text{ n/mm}^2$ ,  $p < 0,05$ .

---

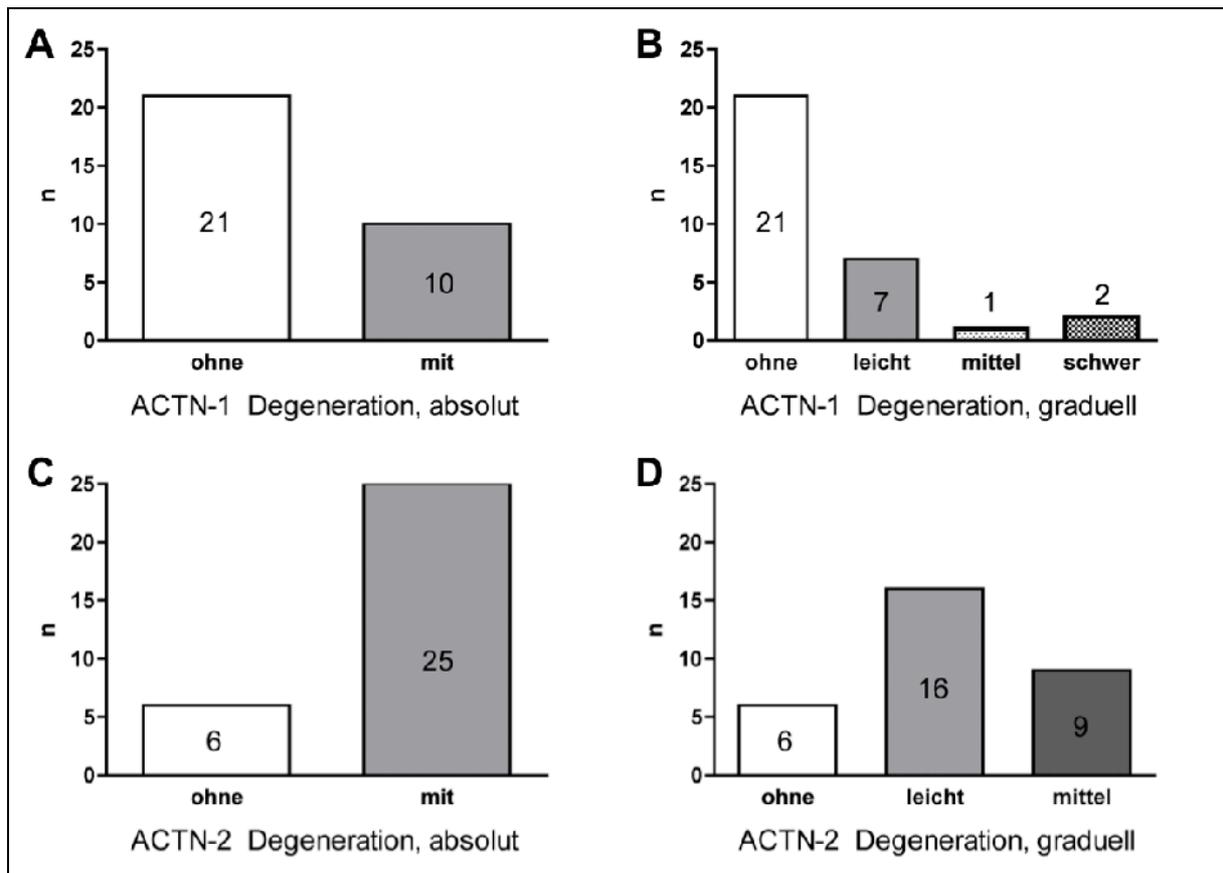
### 3.3.2 Zelluläre Degeneration, Alpha-Aktinin 1 und 2

Alpha-Aktinin (ACTN) ist ein sarkomerisches Gerüstprotein. Die Gruppe der ACTN umfaßt vier verschiedene Subformen (ACTN 1-4). ACTN hält das für die Kontraktion notwendige Aktin in Höhe der Z-Scheibe in einer günstigen Position. Mittels Immunhistochemie gelang eine spezifische Anfärbung des Glattmuskelzell-ACTN-1 und des herzspezifischen ACTN-2. Für die Darstellung kamen die Antikörper-Klone BM 75.2 für ACTN-1 und EA 53.3 für ACTN-2 zur Anwendung. Beide Antikörper hatten sich bereits in vorher durchgeführten Studien als spezifisch und sensitiv gezeigt<sup>23,74</sup>. Das Vorkommen von ACTN-1 in Herzmuskelzellen ist ein Indikator für myokardiale zelluläre Degeneration.

Einen quantitativen und qualitativen Überblick bezüglich der Nachweise von ACTN-1 und ACTN-2 im Gewebe der Studiengruppe gibt Abbildung 21.

Exemplarisch ist der Nachweis der klusterartigen Ansammlungen von ACTN-1 in Abbildung 22 gegeben, der sarkomerische Strukturverlust kann nach spezifischer ACTN-2 Färbung in Abbildung 23 beobachtet werden.

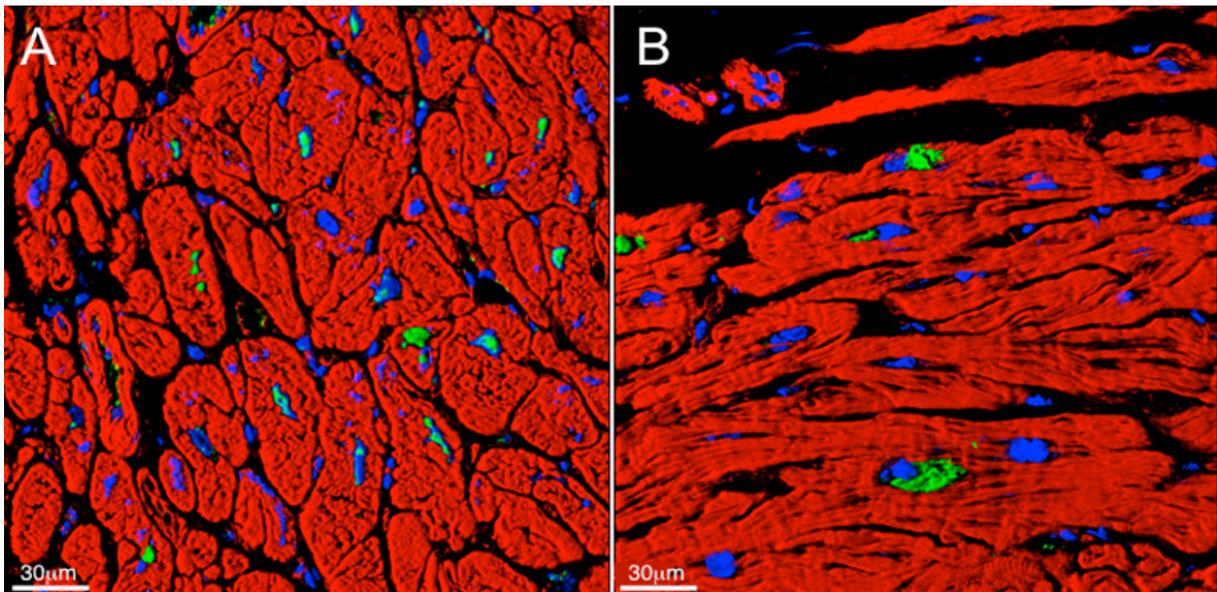
### 3.3.2.1 Quantifikation



**Abbildung 21:** Verteilung (absolut) der Nachweise für strukturelle Degeneration im Studienkollektiv. **A** ACTN-1 konnte in zehn der 31 Patienten positiv nachgewiesen werden. **B** Die zehn für ACTN-1 positiv markierten Patienten ACTN-1 zeigt siebenmal leichtgradige, einmal mittelschwere, und zweimal schwere Degeneration anhand ACTN-1. **C** Myozytendegeneration anhand des Nachweises von desorganisiertem ACTN-2 konnte in 25 der 31 Studienpatienten gezeigt werden. **D** Hierbei 16 mal leicht- und neunmal mittelschwere ACTN-2 Degeneration.

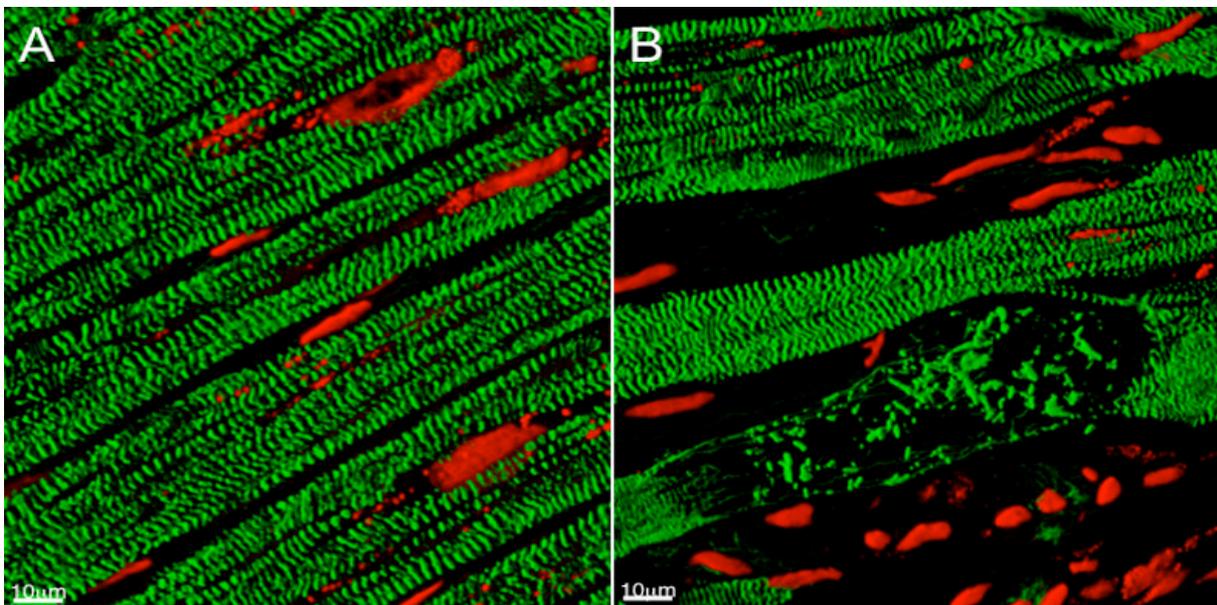
### 3.3.2.2 Darstellung (Immunhistochemie)

Mithilfe der immunhistochemischen Färbungen konnten Kluster von ACTN-1 bei zehn der untersuchten Patienten des Studienkollektivs detektiert werden. Im Kontrollkollektiv hingegen fanden sich kein ACTN-1. Beispielhafte Fotografien hierfür finden sich in Abbildung 22.



**Abbildung 22:** Alpha-Aktinin-1 (ACTN-1), **A, B** Mittels IHC Färbungen konnten clusterartige Ansammlungen von ACTN-1 bei zehn der 31 Patienten intrazellulär nachgewiesen werden. Im Kontrollkollektiv konnte ACTN-1 nicht detektiert werden. (Rot= F-Aktin).

Bei der immunhistochemischen Darstellung von ACTN-2 konnte in den Kontrollgeweben keine degenerativen Veränderungen entdeckt werden. Im Studienkollektiv war eine Verminderung der regelmäßigen Streifung als Hinweis auf einen Strukturverlust nachweisbar. Diese Ergebnisse werden durch die exemplarischen Fotografien in Abbildung 23 verdeutlicht.

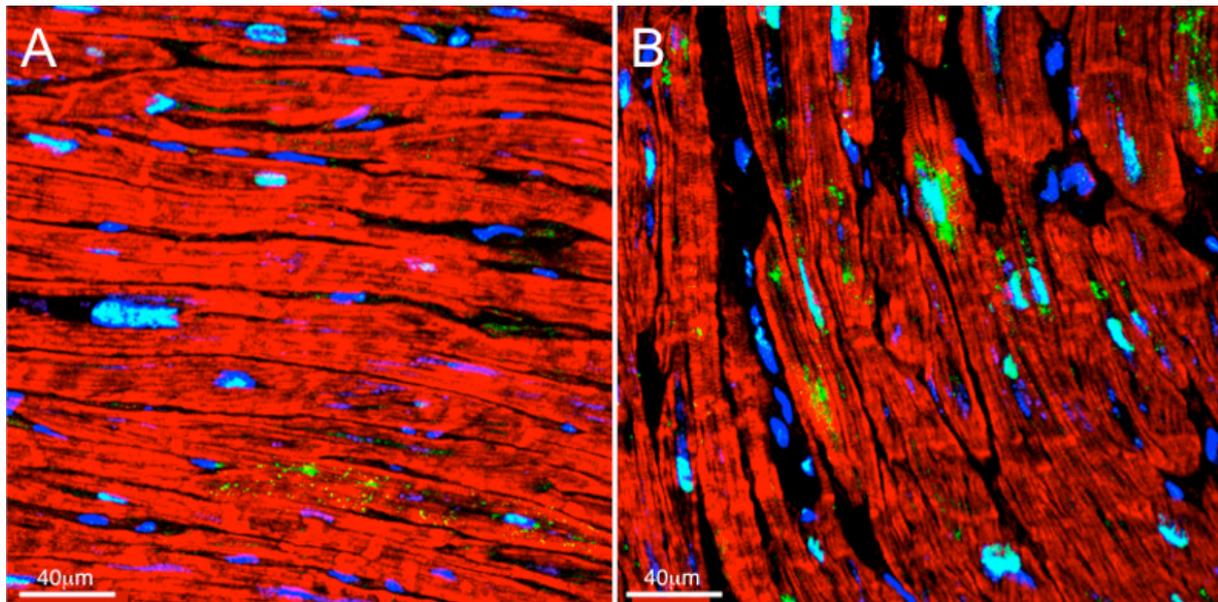


**Abbildung 23:** Alpha-Aktinin-2 (ACTN-2), **A** In den Kontrollgeweben konnten keine Anzeichen von Degeneration erkannt werden, die Kardiomyozyten des Kontrollkollektivs zeigten eine gleichmäßige Querstreifung. **B** Im Studienkollektiv ist neben regelmäßiger Querstreifung teilweise ein Verlust der gleichmäßigen Streifung als Zeichen eines sarkomerischen Strukturverlustes zu beobachten.

### 3.3.3 Natriuretische Peptide (Histologie)

#### 3.3.3.1 B-Typ natriuretisches Peptid

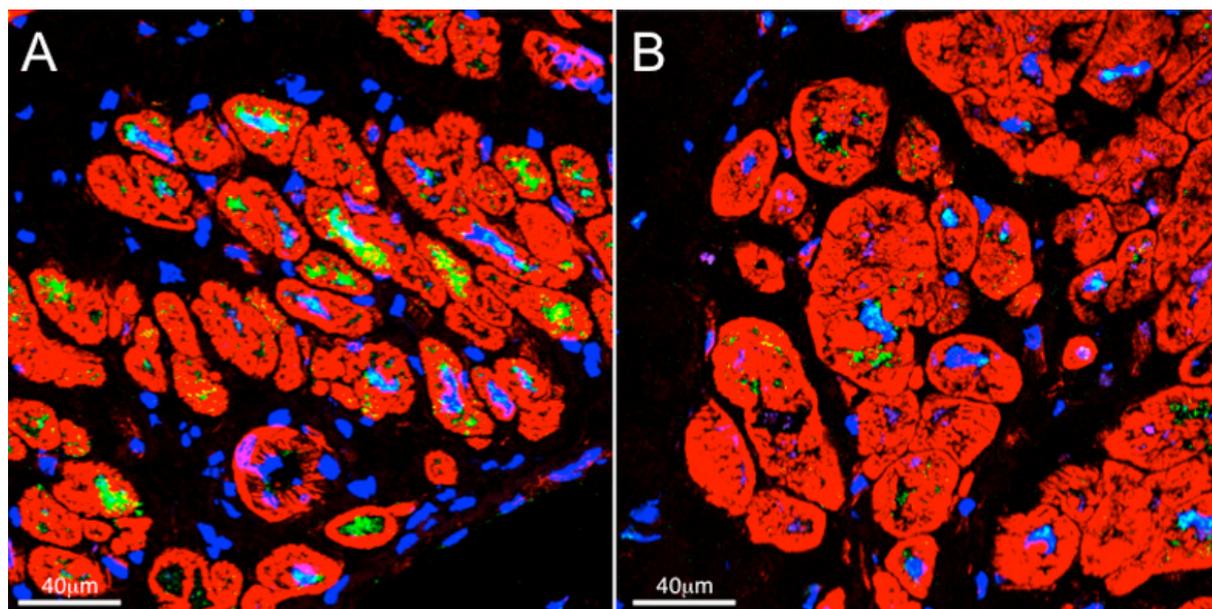
Durch spezifische immunhistochemische Färbung der ventrikulären Studienbiopsien konnte BNP in 16 der 31 Studienpatienten nachgewiesen werden. Eine bildliche Darstellung von moderatem sowie starkem BNP Nachweis ist in Abbildung 24 gegeben.



**Abbildung 24:** Immunhistochemischer Nachweis von BNP im Zytoplasma des Studienkollektivs. **A** Schwacher Nachweis von BNP (grün). **B** Starker Nachweis von zytoplasmatischem BNP (grün). (Rot=F-Aktin).

#### 3.3.3.2 Atrial-natriuretisches Peptid

Das Atrial-natriuretische Peptid (ANP) ist physiologisch im Atrium nachweisbar und wird bei Dehnung der Vorhofwand ausgeschüttet. Über den Einsatz von NTproANP als Biomarker für die Herzinsuffizienz wird diskutiert <sup>64</sup>. In dieser Studie konnte ANP mittels Immunhistochemie ventrikulär bei fünf der 31 Patienten im Studienkollektiv detektiert werden. Abbildung 25 zeigt den Nachweis neben einer Positivkontrolle (humanes Atrium).

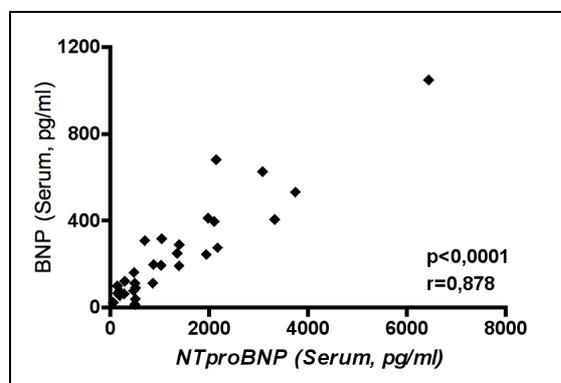


**Abbildung 25:** Immunhistochemischer Nachweis von ANP. **A** Positivkontrolle durch Färbung von Vorhofgewebe (ANP-Nachweis grün). **B** Positiver Nachweis von ANP in ventrikulärem Myokard des Studienkollektivs (ANP-Nachweis grün). (Rot=F-Aktin).

### 3.4 Ergebnisse der laborchemischen Blutuntersuchung

#### 3.4.1 BNP und NTproBNP im Serum der Studienpatienten (präoperativ)

Für BNP konnte vor der Operation im Patientenkollektiv ein Mittelwert von  $244,5 \pm 41,48$  pg/ml gemessen werden, für NTproBNP  $1287 \pm 248,6$  pg/ml. Hiermit kann man von pathologisch erhöhten Werten ausgehen. Es konnte eine signifikante, positive Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von BNP und NTproBNP gezeigt werden ( $p < 0,001$ ). Eine Darstellung ist in Abbildung 26 gegeben.

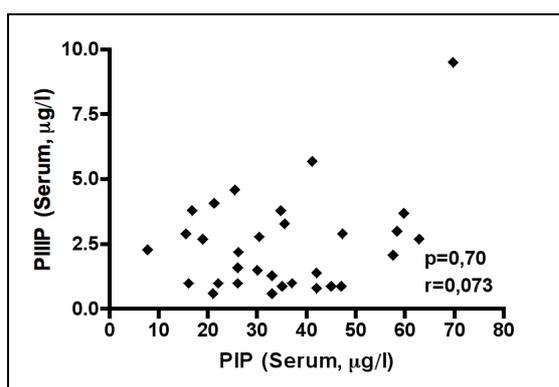


**Abbildung 26:** Korrelation der Serumkonzentrationen von NTproBNP und BNP im Studienkollektiv. Es konnte eine signifikante Korrelation gezeigt werden ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,878$ ).

### 3.4.2 Prokollagen I und III im Serum der Studienpatienten

Der laborchemische Nachweis der Intermediären des Kollagenstoffwechsels Prokollagen I und III im Serum der Studienpatienten gelang mittels Radioimmunassay. Für Prokollagen I konnte im Mittel ein Wert von  $34,95 \pm 2,78 \mu\text{g/l}$  gemessen werden. Der Referenzwert für gesunde Erwachsene liegt bei  $19\text{-}83 \mu\text{g/l}$ . Für Prokollagen III konnte ein Mittelwert von  $2,47 \pm 0,33 \mu\text{g/l}$  in der Studiengruppe gezeigt werden, wobei hier ein Referenzwert von  $2,3\text{-}6,4 \mu\text{g/l}$  zugrunde liegt (Referenzwerte: Orion Diagnostics, Finnland). Das Studienkollektiv differiert demnach für beide untersuchten Kollagenstoffwechselprodukte nicht von der gesunden Allgemeinbevölkerung.

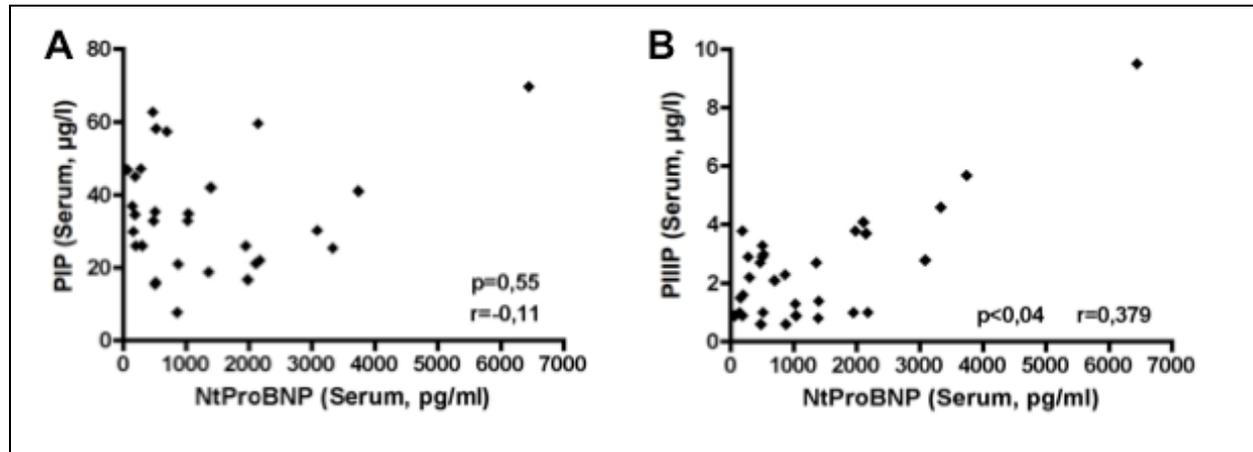
Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von PIP und PIIP gezeigt werden ( $p=0,70$ ). Abbildung 27 zeigt die graphische Darstellung.



**Abbildung 27:** Korrelation zwischen PIP und PIIP im Serum des Studienkollektivs. Es konnte keine signifikante Korrelation der Serumkonzentrationen gezeigt werden ( $p=0,70$ ,  $r=0,073$ ).

### 3.4.3 Korrelation der Prokollagene PIP und PIIP mit NTproBNP im Serum

In den Untersuchungen zur Korrelation der Prokollagen-Serumkonzentrationen mit der Konzentration des NTproBNP konnte für PIP keine signifikante Korrelation gezeigt werden. In der Korrelation von PIIP mit NTproBNP konnte eine signifikante Korrelation gefunden werden. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse.



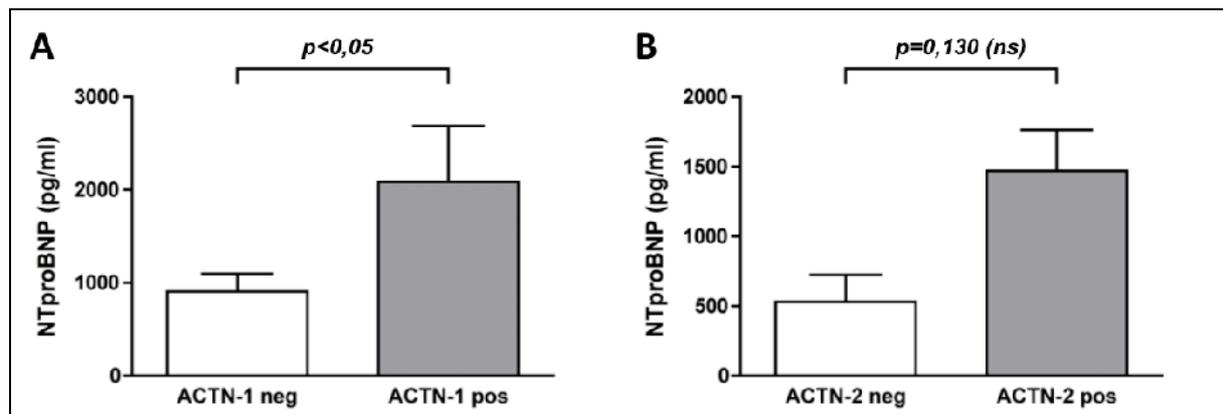
**Abbildung 28:** Korrelation zwischen NTproBNP Serumkonzentration und den Prokollagenen PIP und PIIP im Serum der Studiengruppe. **A** Für NTproBNP und PIP konnte keine signifikante Korrelation gezeigt werden ( $r=-0,11$ ,  $p=0,55$ ). **B** Eine signifikante Korrelation konnte für NTproBNP und PIIP nachgewiesen werden ( $r=0,379$ ,  $p<0,04$ ).

### 3.5 Myokardiale Biomarker (NTproBNP) und histologische Befunde

Wie beschrieben, kann sowohl BNP als auch NTproBNP im Blut nachgewiesen werden. Aufgrund der stabileren Struktur kann NTproBNP länger und sicherer durch moderne Messmethodik nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit vornehmlich die NTproBNP Serumkonzentration der Patienten für Korrelationen und Relationen gewählt.

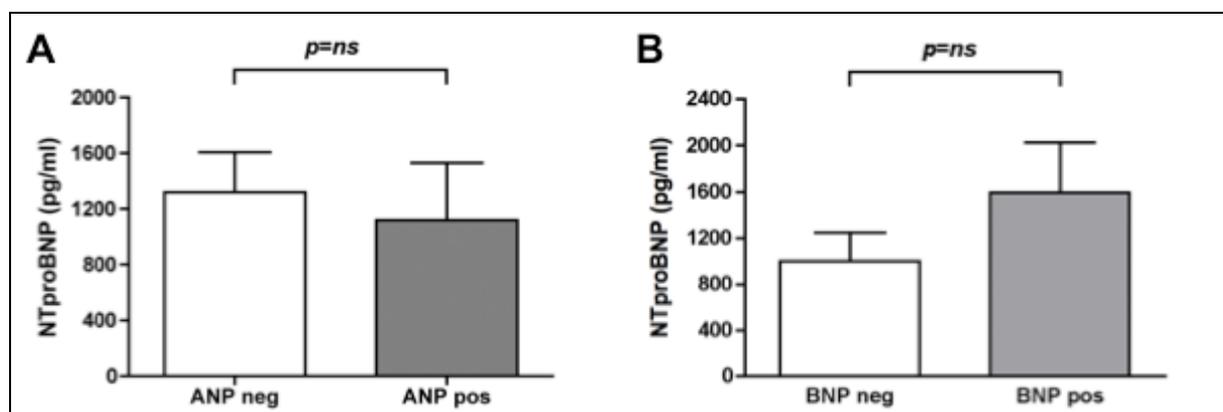
Abbildung 29 zeigt die Relation der NTproBNP Serumkonzentration bei Nachweis einer zellulären Degeneration durch ACTN. Abbildung 30 zeigt die NTproBNP Serumkonzentration in Abhängigkeit vom histologischen ventrikulären Nachweis von ANP und BNP im Studienkollektiv.

### 3.5.1 NTproBNP-Konzentration im Serum und Marker der zellulärer Degeneration



**Abbildung 29:** Nachweis der sarkomerischen Degeneration anhand der sarkomerischen Strukturproteine ACTN-1 und ACTN-2 in Relation zur NTproBNP-Konzentration im Serum der Studienpatienten. **A** Der Nachweis von ACTN-1 war mit signifikant erhöhten NTproBNP Werten im Serum der Studienpatienten verbunden. **B** Eine desorganisierte ACTN-2 Struktur war in Kardiomyozyten des Studienkollektivs nicht signifikant mit erhöhten NTproBNP Werten im Serum der Patienten verbunden ( $p=0,130$ ).

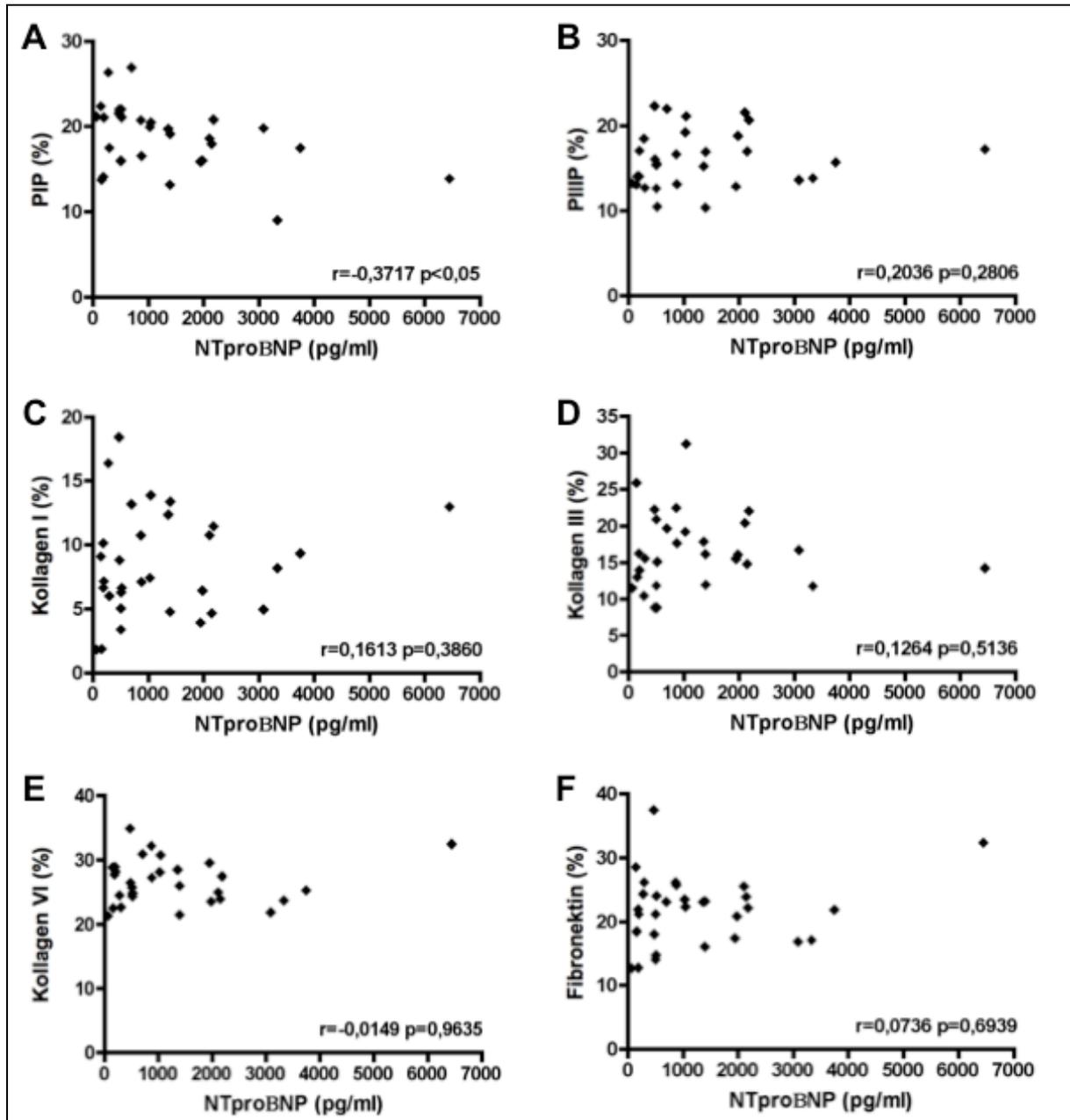
### 3.5.2 NTproBNP-Konzentration im Serum bei histologischem Nachweis der Biomarker ANP/BNP



**Abbildung 30:** Graphische Darstellung der Relation der NTproBNP Serumkonzentration und dem immunhistochemischen Nachweis von ANP und BNP im Gewebe der Studienpatienten. **A** Eine signifikante Relation von Serum-NTproBNP-Spiegel und dem positiven ANP-Nachweis im Gewebe konnte nicht erbracht werden. **B** Ein positiver BNP-Nachweis mittels ICH im Gewebe der Studienpatienten war nicht mit signifikant erhöhten NTproBNP-Serumkonzentrationen verbunden.

### 3.5.3 Korrelation der NTproBNP Serumkonzentration mit Bestandteilen der Extrazellulärmatrix

Nach Auswertung der Daten konnte, bis auf eine negative Korrelation von NTproBNP im Serum mit PIP, kein Zusammenhang gesehen werden. Abbildung 31 zeigt die Analyse.

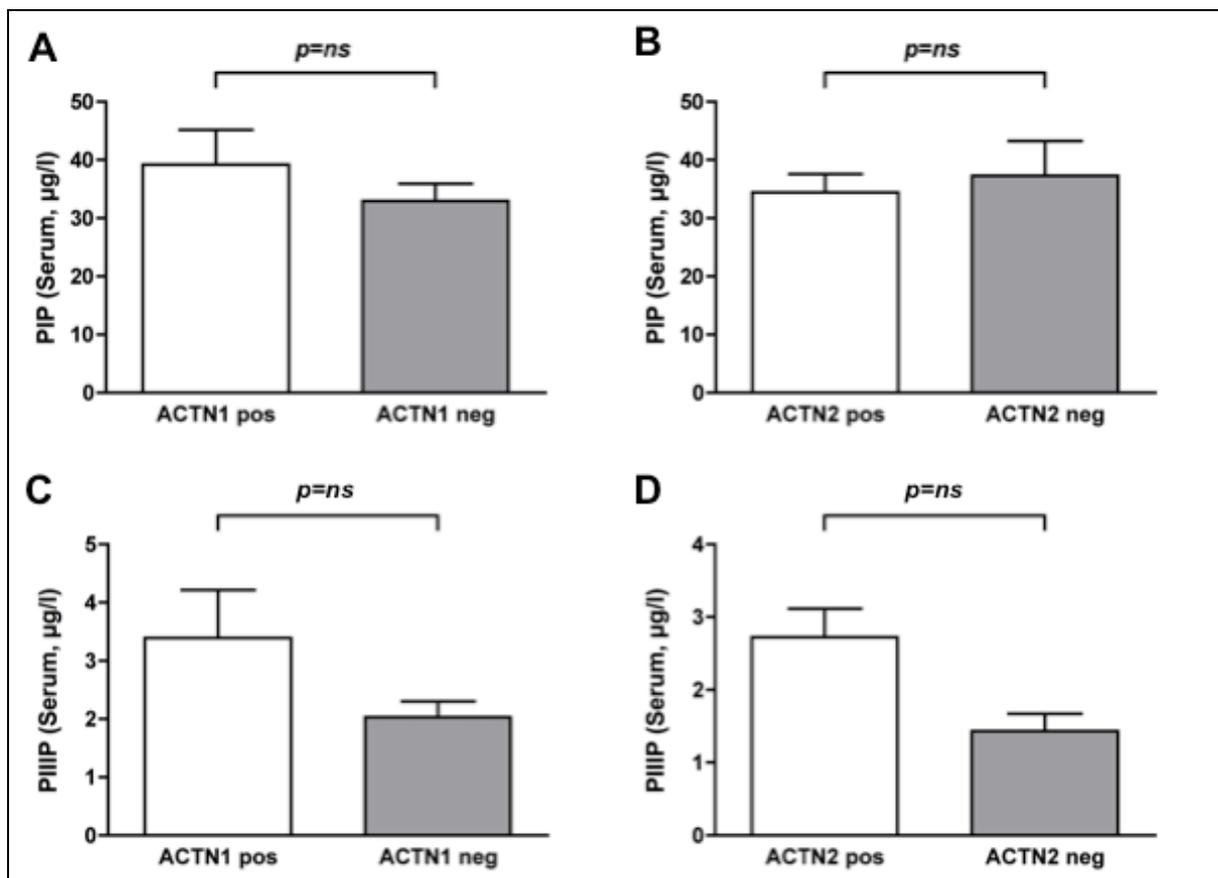


**Abbildung 31:** Korrelation der NTproBNP-Konzentration im Serum mit definierten Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (Anteil in %) im Studienkollektiv. **A** Signifikante negative Korrelation von NTproBNP Konzentration im Serum mit dem Prokollagen-I-Gehalt im Gewebe. **B, C, D, E, F** keine signifikante Korrelation.

### 3.6 Korrelation von Prokollagenen im Serum und der Morphologie

#### 3.6.1 Serumkonzentration der Prokollagene und Marker der myokardialen Degeneration

Nach Analyse der Daten konnte weder für die Prokollagen-III Serumkonzentration, noch für die Prokollagen-I Serumkonzentration eine signifikante Relation mit dem Nachweis von sarkomerischer Degeneration nachgewiesen werden. Abbildung 32 veranschaulicht die Ergebnisse.

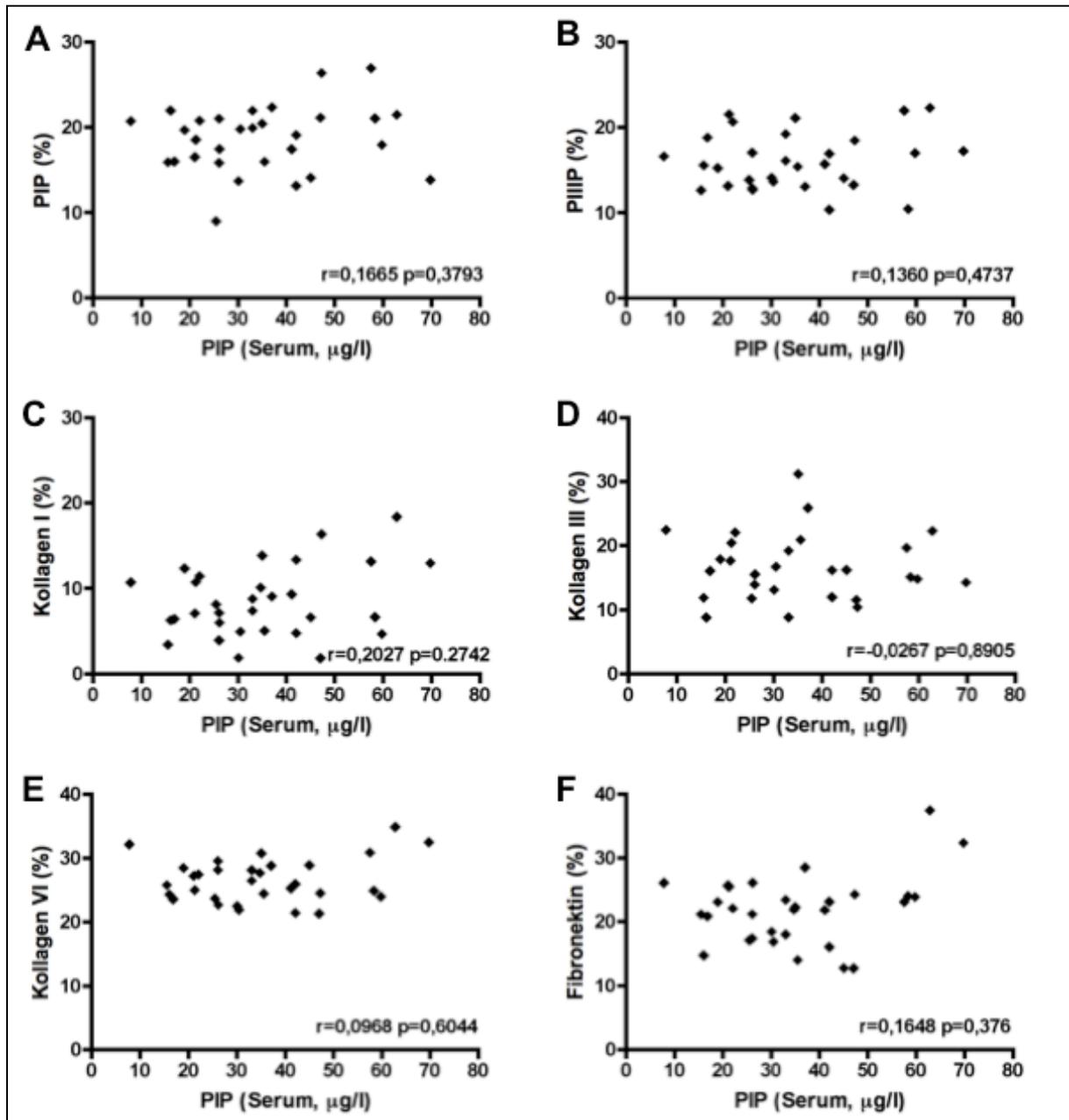


**Abbildung 32:** Relation von Prokollagen I und Prokollagen III Serumkonzentration mit Zeichen der myokardialen sarkomerischen Desorganisation anhand des Nachweis von destrukturierten ACTN-1 und ACTN-2 Klustern. **A** Relation von PIP im Serum mit histologischem Nachweis von ACTN-1, es war keine statistisch signifikante Abgrenzbarkeit feststellbar. **B** Relation von PIP mit ACTN-2, ebenfalls keine signifikante Relation nachweisbar. **C** Relation von PIIIP mit ACTN-1, hier keine statistisch signifikante Relation von PIIIP und eine Nachweisbarkeit von myokardialer ACTN-1-Desorganisation. **D** Keine signifikante Relation von Serum-PIIIP-Konzentration und Nachweis von ACTN-2.

### 3.6.2 Serumkonzentration der Prokollagene und Bestandteile der Extrazellulärmatrix

#### 3.6.2.1 Korrelation von Prokollagen-I-Propeptid mit der Extrazellulärmatrix

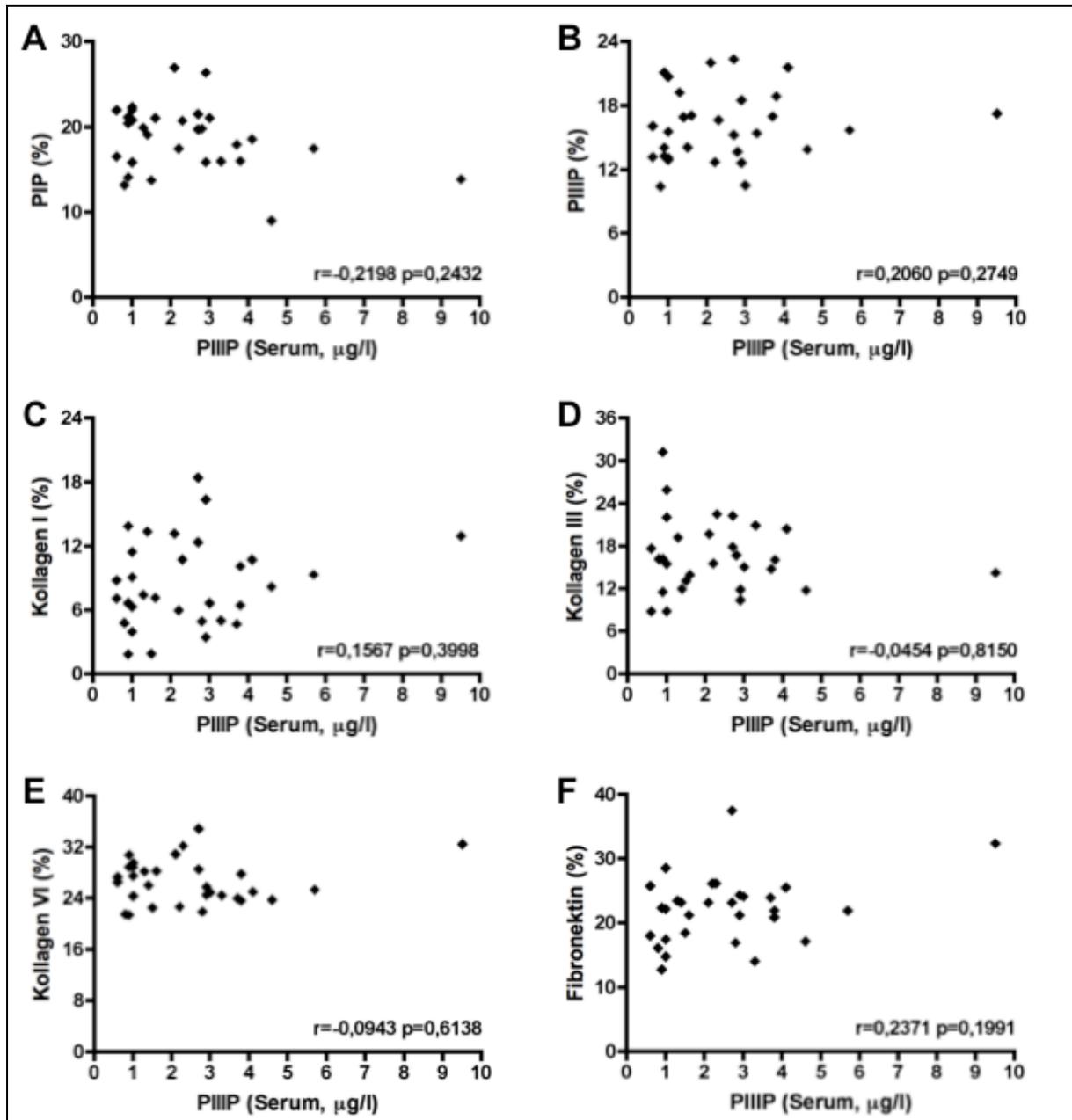
Es konnte keine signifikante Korrelation für PIP mit den Bestandteilen der Extrazellulärmatrix festgestellt werden. Abbildung 33 zeigt die graphische Analyse.



**Abbildung 33:** Korrelation der Prokollagen-I-Propeptid-Konzentration (PIP) im Serum mit definierten Bestandteilen der EZM (Anteil in %) im Studienkollektiv. A, B, C, D, E, F keine signifikante Korrelation.

### 3.6.2.2 Korrelation von Prokollagen-III-Propeptid mit der Extrazellulärmatrix

Nach Analyse der Daten konnte keine signifikante Korrelation von Prokollagen-III Serumkonzentration mit Bestandteilen der Extrazellulärmatrix gesehen werden. In Abbildung 34 finden sich die Ergebnisse.

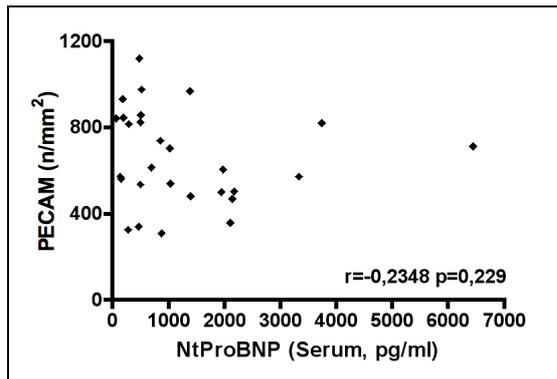


**Abbildung 34:** Korrelation der Prokollagen-III-Propeptid-Konzentration (PIIIP) im Serum mit definierten Bestandteilen der EZM (Anteil in %) im Studienkollektiv. **A, B, C, D, E, F** Es konnte keine signifikante Korrelation der Prokollagen-III Serumkonzentration mit den immunhistochemisch quantifizierten Bestandteilen der Extrazellulärmatrix gefunden werden.

### 3.7 Relation und Korrelation der Kapillardichte mit unterschiedlichen Messparametern

#### 3.7.1 Korrelation von Kapillardichte und Biomarkern (NTproBNP)

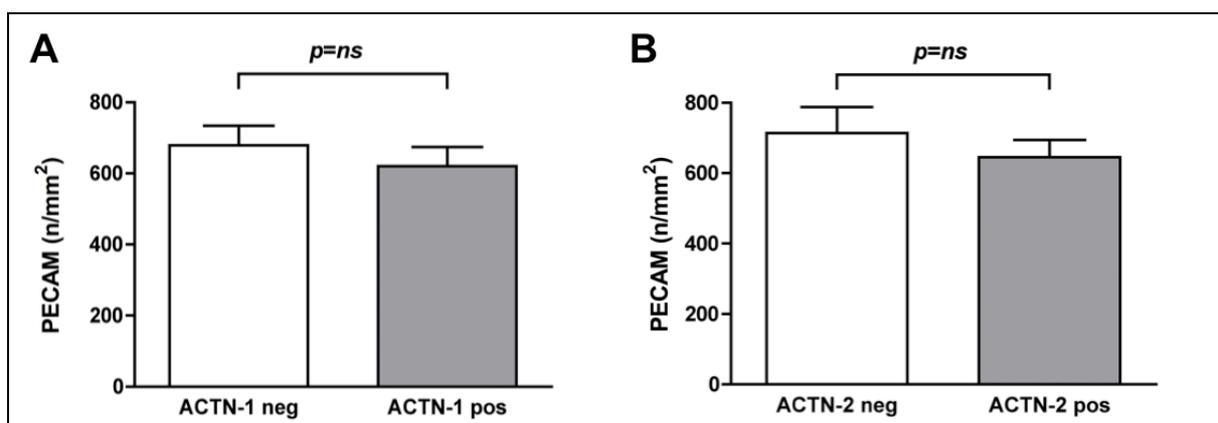
Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation der Serumkonzentration von NTproBNP mit der myokardialen Kapillardichte nachgewiesen werden, siehe Abbildung 35.



**Abbildung 35:** Korrelation der Kapillardichte (gemessen in  $n/mm^2$ ) mit der NTproBNP-Serumkonzentration im Studienkollektiv. Hierbei konnte keine signifikante Korrelation aufgezeigt werden ( $r=-0,2348$ ,  $p=0,229$ ).

#### 3.7.2 Kapillardichte und Marker der myokardialen zellulären Desorganisation

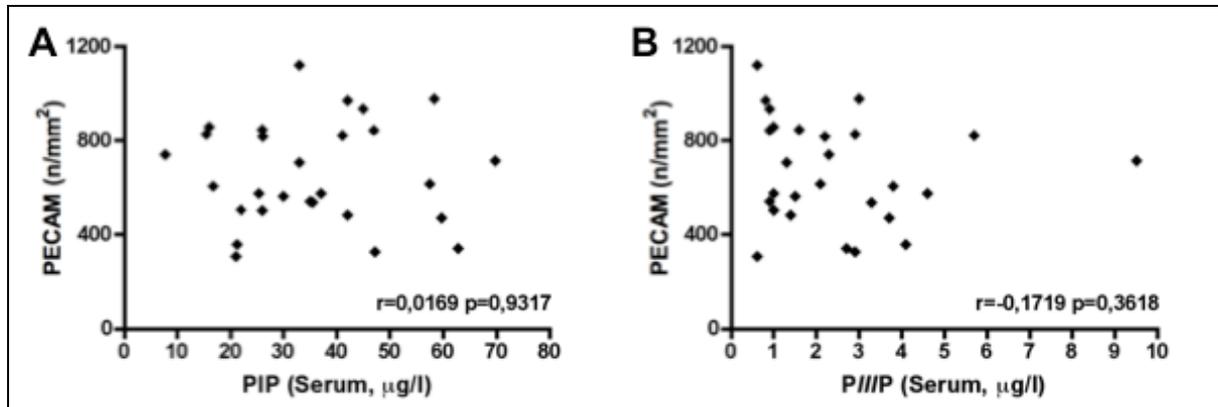
Nach Analyse der Daten konnte keine signifikante Relation der Kapillardichte mit Zeichen der zellulären Degeneration gesehen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt.



**Abbildung 36:** Graphische Darstellung der Relation von Kapillardichte und histologischem Nachweis zellulärer Degeneration im Studienkollektiv. Weder für ACTN-1 (A) noch für ACTN-2 (B) konnte eine signifikante Relation detektiert werden.

### 3.7.3 Korrelation der Kapillardichte mit PIP und PIIP im Serum

Auch für die Korrelation der Kapillardichte mit der Serumkonzentration der Prokollagene konnte kein Signifikanzniveau erreicht werden. Abbildung 37 verdeutlicht die Analyse.



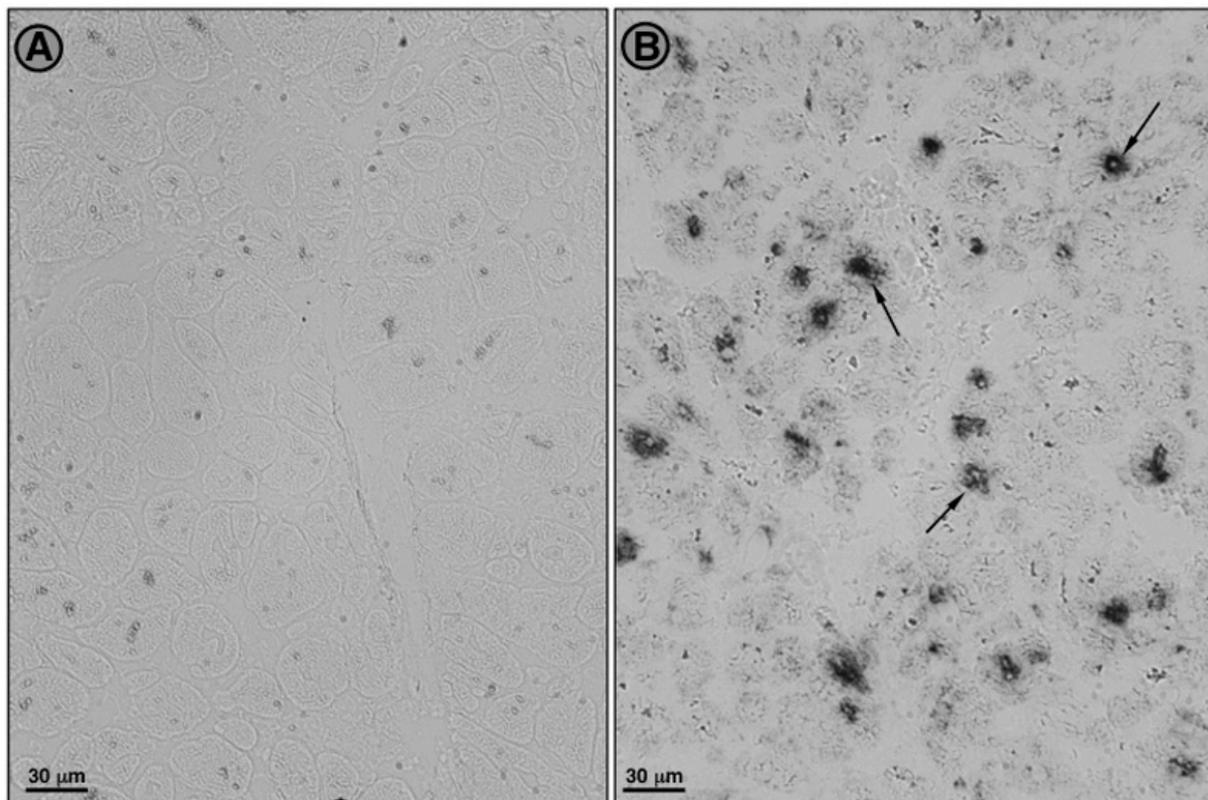
**Abbildung 37:** Graphische Darstellung der Korrelation von Kapillardichte (Färbung mit PECAM, Angabe in  $n/mm^2$ ) und der Serumkonzentration der Prokollagene PIP und PIIP im Studienkollektiv. **A, B** Es findet sich weder für PIP noch für PIIP eine statistisch signifikante Korrelation mit der Kapillardichte in der Studiengruppe.

### 3.8 *In situ* Hybridisierung

Um die Herkunft des im Serum nachgewiesenen BNP, respektive NTproBNP, prinzipiell zu verifizieren, wurde die *In situ* Hybridisierung angewendet.

In dieser Studie wurden randomisiert sechs Myokardbiopsien auf eine Transkription von BNP-mRNA untersucht. In allen Fällen gelang eine Darstellung der DIG-markierten Sonde in der Durchlichtmikroskopie. Somit konnte mittels *In situ* Hybridisierung demonstriert werden, dass in den (untersuchten) Myokardbiopsien BNP-mRNA transkribiert wurde. Dies erlaubt den Rückschluß, dass humorales BNP in diesem Gewebeproduziert worden ist.

In Abbildung 38 sind Bilder der Durchlichtmikroskopie des Studiengewebes nach Durchführung der *In situ* Hybridisierung dargestellt.



**Abbildung 38:** Durchlichtmikroskopie des Gewebes nach Durchführung der *In situ* Hybridisierung. **A** Im Studiengewebe keine Markierung mit der Sense-Sonde. **B** Im Studiengewebe Nachweis mit der DIG-markierten BNP-Messenger-Sonde, wodurch die BNP Transkription im Zellkern der Myozyten des Studienkollektivs nach Bindung der Anti-Sense Sonde an BNP-mRNA (Pfeil) dargestellt werden konnte.

---

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Beziehung zwischen klinisch erfassbaren Parametern wie dem Nachweis und der Quantifizierung des natriuretischen Peptides und den Indikatoren des Kollagenstoffwechsels im Serum mit dem strukturellen Zustand des Myokards bei Patienten mit valvulärer Aortenstenose zu vergleichen. Die 31 Patienten des Studienkollektivs wiesen bei erhaltener systolischer Herzfunktion, das heißt normaler Ejektionsfraktion, eine klinische Symptomatik gemäß NYHA-Klassifizierung auf und unterzogen sich bei Diagnose einer hochgradigen valvulären Aortenstenose deshalb einer operativen Korrektur des Klappenfehlers.

Die Fragestellung der Struktur-Funktions-Relation ergab sich aus den Daten einer vorherigen Studie, die im Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, im Vorfeld der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. In der Arbeit von Hein et al. wurde postuliert, dass Patienten mit Aortenstenose zu einem Zeitpunkt operiert werden sollten, an dem nur relativ wenige strukturelle Veränderungen des Myokards zu beobachten sind<sup>9</sup>. In dieser vorausgehenden Studie wurde nur ein kleines Kollektiv von Patienten mit erhaltener Ejektionsfraktion untersucht, die Mehrzahl der Patienten zeigte eine mittlere bis schwere Herabsetzung der Ejektionsfraktion, eine Erhöhung des LVEDP und Veränderungen weiterer kardialer Parameter.

Serumindikatoren wurden in der Arbeit von Hein et al. nicht untersucht. Es zeigte sich, dass bei Patienten mit normaler Ejektionsfraktion, für die entsprechend den Leitlinien des therapeutischen Vorgehens bei hochgradiger Aortenstenose eine Indikation zur Operation bestand, bereits Schäden im Myokard zu beobachten waren. Bis dato sind, neben der Arbeit von Hein et al., nur sehr wenige Arbeiten mit Aussagen zur strukturellen Kompetenz des Myokards bei Vorliegen einer Aortenstenose bekannt<sup>66,68,75,76</sup>.

Die Untersuchung hinsichtlich eines möglichen Strukturdefizits bei erhaltener systolischer Herzleistung sollte in der vorliegenden Arbeit an einem sorgfältig ausgesuchten Patientengut weiter durchgeführt werden.

---

Die vorliegende Arbeit ergab folgende Resultate:

1. Der Fibrosegrad im Myokard war von 12 % bei Gesunden auf 21 % im untersuchten Studienkollektiv signifikant erhöht. Die Kollagene I, III, und VI sowie die Grundsubstanz Fibronectin waren ebenso signifikant vermehrt, wohingegen die Kapillardichte reduziert war. Die Prokollagene PIP und PIIP waren im Gewebe ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigert. Neben den Veränderungen des extrazellulären Raumes wurden auch degenerative Erscheinungen in den Myozyten registriert. Die Anordnung der Sarkomeren war teilweise gestört, und eine Ansammlung von ACTN-1, die als Symptom für Degeneration angesehen wird, wurde beobachtet.
2. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte das Vorkommen des B-Typ natriuretischen Peptids und bei einigen Patienten auch von ANP im Ventrikelgewebe.
3. BNP und NTproBNP Konzentrationen im Serum waren im Studienkollektiv gegenüber der Kontrolle erhöht.
4. PIP und PIIP als Serummarker des Kollagenstoffwechsels waren im Studienkollektiv gegenüber der Referenz nicht vermehrt messbar.
5. Es fanden sich Korrelationen zwischen Serummarkern im Blut des Studienkollektivs und morphologischen Veränderungen.

#### **4.1 Klinische Problemstellung**

Die Aortenstenose ist das häufigste Klappenitium in der westlichen Welt <sup>3,6,7,77</sup>. Ätiopathogenetisch sind Degeneration und Kalzifikation der Klappensegel zu nennen <sup>6</sup>. Eine Klassifikation der Aortenstenose erfolgt gemäß aktueller Leitlinien in drei Schweregrade, wobei die Echokardiographie den Goldstandard in der Diagnostik darstellt (Evidenzklasse I) <sup>10,11</sup>. Hierbei gelingt eine morphologische Darstellung der Klappensegel und eine Unterscheidung hinsichtlich der Klappenanlage in trikuspid, bikuspid oder funktionell bikuspid.

Es werden neben der Klappenöffnungsfläche dopplersonographisch der Druckgradient über der Aortenklappe und die maximale Flussgeschwindigkeit gemessen.

---

Darüber hinaus können echokardiographisch neben der myokardialen Pumpleistung und Auswurffraktion weitere deskriptive Parameter der Herzfunktion sowie diverse Herzdiameter beschrieben werden.

Neben der Echokardiographie kann die invasive Linksherzdiagnostik mit linksventrikulärer Angiographie und Bestimmung des Rückzuggradienten über der Aortenklappe bezüglich der Schwere des Vitiums hinweisend sein. Eine invasive Diagnostik mit dem Ziel der Gewebegewinnung im Sinne einer Biopsie zur routinemäßigen Strukturanalyse ist jedoch nicht vorgesehen.

Die Folge der Aortenstenose ist eine kontinuierliche Erhöhung der kardialen Nachlast des linken Ventrikels mit konsekutiven strukturellen Umbauprozessen aufgrund der chronischen Druckbelastung. Kommt es nicht zur Entlastung, entwickelt sich im weiteren Verlauf der Krankheit auf dem Boden einer schwergradigen Aortenstenose eine manifeste Herzinsuffizienz. Unterschiedliche Kompensationsmechanismen, wie zum Beispiel die Hypertrophie, stellen häufig eine über viele Jahre hinweg bestehende klinische Symptomfreiheit sicher, so dass Aortenstenosen oftmals erst ab einem mittelschweren Grad klinisch auffällig werden <sup>12</sup>.

Ist die Diagnose einer Aortenklappenstenose gesichert, findet ein leitliniengerechtes Therapieregime Anwendung, wobei diese Leitlinien von Seiten der internationalen und nationalen Fachgesellschaften vorgegeben sind <sup>10,11,78</sup>.

Die Indikation zur operativen Korrektur einer valvulären Aortenstenose wird interdisziplinär gestellt. Kardiologen und Kardiochirurgen evaluieren im Regelfall die individuellen Befunde und entscheiden kooperativ und im Einvernehmen mit dem Patienten über das am besten geeignete Therapieverfahren gemäß der gültigen Leitlinien.

Diese Leitlinien geben für die valvuläre Aortenstenose konkret vor, die Indikation zur Operation zu stellen, wenn die Patienten einen klinischen Leidensdruck erfahren (Evidenzklasse I). Weiterhin besteht die Empfehlung zur Operation, wenn spezifische diagnostische Parameter das Vorliegen einer schwergradigen Aortenstenose mit erhaltener Ejektionsfraktion (Evidenzklasse II) oder mit Verminderung der Ejektionsfraktion (Evidenzklasse I) beweisen. Diagnostikum der ersten Wahl ist hierfür die Echokardiographie. Eine weitere Indikation für den operativen Ersatz der erkrankten Aortenklappe ist das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit im Sinne eines sinnvollen Kombinationseingriffe (Evidenzklasse I) <sup>10,11,78</sup>.

---

## 4.2 Strukturdefizit des Myokards bei Aortenstenose und erhaltener systolischer Herzleistung

Im Studienkollektiv dieser Arbeit konnte bei 31 Patienten eine mittlere Klappenöffnungsfläche von  $0,65 \pm 0,18 \text{ cm}^2$  und ein mittlerer Druckgradient von  $60 \pm 14 \text{ mmHg}$  gemessen werden, womit per definitionem in allen Fällen von einer hochgradigen Aortenstenose ausgegangen werden konnte. Gleichzeitig ermöglichte die Echokardiographie eine Aussage über die myokardiale Pumpleistung anhand der Messung der Ejektionsfraktion. Im Studienkollektiv konnte bei Vorliegen einer mittleren linksventrikulären Pumpfunktion von  $61 \pm 10 \%$  eine erhaltenen Pumpfunktion zugrunde gelegt werden.

Für das Patientenkollektiv in dieser Arbeit wurde gemäß den oben beschriebenen Leitlinien die Indikation zur Operation gestellt, wobei die Patienten zum Zeitpunkt der Operation über eine erhaltene systolische Herzfunktion verfügten. Es war möglich, intraoperativ Gewebeproben dieser Patienten zu erhalten, diese aufzuarbeiten und zu analysieren. Weiterführend konnten Serumanalysen gängiger Biomarker wie ANP und BNP erhoben werden, sowie spezifische Blutuntersuchungen bezüglich des Kollagenstoffwechsels durchgeführt wurden. Dabei wurden die im folgenden Text beschriebenen Befunde erhoben.

### 4.2.1 Myokardiale Fibrose

Die Extrazellulärmatrix setzt sich aus verschiedenen Bestandteilen zusammen. Der Terminus der „myokardialen Fibrose“ beschreibt einen relativen Mehrgehalt der Extrazellulärmatrix im Vergleich zum gesunden Gewebe. Der physiologische Gehalt der fibrillären Faserproteine im humanen Myokard wird für Kollagen I mit circa 2 % angegeben, für Kollagen III liegt dieser Wert bei circa 8 %. Diese Werte konnten in den Messungen unserer Kontrollgeweben bestätigt werden. Auch für das nicht-fibrilläre Kollagen VI konnte ein durchschnittlicher Wert von 14 % in unseren Kontrollgeweben qualifiziert werden. Der Gehalt an extrazellulärer Grundsubstanz Fibronectin liegt in gesundem Herzmuskel bei circa 12 %<sup>33,79-81</sup>. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls in der Kontrolle verifiziert werden. Für alle vier oben genannten Bestandteile der Extrazellulärmatrix konnten in unseren Untersuchungen signifikant höhere Messwerte gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Die Diagnose einer myokardialen Fibrose wird darüber hinaus noch durch Nachweis einer signifikant geringeren Anzahl an

---

Kapillargefäßen versus Kontrolle sowie durch einen signifikant erhöhten Nachweis der Prokollagen-Propeptide im Gewebe der Studienpopulation gefestigt.

Weber et al. beschrieben im Tiermodell einen Anstieg der Kollagenfraktion unter Druckbelastung<sup>82</sup>. Ähnliches skizzierten Lopez et al. und beobachteten außerdem einen deutlichen Anstieg des Kollagens im humanen Myokard bei chronischer Druckbelastung<sup>83</sup>. Einen erheblichen Anstieg des totalen Kollagens unter chronischer Druckbelastung des menschlichen Herzens konnte auch die Arbeitsgruppe um Brilla belegen<sup>80</sup>. In früheren Studien gemessene Werte für den Anteil der Extrazellulärmatrix, gemessen anhand von Fibronectin im Myokard, konnten in unserer Studie aus dem Max-Planck-Institut Bad Nauheim bestätigt werden<sup>9</sup>. Einen Anstieg des Kollagen I über die Werte des Kollagen III, wie von Truter et al. bei Patienten mit Aortenklappeninsuffizienz beschrieben<sup>84</sup>, ergeben unsere Daten jedoch nicht. In unseren Untersuchungen bleibt Kollagen III stets die größere Fraktion in der Extrazellulärmatrix.

Es bleibt zu diskutieren, aus welchem Grund sich die Fibrose tatsächlich einstellt. Eine zunehmende Fibrosierung des Myokards kann in zwei verschiedenen Arten verlaufen: Erstens als reaktive, meist perivaskuläre Fibrose und zweitens als interstitielle Ersatzfibrose. Eine Ersatzfibrose entsteht, wenn parenchymatöse Zellen zugrunde gehen und durch Bindegewebe ersetzt werden. Eine Vielzahl von pathologischen Triggern und Ursachen können zu beiden Typen von Fibrose führen, darunter Ischämie, Entzündung, Kardiomyopathie sowie die chronische Druckbelastung, welche bei Bestehen einer Aortenstenose auftritt<sup>9,34,81</sup>.

Es liegt nahe anzunehmen, dass der Verlust von nur einigen kontraktilen Zellen wenig Fibrose nach sich zieht und dass diese dann ohne Einfluss auf die Funktion des Gewebes bleibt. Im Gegensatz zu einer akuten Entzündung oder einer akuten Ischämie, bei der viele parenchymatöse Zellen zum gleichen Zeitpunkt zugrunde gehen, gehen bei einem chronischen Geschehen zu jedem Zeitpunkt nur einige Myozyten unter. Es handelt sich vielmehr um einen kumulativen Effekt, das heißt im Laufe der Zeit entsteht quantitativ zunehmend Bindegewebe. Dieses „ersatz-fibrotische“ Gewebe beteiligt sich naturgemäß nicht an der Kontraktion, so dass diese Form der Erkrankung zur Ausbildung einer Fibrose führt und schließlich im weiteren Verlauf in eine Insuffizienz mündet<sup>9,34,85</sup>.

In früheren Arbeiten wurde dieser Zustand, hervorgerufen durch eine Vielzahl kardialer Erkrankungen, mit dem Begriff „Remodulierung“ oder Englisch „Remodeling“ beschrieben. Neben einem Verlust an Kontraktilität und damit der systolischen Pumpleistung führt die

---

Fibrose auch wesentlich zur Entstehung einer diastolischen Funktionsstörung, also zu einem Nachlaß der Compliance.

Compliance beschreibt die diastolische Funktion, also das Maß der Dehnbarkeit, gemessen am intrakavitären Druck in Relation zur Füllung. Kommt es in der Folge einer Herzerkrankung, zum Beispiel der Aortenstenose, zu einer Verminderung der Compliance, führt dies zu einer Kombination aus diastolischer und systolischer Funktionsstörung.

Es bleibt festzustellen, dass die Patienten in dieser Studie zum Zeitpunkt des korrektiven Klappenersatzes bei hochgradiger Aortenstenose eine myokardiale Fibrose zeigten. Diese Fibrose war signifikant versus der Kontrolle vermehrt und entstand am ehesten auf Grund der chronischen Druckbelastung.

#### **4.2.2 Sarkomerische Desorganisation**

Die systolische Funktion des Herzens ist in erster Linie abhängig von einer adäquaten Kontraktilität der Myozyten. Hierfür ist die Integrität und Funktion des Sarkomers von entscheidender Bedeutung.

Marker hierfür können prinzipiell alle Strukturproteine des Sarkomers sein, wie Alpha-Aktinin, Aktin, Myosin, Titin oder die verschiedenen Troponine. In früheren Studien demonstrierte sich ACTN als valider Parameter mit guter Aussagekraft<sup>9,23,86</sup>. Daher eignet sich der Nachweis von desorganisiertem ACTN-2 besonders gut als Marker eines sarkomerischen Schadens.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in Kardiomyozyten von Patienten mit erhaltener Herzfunktion und klinischer Kompensation bereits derartige Zeichen von sarkomerischer Desorganisation auftreten. Diese Veränderungen tragen sicherlich zu einem Verlust an Kontraktilität der Myozyten bei. Voraussetzung hierfür ist, dass genügend Sarkomere in ausreichend vielen Kardiomyozyten betroffen sind. Es handelt sich also, wie bei der Fibrose, um ein quantitatives Problem.

Unsere Untersuchungen ergaben, dass ACTN-2 Veränderungen in Kardiomyozyten von Patienten des Studienkollektivs irregulär nachweisbar war, wobei intrazellulär ACTN-2 positive Konglomerate bei beschädigter sarkomerischer Struktur erkennbar waren.

---

ACTN-1, die nicht-sarkomerische Isoform des Alpha-Aktinin, ist ein Glattmuskelzellprotein und somit unter anderem nachweisbar in Endothel- und Glattmuskelzellen. Die immunhistochemische Färbung gelingt mit dem anti-mouse Antikörper Clon BM 75.2. In gesunden Kardiomyozyten ist ACTN-1 nur in Gefäßen detektierbar.

In früheren Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass ACTN-1 in Herzmuskelzellen dann nachweisbar ist, wenn gleichzeitig eine sarkomerischen Desorganisation des Kardiomyozyten vorliegt<sup>9,23</sup>. Der Nachweis wurde aber bisher ausschließlich an Patienten mit erheblicher Einschränkung der myokardialen Funktion bis hin zur kardiopulmonalen Dekompensation geführt.

Unsere Untersuchungen an myokardialem Gewebe des Studienkollektivs bezüglich ACTN-1 ergaben, dass das Vorliegen einer chronischen Druckbelastung auch ohne Zeichen einer reduzierten Pumpfunktion zum Nachweis von ACTN-1 als Marker sarkomerischen Schadens führt.

Der Nachweis dieser stellvertretenden Marker der sarkomerischen Desorganisation bei Patienten mit erhaltener Herzfunktion belegt klar, dass der sarkomerische Schaden bereits gesetzt ist. Offenbar ist er jedoch noch kompensiert, denn keiner der Studienpatienten litt unter einer reduzierten Herzleistung. Als Grund für diesen Zustand kann vermutet werden, dass nur ein geringer Anteil der Sarkomere betroffen war, weshalb sich eine Herzkraftminderung lediglich subklinisch manifestierte. Es bleibt deshalb zu eruieren, bis zu welchem Grad die Sarkomerenstruktur bei wie vielen Kardiomyozyten geschädigt sein muß, um ein funktionelles Defizit hervor zu rufen.

Auch die Frage der Reversibilität dieser Veränderungen wurde noch nicht endgültig beantwortet. Grund hierfür kann die begrenzte Verfügbarkeit von humanem Herzmuskelgewebe sein. Die bisher einzige Arbeit mit histologischen Folgeuntersuchungen wurde von der Arbeitsgruppe um Krayenbuehl publiziert. Krayenbuehl et al. konnten demonstrieren, dass die Veränderungen der Extrazellulärmatrix und die kardiomyozytäre Hypertrophie auch nach einem Zeitraum von circa sechs Jahren nach Klappenersatz nicht vollständig reversibel waren<sup>66</sup>.

Inwiefern der sarkomerische Schaden morphologisch reversibel ist, bleibt in der vorliegenden Arbeit offen. Weitere Studien mit klinischen Nachuntersuchungen und erneuter Biopsieentnahme zur Verifizierung des histologischen Zustandes nach Klappenersatz sollten,

---

insbesondere bei einem Patientengut mit erhaltener systolischer Herzfunktion, durchgeführt werden, um diese zentrale Frage zu klären.

Eine essentielle Feststellung der vorliegenden Arbeit ist, dass bereits bei Patienten mit erhaltener systolischer Pumpfunktion, zusätzlich zur verstärkten Fibrose, ein Schaden der Myokardstruktur vorliegt.

### **4.3 Rolle der natriuretischen Biomarker BNP und ANP bei Vorliegen einer Aortenstenose**

Biomarker, insbesondere die B-Typ natriuretischen Peptide, nehmen einen wichtigen Platz in der Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen ein. Die Bestimmung dieser Marker im Serum der Patienten ist ein anerkanntes Verfahren, um myokardialen Stress verschiedenster Pathogenese widerzuspiegeln. Besonders im Kontext der Diagnostik der Herzinsuffizienz, der koronaren Herzerkrankung und dem akuten Koronarsyndrom hat sich BNP etabliert<sup>52,87,88</sup>. Die Messung der Konzentration der B-Typ natriuretischen Peptide im Serum ist eine valide Methode, um im Rahmen einer akuten Versorgung eines Patienten mit unklarer Dyspnoe eine Hilfestellung in der Differentialdiagnose im Sinne einer kardialen oder extrakardialen Ursache zu erhalten<sup>89,90</sup>. Der Nutzen der Anwendung von Biomarkern in Diagnostik und Therapiekontrolle der Herzinsuffizienz wurde in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten belegt<sup>91,92</sup> und wird in den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) berücksichtigt<sup>78</sup>. Die Anwendung der Biomarker bei Patienten mit Klappenerkrankungen, im Speziellen der Aortenstenose, war bereits Gegenstand einiger Studien. Die Plasmaspiegel der B-Typ natriuretischen Peptide sind bei Vorliegen einer Aortenstenose erhöht<sup>57,58,63,88</sup>. Hierbei korreliert die Höhe der Plasmaspiegel der B-Typ natriuretischen Peptide mit der klinischen Symptomatik<sup>59,93</sup>. Weber et al. konnten zeigen, dass die humorale NTproBNP Konzentration im Serum bei Aortenstenose nicht nur erhöht war, sondern auch mit der Schwere der Aortenstenose korrelierte<sup>94</sup>.

Studien zum Zusammenhang von Klinik und Schweregrad einer Aortenstenose mit Serumspiegeln der B-Typ natriuretischen Peptide sind demnach bekannt. Untersuchungen zur Korrelation zwischen B-Typ natriuretischen Peptiden und strukturell-histologischen Erhebungen waren bisher noch nicht beschrieben. Diese Fragestellung sollte in dieser Arbeit besonders betrachtet werden.

---

In dieser Arbeit konnte veranschaulicht werden, dass die Serumkonzentration der B-Typ natriuretischen Peptide (BNP und NTproBNP) im Studienkollektiv erhöht war. Von einer manifesten kardialen Belastung im Studienkollektiv war daher sicher auszugehen.

Weiterhin war NTproBNP in der Lage, strukturelle Schäden der Sarkomere, hervorgerufen durch die chronische Druckbelastung auf dem Boden einer Aortenstenose, zu reflektieren. Es konnte eine signifikante Relation von positivem ACTN-1 Nachweis und Höhe der Serumkonzentration von NTproBNP belegt werden. Für die Relation bezüglich Detektion von desorganisiertem ACTN-2 und erhöhter NTproBNP Serumkonzentration konnte kein statistisches Signifikanzniveau dokumentiert werden.

Wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang der im gesamten Studienkollektiv pathologisch erhöhten NTproBNP Serumkonzentration mit der immunhistochemisch nachgewiesenen Myokardfibrose verifizieren. Warum kein Zusammenhang aufzeigbar war, obwohl prinzipiell zu vereinbaren, ist unklar. Eine Vermutung ist, dass die vorhandene Myokardfibrose, wie sie zum Zeitpunkt der kompensierten Herzfunktion auftritt, noch keinen erheblichen, beziehungsweise klinischen Einfluss auf die Kontraktilität des Myokards hat. Diese Hypothese steht jedoch im Widerspruch zur isoliert deutlich erhöhten NTproBNP Serumkonzentration. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die verhältnismäßig geringe Zahl der untersuchten Patienten keine endgültige Aussage in Bezug auf diese Korrelation zulässt.

Das Atriale-natriuretische Peptid wird in verschiedenen Arbeiten als potentiell nützlicher Serummarker für eine Herzinsuffizienz angesehen<sup>64,95</sup>. Der immunhistochemische Nachweis von ANP ist im insuffizienten Ventrikel beschrieben, während im gesunden Ventrikelgewebe ANP nicht vorkam<sup>49</sup>.

Obwohl keine laborchemischen Messungen des ANP beziehungsweise des NTproANP durchgeführt wurde, also auch keine Korrelationen mit strukturellen Veränderungen am Myokard erhoben wurde, konnten wir ANP durch immunhistochemische Färbemethoden im Ventrikelmyokard von fünf Patienten des Studienkollektivs nachweisen. Diese Feststellung sollte durch weiterführende Untersuchungen kontrolliert werden und die Aussagekraft in dem speziellen Kontext eines Patientengutes mit erhaltener Herzfunktion untersucht werden. Hierbei lohnt womöglich im Speziellen der Nachweis der NTproANP Serumkonzentration.

---

Die Frage, ob klassische kardiale Biomarker wie BNP (respektive NTproBNP) Aussagekraft über den strukturellen Zustand des Myokard bei schwerer Aortenstenose und erhaltener linksventrikulärer Herzfunktion haben, kann in dieser Arbeit nicht eindeutig beantwortet werden. Im Zusammenschluss der Ergebnisse und in Betrachtung der Literatur unterstützen unsere Daten die Überlegungen, B-Typ natriuretische Peptide speziell in der Stratifizierung der Patienten mit Aortenstenose als Biomarker zu nutzen, um hier zur Evaluation des optimalen Operationszeitpunktes beizutragen. Es sollten unbedingt weiterführende und umfangreichere Studien folgen, um diesen Sachverhalt klarer auszuarbeiten.

#### **4.4 Prokollagene als Serummarker des Strukturdefizits bei erhaltener systolischer Herzfunktion**

Die Synthese von Kollagen vollzieht sich über die Vorstufe des Prokollagens. Im Prokollagenstoffwechsel werden bei extrazellulärer Ablagerung der Vorläuferkollagene terminale Propeptide in äquimolarer Menge abgespalten. Die Prokollagen-Propeptide zirkulieren im Blut und können hier nachgewiesen werden. Es wurde das N-terminale-Propeptid des Typ III Prokollagen (PIIIP) und das aminoternale Propeptid des Typ I Prokollagen (PIP) als Marker für Synthese der Kollagene I beziehungsweise III untersucht.

Das I-carboxyterminale Telopeptid (ICTP) ist ein Abbauprodukt des Kollagen und kann gleichfalls im Serum bestimmt werden. Es kann also als Marker des Abbaus von Kollagen gesehen werden.

Der Einsatz von Serummarkern des Kollagenumbaus ist bei Patienten mit den verschiedensten Erkrankungen bekannt. So ist das Prokollagen-III-Propeptid in der Verlaufsdagnostik von Lebererkrankungen etabliert<sup>37-39</sup>. Messungen der Stoffwechselprodukte des Kollagen I werden unter anderem im Verlauf von Knochenstoffwechselerkrankungen zur Therapiekontrolle angewendet<sup>96-99</sup>.

Prokollagen-Propeptide finden jedoch auch in der Diagnostik von Herzerkrankungen Verwendung. Im Vergleich beider Prokollagene scheint PIIIP in der Diagnostik struktureller Herzerkrankungen über eine stärkere Aussagekraft gegenüber PIP zu verfügen. Erhöhte PIIIP Serumspiegel spiegeln eine vermehrte Kollagen III Synthese wider und haben einen unabhängigen prädikativen Wert für das Outcome von Patienten mit chronischer

Herzinsuffizienz<sup>42</sup>. Biolo et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass erhöhte PIIP Serumspiegel bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz mit erhöhten kardialen Füllungsdrücken assoziiert waren<sup>44</sup>. Diez et al. postulierten bereits 1997, dass die Messung der Serumkonzentration der Prokollagene I und III eine Methode des Monitorings des kardialen Kollagenstoffwechsels und somit einer potentiellen Myokardfibrose sein kann<sup>41</sup>. Klappacher et al. konnten demonstrieren, dass bei Patienten mit Kardiomyopathie die Serumkonzentration des PIIP mit der myokardialen Fibrose korreliert<sup>40</sup>.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit gegenüber der Referenz keine erhöhten Serumkonzentrationen beider in dieser Studie untersuchten Prokollagene (PIP und PIIP) feststellen. In der direkten Korrelation der PIP und PIIP Serumkonzentration konnte keine signifikante Korrelation beobachtet werden. Die Serumspiegel von PIP und PIIP scheinen daher zum Zeitpunkt einer kompensierten Herzfunktion bei Aortenstenose isoliert keinen direkten Hinweis auf den verstärkten myokardialen Kollagenstoffwechsel zu geben, obwohl wir für alle Extrazellulärmatrixparameter eine signifikante Erhöhung im Gewebe messen konnten. Der Nachweis der Prokollagene im Gewebe scheint also in diesem Kontext empfindlicher zu sein.

Obwohl keine isolierte Erhöhung der Prokollagene PIP und PIIP im Serum der Patienten aufgezeigt werden konnte, wurde trotzdem eine signifikante Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen für PIIP und NTproBNP nachgewiesen. Für PIP im Serum und NTproBNP im Serum konnte keine Korrelation festgestellt werden.

Weder die PIIP-Konzentration, noch die PIP-Konzentration im Serum korrelierte positiv mit dem Nachweis von ACTN-1 im Myokard und dem Nachweis von strukturdefizientem ACTN-2.

Bei signifikanter Korrelation von PIIP-Serumkonzentration und NTproBNP-Serumkonzentration ist PIIP ein womöglich kardioselektiveren Marker gegenüber PIP darstellt, obwohl PIIP isoliert nicht erhöht war.

Es bleibt in diesem Kontext jedoch zu bemerken, daß für die gestörte diastolische, aber erhaltene systolische Herzfunktion die Prokollagene als potente Surrogatmarker einer Myokardfibrose nicht geeignet zu sein scheinen. Dabei ist zu bedenken, dass im Vergleich zum Kollagengehalt des gesamten Organismus der Anteil an kardialem Kollagen relativ gering ist.

---

Veränderungen an diesem Pool werden vermutlich durch den Anteil des nicht-kardialen Kollagens nicht zur Geltung gebracht. Es bleibt zu untersuchen, ob die Serumkonzentrationen der Prokollagene bei Patienten mit hochgradiger Aortenstenose und reduzierter Herzfunktion erhöht sind. Möglicherweise ist die diagnostische Potenz dieser besonderen Biomarker dort stärker. Es sollten sich in diesem Zusammenhang weiterführende klinische Studien anschließen.

#### **4.5 Diskussionsbeitrag zum Operationszeitpunkt der Aortenstenose**

Die valvuläre Aortenstenose ist die häufigste Klappenerkrankung in der westlichen Welt und kann operativ-therapeutisch gut behandelt werden <sup>7,77</sup>. Auf Grund des demographischen Wandels in der (westlichen) Gesellschaft wird die Anzahl der Patienten mit Diagnose einer interventionspflichtigen Aortenstenose in Zukunft weiter steigen. Daher ist es jetzt und in Zukunft von großer Bedeutung, den betroffenen Patienten aussagekräftige Diagnostik und rechtzeitige Therapie zukommen zu lassen. Der Goldstandard der Diagnostik stellt, wie bereits erwähnt, die Echokardiographie dar. Der Goldstandard in der Therapie der valvulären Aortenstenose ist der operative Klappenersatz, wenn dieser unter den gegebenen Voraussetzungen möglich ist <sup>100</sup>.

Die valvuläre Aortenstenose resultiert unbehandelt in einem kardialen Remodeling mit sekundärer Ausbildung einer Herzinsuffizienz. Deshalb ist es das Ziel der Therapie von Herzerkrankungen mit begleitender Fibrosierung, wie der Aortenstenose, diese pathologische Veränderung aufzuhalten und im günstigsten Fall im Sinne eines „Re-Remodeling“ umzukehren <sup>34</sup>.

In früheren Arbeiten ist das Phänomen einer myokardialen Fibrose bei Patienten mit Aortenstenose beschrieben worden <sup>9,68</sup>. Die Fibrose scheint in diesem Zusammenhang im Sinne einer „Ersatzfibrose“ bei Verlust an kontraktilen Zellen aufgrund der anhaltenden Druckbelastung zu entstehen. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Erkenntnisse durch Nachweis einer signifikanten Fibrosierung und einem Verlust an funktionstüchtigem kontraktilen Apparat durch Nachweis von strukturaberrantem ACTN-2 und der Detektion des Glattmuskelzell-ACTN-1 im Myokard der Studienpatienten.

---

Studien verschiedener Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass das klinische Resultat konservativ therapierter Patienten im Vergleich zu operativ therapierten Patienten signifikant ungünstiger ist, da sich im Verlauf dieser Erkrankung über die Zeit eine chronische Herzinsuffizienz einstellt<sup>94</sup>. Auch die Präsenz einer manifesten Hypertrophie und einer ventrikulären Funktionsstörung zum Operationszeitpunkt gehen mit einer ungünstigeren Überlebensrate postoperativ einher<sup>101</sup>. Der Ersatz der erkrankten Herzklappe hingegen bedingt eine Verbesserung der, insbesondere in der frühen Krankheitsphase, führenden diastolischen Dysfunktion<sup>102,103</sup>. Aus diesen Erkenntnissen sollten sich neue operative Ansätze und Überlegungen bezüglich der Entlastung des druckbelasteten linken Ventrikels entwickeln.

In jüngster Zeit wurden neben dem klassischen offenen operativen Klappenersatz eine Reihe alternativer Verfahren entwickelt. Hierzu zählen die perkutanen und die transapikalen Klappenersatzverfahren, die bisher auf Grund des sicheren und etablierten klassischen Operationsverfahrens lediglich einer kleinen Anzahl von Risikopatienten vorbehalten sind.

Im weiteren sind hämodynamisch günstigere und insbesondere langlebigere Klappenprothesen auf dem Markt verfügbar, die die Rate von frühzeitigen Reoperationen bei Prothesenversagen oder Rekalzifikation verringern können<sup>3</sup>. Die Anwendung verbesserter Prothesen und risikoreduzierter Verfahren zum Ersatz der stenosierten Aortenklappe können in diesem Zusammenhang weitere Argumente für eine frühzeitigere Operation sein. In Anbetracht der Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion in der Folge der chronischen Druckbelastung empfehlen Otto et al. eine frühzeitigere Intervention<sup>104</sup>.

Obwohl die Leitlinien zur Operationsindikation gründlich ausgearbeitet worden und allgemein anerkannt sind<sup>10,11</sup>, wird der optimale Zeitpunkt der Intervention weiterhin kontrovers diskutiert<sup>3,105</sup>. Hein et al., die als Erste eine Struktur-Funktion-Korrelation bei Patienten mit Aortenstenose untersucht haben, konnten belegen, dass der Verlust an sarkomerischer Integrität und die kardiale Fibrose bei chronisch druckbelasteten Herzen zu einem Funktionsverlust führen, der bei Patienten mit ungünstiger Ausgangssituation funktionell nicht vollständig reversibel ist<sup>9</sup>.

Der Fortschritt auf dem Gebiet der Klappenchirurgie und die Resultate der Arbeiten von Krayenbuehl et al. und Hein et al., sowie die Befunde der hier vorliegenden Arbeit, die den Eintritt myokardialer struktureller Schädigung bei erhaltener systolischer Herzfunktion zeigen konnten, geben Anlass dazu, den optimalen Zeitpunkt für den operativen Klappenersatz zur Diskussion zu stellen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir Erkenntnisse gewinnen, die dieser aktuell kontroversen Diskussion weiterführende Hinweise über den morphologischen Zustand des Herzmuskels bei Zustand nach chronischer Druckbelastung bei valvulärer Aortenstenose und erhaltener Herzfunktion liefern.

Als Einschränkung dieser Arbeit ist sicher die geringe Anzahl an Patienten im Studienkollektiv anzusehen, weshalb sich weiterführende Studien zu diesem Thema mit größerer Studienpopulation, möglicherweise mit histologischen Folgeuntersuchungen, anschließen sollten.

## 5 Zusammenfassung

Die valvuläre Aortenstenose ist die häufigste erworbene Klappenerkrankung in der westlichen Welt. Als Folge der Stenosierung der linksventrikulären Ausflussbahn entwickelt sich durch die chronische Druckbelastung des Herzens eine pathologische kardiale Hypertrophie und eine Herzinsuffizienz. Im Verlauf dieser Entwicklung findet ein kardiales Remodeling mit strukturellen Veränderungen der Herzmuskelzellen und Fibrose statt.

Die Korrektur dieses Herzklappenfehlers erfolgt bei den meisten Patienten mittels eines standardisierten herzchirurgischen Eingriffs. Frühere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass die myokardialen strukturellen Veränderungen auch nach Ersatz der erkrankten Herzklappe nicht vollständig reversibel sind. Allerdings waren Untersuchungen an Patienten mit erhaltener systolischer Herzfunktion bei Aortenstenose in dieser Form noch nicht Gegenstand der Forschung.

Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Studie zweigliedrig: Erstens sollten myokardiale Strukturen bei Patienten mit schwergradiger Aortenstenose aber erhaltener Ejektionsfraktion untersucht werden, zweitens sollten diese strukturellen Veränderungen im Gewebe mit Biomarkern der diagnostischen Routine korreliert werden.

Mittels immunhistochemischer Methoden konnte die spezifische Zusammensetzung der myokardialen Extrazellulärmatrix quantifiziert werden. Der gefundene Grad der Fibrose des Herzmuskels war signifikant erhöht. Der myokardiale interstitielle Raum im Gewebe der Studiengruppe war signifikant gegenüber der Kontrolle vergrößert (21,9 % versus 12,74 % Kontrolle). Spezifische Messungen ergaben signifikant erhöhte Werte für Kollagen I (8,51 % versus 1,98% Kontrolle), Kollagen III (16,67 % versus 7,62 % Kontrolle) und für Kollagen VI (26,61 % versus 14,6 % Kontrolle). Kollagenstoffwechselprodukte, wie Prokollagen-I-Propeptid (18,71 % versus 8,58 % Kontrolle) und Prokollagen-III-Propeptid (16,1 % versus 9,48 % Kontrolle) waren ebenfalls signifikant verstärkt nachweisbar.

Zur Darstellung von strukturellen Veränderungen der Myozyten wurden mit zwei verschiedenen Alpha-Aktinin-Antikörpern spezifisch angefärbt. Das im glatten Muskel vorkommende ACTN-1 (BM 75.2) wurde in Biopsien von zehn Patienten in Form von klusterartigen Ansammlungen nachgewiesen. Desorganisation der sarkomerischen Struktur der Myozyten anhand des Nachweises von dysmorphem ACTN-2 (EA 53.3) gelang bei 25 Patienten.

Wir konnten präoperativ eine Erhöhung der Serumkonzentration der B-Typ natriuretischen Peptide nachweisen. Immunhistochemisch gelang der Nachweis von BNP bei 16 Patienten, der ventrikuläre ANP-Nachweis in fünf Fällen. Eine signifikante Korrelation konnte zwischen erhöhten NTproBNP Serumwerten und dem Nachweis von ACTN-1, nicht aber für ACTN-2 gezeigt werden. Erhöhte NTproBNP Konzentration korrelierten nicht mit einem positiven zytoplasmatischen BNP-Nachweis im Gewebe. Eine Korrelation zwischen NTproBNP im Serum und der Extrazellulärmatrix blieb aus, womöglich begründet durch die geringe Anzahl an Studienpatienten (n=31).

Die Prokollagen-I- und III-Propeptide im Serum waren gegenüber der Referenz nicht erhöht. Eine Korrelation von PIP und PIIP im Serum mit der Extrazellulärmatrix war nicht feststellbar. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen PIIP und NTproBNP Serumkonzentration gezeigt werden, wohingegen eine Signifikanz für PIP versus NTproBNP im Serum fehlte.

Diese Ergebnisse unterstützen den Einsatz der B-Typ natriuretischen Peptide bei Aortenklappenerkrankungen, wobei weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet an einem größeren Patientenkollektiv folgen sollten.

Der operative Aortenklappenersatz ist ein sicheres und gut etabliertes Verfahren zur Behandlung einer valvulären Aortenstenose. Hierbei ist der Zeitpunkt zu Intervention durch Leitlinien der medizinischen Fachgesellschaften weitgehend vorgegeben. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass bereits im Zustand der erhaltenen Herzfunktion strukturelle Veränderungen bestehen. Weiterführende und umfangreiche Untersuchungen auf diesem Gebiet sollten folgen.

## 6 Summary

Aortic valve stenosis is the most common acquired valvular heart disease in the Western world. The stenosis causes chronic pressure overload of the left ventricle, which leads to cardiac hypertrophy and heart failure. During the development of pathological cardiac hypertrophy cardiac „remodeling“ occurs including alterations of the extracellular matrix resulting in fibrosis and in structural deterioration of the myocytes.

Correction of the valvular defect by open-heart-surgery is commonly and successfully performed in most patients. However, several studies in patients with severely reduced function preoperatively have shown that the symptoms of structural impairment of the left ventricle tissue do not completely disappear after valve replacement. Investigations in patients with aortic stenosis and preserved cardiac function have not been carried out yet.

Therefore, the aim of the study was twofold: 1. To study the myocardial structure in patients with severe aortic stenosis and preserved ejection fraction and 2. To correlate the structural alterations of the interstitium and the myocytes with biomarkers commonly used in clinical diagnostic routine.

Using immunohistochemical procedures we recorded and quantified the specific composition of the myocardial extracellular matrix and found myocardial fibrosis. The interstitial space indicated by fibronectin staining was significantly increased as compared to control (21.9 % vs. 12.74 %). Measurements also showed significantly increased levels of collagen I (8.51 % vs. 1.98 % control), collagen III (16.67 % vs. 7.62 % control) and collagen VI (26.62 % vs. 14.6 % control). Indicators of collagen metabolism such as procollagen-propeptide I (18.71 % vs. 8.58 % control) and procollagen-propeptide III (16.1 % vs. 9.48 % control) were increased as well.

For myocyte deterioration, we used staining with 2 different alpha-actinin antibodies, EA 53.3 for the cardiac specific alpha-actinin 2 (ACTN-2) and BM 75.2 for smooth muscle cell alpha-actinin 1 (ACTN-1). Disorganization of the sarcomeric structure was found in 25 patients. The presence of ACTN-1 in clusters, which normally is absent from ventricular myocytes, was found in 10 patients.

In the present study, a close connection existed between structural impairment observed in cardiomyocytes and the B-type natriuretic peptides, clinically suitable biomarkers for cardiac

disorders. A weak correlation was found between the elevated biomarker NTproBNP and sarcomeric disorganization, whereas the correlation was significant for ACTN-1.

On the one hand, our results support the active use of the biomarkers B-type natriuretic peptides as indicators of myocardial structural degeneration in patients with aortic valve disease. It seems, therefore, worthwhile to carry out further investigations concerning this issue in a larger patient cohort.

On the other hand, a correlation between the procollagen-propeptide serum concentration and the degree of structural deterioration or myocardial fibrosis was absent, probably caused by the small number of patients (n=31) involved in this study.

Aortic valve replacement is a safe and well understood procedure for treating aortic stenosis and the determination of the optimal time point for of the intervention (AVR) follows the topic guidelines for valve disease of the international medical societies.

However, the present data show, that in patients, which still possess a reserved systolic cardiac function, structural alterations are already present and that these might be irreversible. Therefore, studies in a larger patient cohort might be useful to determine the optimal time point for AVR.

---

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Iung B, Baron G, Butchart EG, et al.** A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J.* 2003 Jul;24(13):1231-43.
2. **Eriksen HA, Satta J, Risteli J, Veijola M, Vare P, Soini Y.** Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis. *Atherosclerosis.* 2006 Nov;189(1):91-8.
3. **Carabello BA.** Clinical practice. Aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2002 Feb 28;346(9):677-82.
4. **Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD.** Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation.* 1994 Aug;90(2):844-53.
5. **Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, et al.** Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol.* 1997 Mar 1;29(3):630-4.
6. **Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Barwolf C, et al.** Aortic stenosis. *Clin Res Cardiol.* 2006 Nov;95(11):620-41.
7. **Kapoor JR, Kapoor R.** Aortic valve stenosis. *Lancet.* 2009 Jun 13;373(9680):2023; author reply.
8. **Catalucci D, Latronico MV, Ellingsen O, Condorelli G.** Physiological myocardial hypertrophy: how and why? *Front Biosci.* 2008;13:312-24.
9. **Hein S, Arnon E, Kostin S, et al.** Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation.* 2003 Feb 25;107(7):984-91.
10. **Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, et al.** 2008 focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease). Endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Sep 23;52(13):1-142.

11. **Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, et al.** Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2007 Jan;28(2):230-68.
12. **Franke A, Kuhl HP.** Diagnosis and assessment of severity of aortic valve stenosis. *Herz.* 2006 Oct;31(7):644-9.
13. **Schwarz F, Baumann P, Manthey J, et al.** The effect of aortic valve replacement on survival. *Circulation.* 1982 Nov;66(5):1105-10.
14. **Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, et al.** ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing Committee to Revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease) developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Aug 1;48(3):1-148.
15. **Astor BC, Kaczmarek RG, Hefflin B, Daley WR.** Mortality after aortic valve replacement: results from a nationally representative database. *Ann Thorac Surg.* 2000 Dec;70(6):1939-45.
16. **Hannan EL, Samadashvili Z, Lahey SJ, et al.** Aortic valve replacement for patients with severe aortic stenosis: risk factors and their impact on 30-month mortality. *Ann Thorac Surg.* 2009 Jun;87(6):1741-9.
17. **Grube E, Schuler G, Buellesfeld L, et al.** Percutaneous aortic valve replacement for severe aortic stenosis in high-risk patients using the second- and current third-generation self-expanding CoreValve prosthesis: device success and 30-day clinical outcome. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jul 3;50(1):69-76.
18. **Walther T, Simon P, Dewey T, et al.** Transapical minimally invasive aortic valve implantation: multicenter experience. *Circulation.* 2007 Sep 11;116(11 Suppl):240-5.
19. **Diethrich EB.** The treatment of aortic stenosis: is valvuloplasty ever an alternative to surgery? *J Interv Cardiol.* 1993 Mar;6(1):7-13.
20. **Otto CM, Mickel MC, Kennedy JW, et al.** Three-year outcome after balloon aortic valvuloplasty. Insights into prognosis of valvular aortic stenosis. *Circulation.* 1994 Feb;89(2):642-50.

21. **Wang A, Harrison JK, Bashore TM.** Balloon aortic valvuloplasty. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997 Jul-Aug;40(1):27-36.
22. **Person V, Kostin S, Suzuki K, Labeit S, Schaper J.** Antisense oligonucleotide experiments elucidate the essential role of titin in sarcomerogenesis in adult rat cardiomyocytes in long-term culture. *J Cell Sci.* 2000 Nov;113 Pt 21:3851-9.
23. **Hein S, Block T, Zimmermann R, et al.** Deposition of nonsarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes from patients with dilated cardiomyopathy or chronic pressure overload. *Exp Clin Cardiol.* 2009 Fall;14(3):68-75.
24. **Kostin S, Heling A, Hein S, Klövekorn W-P, Schaper J.** The protein composition of the normal and diseased cardiac myocyte. *Heart Fail Rev.* 1998;2(4):245-60.
25. **Hein S, Kostin S, Bauer E, Klövekorn W, Schaper J.** Das Zytoskelett des Kardiomyzyten im normalen und insuffizienten menschlichen Myokard. I Sarkomere und Zytoplasma. *Germ J Cardio-Vasc Med.* 1998;2:7-22.
26. **Blanchard A, Ohanian V, Critchley D.** The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil.* 1989 Aug;10(4):280-9.
27. **Papa I, Astier C, Kwiatek O, et al.** Alpha actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line. *J Muscle Res Cell Motil.* 1999 Feb;20(2):187-97.
28. **Sorimachi H, Freiburg A, Kolmerer B, et al.** Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J Mol Biol.* 1997 Aug 1;270(5):688-95.
29. **Taylor KA, Taylor DW, Schachat F.** Isoforms of alpha-actinin from cardiac, smooth, and skeletal muscle form polar arrays of actin filaments. *J Cell Biol.* 2000 May 1;149(3):635-46.
30. **Burridge K, Kelly T, Connell L.** Proteins involved in the attachment of actin to the plasma membrane. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1982 Nov 4;299(1095):291-9.
31. **Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC.** Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:637-706.
32. **Shamhart PE, Meszaros JG.** Non-fibrillar collagens: Key mediators of post-infarction cardiac remodeling? *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Jun 30.

33. **Weber KT.** Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 1989 Jun;13(7):1637-52.
34. **Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N.** Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Mar 1;35(3):569-82.
35. **Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, et al.** Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation.* 2009 May 12;119(18):2471-9.
36. **Hein S, Schaper J.** The extracellular matrix in normal and diseased myocardium. *J Nucl Cardiol.* 2001 Mar-Apr;8(2):188-96.
37. **Fontana RJ, Bonkovsky HL, Naishadham D, et al.** Serum fibrosis marker levels decrease after successful antiviral treatment in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009 Feb;7(2):219-26.
38. **Gressner AM.** Measurement of connective tissue parameters in serum for diagnosis and follow-up of liver fibrosis. *Ann Clin Biochem.* 1987 May;24 (Pt 3):283-92.
39. **Schuppan D.** Connective tissue polypeptides in serum as parameters to monitor antifibrotic treatment in hepatic fibrogenesis. *J Hepatol.* 1991;13 Suppl 3:S17-25.
40. **Klappacher G, Franzen P, Haab D, et al.** Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol.* 1995 May 1;75(14):913-8.
41. **Diez J, Laviades C.** Monitoring fibrillar collagen turnover in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res.* 1997 Aug;35(2):202-5.
42. **Cicoira M, Rossi A, Bonapace S, et al.** Independent and additional prognostic value of aminoterminal propeptide of type III procollagen circulating levels in patients with chronic heart failure. *J Card Fail.* 2004 Oct;10(5):403-11.
43. **Lopez B, Gonzalez A, Querejeta R, Diez J.** The use of collagen-derived serum peptides for the clinical assessment of hypertensive heart disease. *J Hypertens.* 2005 Aug;23(8):1445-51.

44. **Biolo A, Rohde LE, Goldraich LA, Mascarenhas M, Palombini DV, Clausell N.** Serum procollagen type III is associated with elevated right-sided filling pressures in stable outpatients with congestive heart failure. *Biomarkers*. 2009 Jul 14.
45. **Sugimoto M, Masutani S, Seki M, Kajino H, Fujieda K, Senzaki H.** High serum levels of procollagen type III N-terminal amino peptide in patients with congenital heart disease. *Heart*. 2009 Dec;95(24):2023-8.
46. **Daniels LB, Maisel AS.** Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Dec 18;50(25):2357-68.
47. **Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, et al.** Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1993 Feb;87(2):464-9.
48. **Bergler-Klein J.** Natriuretic peptides in the management of aortic stenosis. *Curr Cardiol Rep*. 2009 Mar;11(2):85-93.
49. **Arbustini E, Pucci A, Grasso M, et al.** Expression of natriuretic peptide in ventricular myocardium of failing human hearts and its correlation with the severity of clinical and hemodynamic impairment. *Am J Cardiol*. 1990 Oct 15;66(12):973-80.
50. **de Bold AJ.** Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science*. 1985 Nov 15;230(4727):767-70.
51. **Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, et al.** Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest*. 1991 Apr;87(4):1402-12.
52. **Weber M, Hamm C.** Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart*. 2006 Jun;92(6):843-9.
53. **Orlowska-Baranowska E, Baranowski R, Greszata L, Stepinska J.** Brain natriuretic peptide as a marker of left ventricular hypertrophy in patients with aortic stenosis. *J Heart Valve Dis*. 2008 Nov;17(6):598-605.
54. **Petracca F, Affuso F, Di Conza P, et al.** Usefulness of NT-proBNP in the assessment of patients with aortic or mitral regurgitation. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2009 Dec;10(12):928-32.
55. **Potocki M, Mair J, Weber M, et al.** Relation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide to symptoms, severity, and left ventricular remodeling in patients with organic mitral regurgitation. *Am J Cardiol*. 2009 Aug 15;104(4):559-64.

- 
56. **Troughton RW, Richards AM.** B-type natriuretic peptides and echocardiographic measures of cardiac structure and function. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2009 Feb;2(2):216-25.
  57. **Prasad N, Bridges AB, Lang CC, et al.** Brain natriuretic peptide concentrations in patients with aortic stenosis. *Am Heart J.* 1997 Apr;133(4):477-9.
  58. **Talwar S, Downie PF, Squire IB, Davies JE, Barnett DB, Ng LL.** Plasma N-terminal pro BNP and cardiotrophin-1 are elevated in aortic stenosis. *Eur J Heart Fail.* 2001 Jan;3(1):15-9.
  59. **Gerber IL, Stewart RA, Legget ME, et al.** Increased plasma natriuretic peptide levels reflect symptom onset in aortic stenosis. *Circulation.* 2003 Apr 15;107(14):1884-90.
  60. **Weber M, Arnold R, Rau M, et al.** Relation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide to severity of valvular aortic stenosis. *Am J Cardiol.* 2004 Sep 15;94(6):740-5.
  61. **Weber M, Arnold R, Rau M, et al.** Relation of N-terminal pro B-type natriuretic peptide to progression of aortic valve disease. *Eur Heart J.* 2005 May;26(10):1023-30.
  62. **Gerber IL, Legget ME, West TM, Richards AM, Stewart RA.** Usefulness of serial measurement of N-terminal pro-brain natriuretic peptide plasma levels in asymptomatic patients with aortic stenosis to predict symptomatic deterioration. *Am J Cardiol.* 2005 Apr 1;95(7):898-901.
  63. **Lancellotti P, Moonen M, Magne J, et al.** Prognostic effect of long-axis left ventricular dysfunction and B-type natriuretic peptide levels in asymptomatic aortic stenosis. *Am J Cardiol.* 2010 Feb 1;105(3):383-8.
  64. **Potocki M, Breidhardt T, Reichlin T, et al.** Comparison of midregional pro-atrial natriuretic peptide with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure. *J Intern Med.* 2009 May 31.
  65. **Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J.** The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000 Jan 14;45(2):273-8.
  66. **Krayenbuehl HP, Hess OM, Monrad ES, Schneider J, Mall G, Turina M.** Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement. *Circulation.* 1989 Apr;79(4):744-55.
  67. **Gaasch WH, Delorey DE, St John Sutton MG, Zile MR.** Patterns of structural and functional remodeling of the left ventricle in chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2008 Aug 15;102(4):459-62.

- 
68. **Weidemann F, Herrmann S, Stork S, et al.** Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis. *Circulation*. 2009 Aug 18;120(7):577-84.
  69. **Lund O, Kristensen LH, Baandrup U, et al.** Myocardial structure as a determinant of pre- and postoperative ventricular function and long-term prognosis after valve replacement for aortic stenosis. *Eur Heart J*. 1998 Jul;19(7):1099-108.
  70. **Pellikka PA, Sarano ME, Nishimura RA, et al.** Outcome of 622 adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis during prolonged follow-up. *Circulation*. 2005 Jun 21;111(24):3290-5.
  71. **Cowie MR, Jourdain P, Maisel A, et al.** Clinical applications of B-type natriuretic peptide (BNP) testing. *Eur Heart J*. 2003 Oct;24(19):1710-8.
  72. **Melkko J, Kauppila S, Niemi S, et al.** Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem*. 1996 Jun;42(6 Pt 1):947-54.
  73. **Risteli J, Niemi S, Trivedi P, Maentausta O, Mowat AP, Risteli L.** Rapid equilibrium radioimmunoassay for the amino-terminal propeptide of human type III procollagen. *Clin Chem*. 1988 Apr;34(4):715-8.
  74. **Block TM.** Differentielle Expression von alpha-Aktinin Isoformen im Myokard von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. Gießen: Justus-Liebig Universität Gießen, 2006.
  75. **Maron BJ, Ferrans VJ, Roberts WC.** Myocardial ultrastructure in patients with chronic aortic valve disease. *Am J Cardiol*. 1975 May;35(5):725-39.
  76. **Schwarz F, Flameng W, Schaper J, et al.** Myocardial structure and function in patients with aortic valve disease and their relation to postoperative results. *Am J Cardiol*. 1978 Apr;41(4):661-9.
  77. **Carabello BA.** Aortic stenosis: a fatal disease with but a single cure. *JACC Cardiovasc Interv*. 2008 Apr;1(2):127-8.
  78. **Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al.** ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail*. 2008 Oct;10(10):933-89.

- 
79. **Brilla CG, Funck RC, Rupp H.** Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. *Circulation*. 2000 Sep 19;102(12):1388-93.
  80. **Brilla CG, Rupp H, Maisch B.** Effects of ACE inhibition versus non-ACE inhibitor antihypertensive treatment on myocardial fibrosis in patients with arterial hypertension. Retrospective analysis of 120 patients with left ventricular endomyocardial biopsies. *Herz*. 2003 Dec;28(8):744-53.
  81. **Polyakova V, Loeffler I, Hein S, et al.** Fibrosis in endstage human heart failure: Disease-specific changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int J Cardiol*. 2010:DOI: 10.1016/j.ijcard.2010.04.053.
  82. **Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI.** Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res*. 1988 Apr;62(4):757-65.
  83. **Lopez B, Gonzalez A, Querejeta R, Larman M, Diez J.** Alterations in the pattern of collagen deposition may contribute to the deterioration of systolic function in hypertensive patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jul 4;48(1):89-96.
  84. **Truter SL, Catanzaro DF, Supino PG, et al.** Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors and extracellular matrix remodeling in aortic regurgitant hearts. *Cardiology*. 2009;113(3):161-8.
  85. **Heling A, Zimmermann R, Kostin S, et al.** Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circ Res*. 2000 Apr 28;86(8):846-53.
  86. **Schaper J, Froede R, Hein S, et al.** Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1991 Feb;83(2):504-14.
  87. **Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al.** Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 1997 Jul 15;96(2):509-16.
  88. **Qi W, Mathisen P, Kjekshus J, et al.** Natriuretic peptides in patients with aortic stenosis. *Am Heart J*. 2001 Oct;142(4):725-32.

- 
89. **Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al.** Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med.* 2002 Jul 18;347(3):161-7.
  90. **McCullough PA, Nowak RM, McCord J, et al.** B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation.* 2002 Jul 23;106(4):416-22.
  91. **Jourdain P, Jondeau G, Funck F, et al.** Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Apr 24;49(16):1733-9.
  92. **Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM.** Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet.* 2000 Apr 1;355(9210):1126-30.
  93. **Bergler-Klein J, Klaar U, Heger M, et al.** Natriuretic peptides predict symptom-free survival and postoperative outcome in severe aortic stenosis. *Circulation.* 2004 May 18;109(19):2302-8.
  94. **Weber M, Hausen M, Arnold R, et al.** Prognostic value of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide for conservatively and surgically treated patients with aortic valve stenosis. *Heart.* 2006 Nov;92(11):1639-44.
  95. **Cappellin E, Gatti R, Spinella P, et al.** Plasma atrial natriuretic peptide (ANP) fragments proANP (1-30) and proANP (31-67) measurements in chronic heart failure: a useful index for heart transplantation? *Clin Chim Acta.* 2001 Aug 1;310(1):49-52.
  96. **Garnero P, Delmas PD.** Bone markers. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1997 Aug;11(3):517-37.
  97. **Garnero P, Delmas PD.** Biochemical markers of bone turnover: clinical usefulness in osteoporosis. *Ann Biol Clin (Paris).* 1999 Mar-Apr;57(2):137-48.
  98. **Eastell R, Hannon RA.** Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc.* 2008 May;67(2):157-62.
  99. **Engvall IL, Svensson B, Tengstrand B, Brismar K, Hafstrom I.** Impact of low-dose prednisolone on bone synthesis and resorption in early rheumatoid arthritis: experiences from a two-year randomized study. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(6):R128.
  100. **Al-Attar N, Nataf P.** Development of aortic valve implantation. *Herz.* 2009 Aug;34(5):367-73.

101. **Mihaljevic T, Nowicki ER, Rajeswaran J, et al.** Survival after valve replacement for aortic stenosis: implications for decision making. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Jun;135(6):1270-8; discussion 8-9.
102. **Villari B, Vassalli G, Betocchi S, Briguori C, Chiariello M, Hess OM.** Normalization of left ventricular nonuniformity late after valve replacement for aortic stenosis. *Am J Cardiol.* 1996 Jul 1;78(1):66-71.
103. **Villari B, Vassalli G, Monrad ES, Chiariello M, Turina M, Hess OM.** Normalization of diastolic dysfunction in aortic stenosis late after valve replacement. *Circulation.* 1995 May 1;91(9):2353-8.
104. **Otto CM.** Valvular aortic stenosis: disease severity and timing of intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jun 6;47(11):2141-51.
105. **Otto CM.** Timing of aortic valve surgery. *Heart.* 2000 Aug;84(2):211-8.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

$\Delta P_{\text{mean AV}}$	Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe
Abb.	Abbildung
ACC	American College of Cardiology
ACEI	Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitor (=ACE-Hemmer)
ACS	akutes Koronarsyndrom
ACTN-1	Alpha-Aktinin 1
ACTN-2	Alpha-Aktinin 2
ACTN-3	Alpha-Aktinin 3
ACTN-4	Alpha-Aktinin 4
AHA	American Heart Association
AK	Antikörper
ANP	Atrial-natriuretisches Peptid
AS	Aortenstenose
ATP	Adenosintriphosphat
AV	aortic valve = Aortenklappe
AVAI	aortic valve area index = KÖF/BSA
AVR	aortic valve replacement = Aortenklappenersatz
BMI	Body-mass-index
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	body surface area (dt.: Körperoberfläche, hier Formel nach Dubois)
C	Celsius
CD	Cluster of differentiation
CITP	C-Telopeptid von Kollagen I
CTP	Cytosintriphosphat
DAPI	4'-6-Diamidino-2'-phenylindol-Dihydrochlorid
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DGTHG	Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
DRAQ	Deep-red-fluorescing bisalkylaminoanthraquinone

---

EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiographie
ESC	European Society of Cardiology
EZM	Extrazellulärmatrix (= ECM)
FITC	Fluorescein-5-isocyanat
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HE	Hämatoxilin-Eosin
H <sub>2</sub> O	Wasser
ICTP	I-carboxyterminales Telopeptid von Kollagen I
ISH	In Situ Hybridisierung
i.S.	im (Blut-)Serum
i.v.	intra-venös
IVS	Interventrikuläres Septum
KCL	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KHK	koronare Herzerkrankung
KÖF	Klappenöffnungsfläche
l	Liter
LV	Linker Ventrikel
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck (engl.: pressure)
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Diameter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
min	Minute
ml	Milliliter

---

mg	Milligramm
mRNA	Messenger-Ribonukleinacid (=säure)
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
n	number
ns	nicht signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit $p > 0,05$ )
NTproANP	N-terminales Fragment des pro-Atrial-natriuretischen Peptids
NTproBNP	N-terminales Fragment des B-Typ natruretischen Peptids
NYHA	New York Heart Association
pAO	Pressure (in the) aorta (aortaler Druck) in mmHg
PBS	Phosphate balanced salt solution
PCW	Pulmonary Capillary Wedge (pulmonalkapillärer Verschlußdruck)
PECAM	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PFA	Paraformaldehyd
PIIINP / PIIP	Prokollagen-Typ III amino-terminales Propeptid
PINP / PIP	Prokollagen-Typ I amino-terminales Propeptid
pLV	Pressure (in the) left ventricle (linksventrikulärer Druck) in mmHg
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunassay
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RR	Riva-Rocci (= nichtinvasive Blutdruckmessung)
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TEE	Transeosophageale Echokardiographie
TTE	Transthorakale Echokardiographie
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UTP	Udenosintriphosphat
VHF	Vorhofflimmern
vs.	versus

---

## 9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim angefertigt. Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Braun danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an diesem renommierten Institut.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Dr. hc. Jutta Schaper für die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themas und für die herzliche Aufnahme in die Umgebung dieses Max-Planck-Instituts. Ich habe dies immer als besonderes Privileg empfunden.

Ich möchte Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sawa Kostin für die Integration in seine Arbeitsgruppe und die exzellente fachliche Unterstützung in allen Fragen der experimentellen Kardiologie und immunhistochemischen Bildgebung danken.

Mein großer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Weber für die Bereitstellung und Koordination des Patientenkollektivs und der außergewöhnlichen Hilfestellungen bei allen klinisch-fachlichen Aspekten im Umfeld der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. med. Stefan Hein für die Koordination der kardiochirurgischen Aspekte der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen. Darüber hinaus hätte ich ohne Herrn Dr. med. Stefan Hein vermutlich nie das Privileg genießen können, in dieser optimalen Umgebung arbeiten zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. biol. hom. Kerstin Troidl für die wunderbare Zusammenarbeit und die fachliche und inhaltliche Unterstützung in allen Fragen der Molekularbiologie.

Ich möchte Herrn Prof. Wei-Jun Cai für die Zusammenarbeit und die Hilfestellung bei der Erstellung der konfokalen Fotografien danken, sowie Frau Dr. Victoria Polyakova für die anregenden fachlichen Diskussionen.

Besonders danken möchte ich Beate Grohmann für die Einführung in das Laborwesen, die Unterstützung in der Immunhistochemie und die vielen interessanten Gespräche.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Sprudelhof-KollegInnen für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, besonders Carmen Büttner, Renate Möhren und Brigitte Matzke für die Hilfe bei der täglichen Laborarbeit.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**