

Aus der
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Monozytensubpopulationen bei Patienten mit hochgradiger
Aortenklappenstenose**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Chi-Diep Au

aus Osnabrück

Datum der Promotion: 26. Juni 2022

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden vorab in folgendem Paper veröffentlicht:

B Hewing, **SCD Au**, A Ludwig, R Ellerbroek, P van Dijck, L Hartmann, H Grubitzsch, C Giannini, M Laule, V Stangl, G Baumann, K Stangl. Severe aortic valve stenosis is associated with increased levels of intermediate monocytes. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, Volume 10, pages 27–34 (2017)

Die Verwendung der Inhalte und der Abbildungen in abgeänderter Form wurden autorisiert:

Adapted/Translated by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature: *Journal of Cardiovascular Translational Research*, „Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes“, Bernd Hewing, Sebastian Chi-Diep Au, Antje Ludwig, Rena Ellerbroek, Philipp van Dijck, Lisa Hartmann, Heiko Grubitzsch, Carolin Giannini, Michael Laule, Verena Stangl, Gert Baumann, Karl Stangl, 2017

Lizenznummer: 4672411084234

Datum der Lizenzierung: 19. September 2019

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	8
1 Abstract.....	9
1.1 In deutscher Sprache.....	9
1.2 In englischer Sprache.....	11
2 Einleitung.....	12
2.1 Aortenklappenstenose.....	12
2.1.1 Definition und Epidemiologie.....	12
2.1.2 Makroskopischer und histologischer Aufbau der Aortenklappe.....	12
2.1.3 Pathogenese.....	13
2.1.4 Auswirkung der AS auf das Herz.....	16
2.1.5 Klinik.....	17
2.1.6 Diagnostik.....	17
2.1.7 Stadieneinteilung.....	18
2.1.8 Therapie.....	19
2.2 Humane Monozytensubpopulationen.....	22
2.3 Ziel der Studie.....	26
3 Material und Methoden.....	27
3.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	27
3.2 Patientenrekrutierung.....	28
3.3 Blutentnahme.....	29
3.4 Laborchemische Analyse der Monozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie.....	30
3.4.1 Methodik der Durchflusszytometrie.....	30
3.4.2 Verwendete Antikörper.....	32
3.4.3 Isotypkontrollen.....	34
3.4.4 Probenverarbeitung.....	36
3.4.5 Differenzierung der Monozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie 36	
3.5 Statistische Auswertung.....	40

4	Ergebnisse	41
4.1	Klinische Charakteristika	41
4.2	Analyse der Monozytensubpopulationen	45
5	Diskussion.....	48
5.1	Methodisches Vorgehen.....	48
5.2	Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in den Kontext klinischer Studien....	50
5.3	Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in den Kontext experimenteller Studien	52
5.4	Ausblick.....	54
6	Zusammenfassung.....	57
7	Literaturverzeichnis	59
8	Eidesstattliche Versicherung.....	69
9	Anteilerklärung an der erfolgten Publikation	70
10	Lebenslauf	71
11	Publikationsliste	73
12	Danksagung.....	74

Abkürzungsverzeichnis

18F-FDG	18F-Fluorodesoxyglukose
18F-NaF	18F-Natriumflourid
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AKE	Chirurgischer Aortenklappenersatz
AS	Aortenklappenstenose
ASTRONOMER	Aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin Studie
AT-1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
AVA	Klappenöffnungsfläche, Aortic valve area
CANTOS	Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-Reaktives Protein
CCL	C-C Chemokin Ligand
CCR	C-C Chemokin Rezeptor
CKD	Chronische Niereninsuffizienz
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren
CT	Computertomographie
DAMP	Damage-associated molecular pattern
EKG	Elektrokardiogramm
ESC	European Society of Cardiology
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
Fc γ III	Fc gamma Region III
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1

IL-1 β	Interleukin 1-beta
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
KOF	Körperoberfläche
KÖF	Klappenöffnungsfläche
LDL	Low-density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LV-EF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NT-proBNP	N-terminal pro-B-Typ-natriuretisches Peptid
Ox-LDL	oxidiertes LDL
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PARTNER	Placement of Aortic Transcatheter Valves Studie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET-CT	Positron-Emissions-Tomographie-Computertomographie
ΔP_{mean}	Mittlerer Druckgradient
PROM	Predicted risk of mortality models
Rho	Ras homologue
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SEAS	Simvastatin Ezetimibe in Aortic Stenosis Study
SIPR α	Signal-regulatory protein alpha

SSC	Sidewards Scatter
STS	Society of Thoracic Surgeons
SURTAVI	Surgical Replacement and Transcatheter Aortic Valve Implantation
TAVI	Transkatheter-Aortenklappenimplantation
TEE	Transösophageale Echokardiographie
TLR	Toll Like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TTE	Transthorakale Echokardiographie
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VEC	Valvuläre endotheliale Zelle
VIC	Valvuläre interstitielle Zelle
Vmax	Maximale Flussgeschwindigkeit
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	32
Abbildung 2a: Interferenz, Einzelprobe CD86 Antikörper, Farbstoff PE	33
Abbildung 2b: Interferenz, Einzelprobe CD14 Antikörper, Farbstoff PB	33
Abbildung 2c: Interferenz, Einzelprobe CD16 Antikörper, Farbstoff APC	34
Abbildung 2d: Interferenz, Einzelprobe CD11b Antikörper, Farbstoff PE-Cy7	34
Abbildung 3: Isotypkontrolle.....	35
Abbildung 4: Verwendung des Panmonozytenmarkers CD86.....	37
Abbildung 5: Gating-Strategie zur Bestimmung der Monozytensubpopulationen und der Monozytenaktivierung.....	39
Abbildung 6: Box-Plots Monozytensubpopulationen bei Patienten mit und ohne hochgradige AS	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der AS nach morphologischen und hämodynamischen Kriterien.....	19
Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien.....	28
Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	32
Tabelle 4: Alter, Geschlecht und echokardiographische Charakteristika	42
Tabelle 5: Kardiovaskuläre Risikofaktoren	42
Tabelle 6: Kardiovaskuläre Vorerkrankungen.....	43
Tabelle 7: Medikation	43
Tabelle 8: Immunzellen und Entzündungsmarker	44
Tabelle 9: Absolute und relative Monozytenzahlen, Monozytenaktivierung	46

1 Abstract

1.1 In deutscher Sprache

Einleitung: Die kalzifizierende Aortenklappenstenose (AS) ist das häufigste therapiebedürftige Klappenvitium im höheren Alter. Die Pathogenese der AS ist durch chronische Inflammation, Fibrosierung und Kalzifizierungsprozesse charakterisiert und ähnelt der Atherosklerose; jedoch bestehen distinkte biochemische und klinische Unterschiede zwischen den beiden Erkrankungen. Aktuell existiert keine medikamentöse Möglichkeit, die pathogenetisch zugrundeliegenden Entzündungs- und Kalzifizierungsprozesse und den Progress der AS zu beeinflussen.

Monozyten spielen als zentraler zellulärer Faktor eine bedeutende Rolle in der Inflammation in der Atherosklerose. Von den drei bekannten Monozytensubpopulationen – klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische (CD14⁺CD16⁺⁺) Monozyten – wird insbesondere die intermediäre Monozytensubpopulation als proinflammatorisch angesehen und mit Erkrankungen aus dem atherosklerotischen Formenkreis assoziiert. Die Bedeutung der Monozytensubpopulationen beim Krankheitsbild der AS wurde bisher noch nicht untersucht. Die vorliegende Dissertation untersucht erstmalig die Verteilung von Monozytensubpopulationen bei Patienten hochgradiger AS.

Material und Methoden: Die absolute Anzahl und die relative Verteilung der klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten sowie deren Aktivierungsstatus wurden aus dem peripheren Blut bei 100 Patienten mit hochgradiger AS und 75 Patienten ohne AS durchflusszytometrisch bestimmt.

Ergebnisse: Patienten mit hochgradiger AS wiesen im Vergleich zu Patienten ohne AS einen signifikant erhöhten Gehalt an intermediären Monozyten im Blut auf. Hingegen unterschieden sich die Anzahl und der Gehalt der klassischen und nicht-klassischen Monozyten zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant. Unterschiede im Aktivitätsstatus der Monozytensubpopulationen ließen sich nicht nachweisen. Der Unterschied im Gehalt der intermediären Monozyten war unabhängig von den Faktoren Alter, Geschlecht, BMI, LDL-Cholesterin, Herzinsuffizienz und Niereninsuffizienz.

Schlussfolgerung: Eine hochgradige AS ist mit einem erhöhten Gehalt an CD14⁺⁺CD16⁺ intermediären Monozyten assoziiert. Die Kausalität dieses Zusammenhangs verbleibt aktuell unklar, er unterstreicht jedoch die inflammatorische Pathogenese der Erkrankung. Aufgrund der engen Vernetzung der intermediären Monozytensubpopulation mit den inflammatorischen Mechanismen der AS - insbesondere mit dem IL-1 β -Signalweg, MCP-1, etc. - stellen sie einen weiteren potentiellen Faktor in der Pathogenese der AS dar. Andererseits ist auch ein Anstieg der intermediären Monozytensubpopulation im Rahmen der hämodynamischen Veränderungen möglich. Längsschnittstudien sowie Studien zur genaueren Geno- und Phänotypisierung der einzelnen Monozytensubpopulationen sollten durchgeführt werden, um die Rolle der intermediären Monozyten in der AS weiter zu explorieren. Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der AS ist die Voraussetzung für die Entwicklung medikamentöser Therapieansätze.

1.2 In englischer Sprache

Introduction: Calcifying aortic valve stenosis (AS) is the most prevalent valvular disease in the elderly. It is characterized by inflammation, fibrosation and calcification processes similar to atherosclerosis. However, there are distinct differences in pathogenesis between the two diseases. At the current moment there is no medical treatment possibility that corrects the underlying pathophysiological inflammatory and calcification mechanisms.

Monocytes are subdivided in classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺) and non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺) classical monocytes. They are a central factor in inflammation in atherosclerosis, however their role in aortic valve stenosis has not yet been examined. Of the three monocyte subsets intermediate monocytes in particular have been associated to atherosclerotic disease. This dissertation aims to examine the distribution of individual monocyte subsets in patients with severe AS.

Materials and methods: 100 patients with severe AS were recruited. 75 patients without AS served as control group. The absolute and the relative distribution of classical, intermediate and non-classical monocytes, as well as their activation status were measured in the peripheral blood by flow cytometry.

Results: Patients with severe AS had significantly increased levels of intermediate monocytes in peripheral blood samples. Classical and non-classical monocytes did not differ significantly between patients with and without AS. We did not observe changes in monocyte activation status between both groups. The difference in the absolute and relative distribution of intermediate monocytes was independent of the factors age, gender, BMI, LDL-cholesterol, heart failure and renal impairment.

Conclusions: Severe AS is associated with elevated levels of intermediate monocytes. The causality of our findings remains unclear at the moment. However, this elucidates the inflammatory properties of AS. Intermediate monocytes are closely linked with multiple inflammatory path ways such as IL-1 β , MCP-1, etc. and may therefore be an integral part to the inflammatory pathomechanisms in AS. Longitudinal studies as well as studies to further the geno- and phenotyping of the three monocyte subpopulations may expand the knowledge about the role of intermediate monocytes in AS and may be integral to find new medical therapeutic approaches.

2 Einleitung

2.1 Aortenklappenstenose

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Aortenklappenstenose (AS) ist durch eine Einengung der linksventrikulären Ausflussbahn im Bereich der Aortenklappe charakterisiert. Je nach Lokalisation der Stenose werden subvalvuläre, valvuläre und supra-valvuläre Formen der AS unterschieden. Dabei stellt die valvuläre AS, welche die Verengung der Taschenklappe an sich beschreibt, die häufigste Form der AS dar (1).

Die AS ist die häufigste therapiebedürftige Klappenerkrankung im höheren Lebensalter (1). Die Prävalenz der AS steigt mit zunehmendem Alter deutlich an. Während bei den unter 65-Jährigen lediglich 0,2% und bei den 65- bis 74-Jährigen 1,3% betroffen sind, steigt die Prävalenz bei über 80-Jährigen auf etwa 9,8% an (2, 3). Die Aortenklappensklerose, welche als Vorstufe der AS angesehen wird, hat bei Patienten über 65 Jahren sogar eine Prävalenz von 26% (4).

2.1.2 Makroskopischer und histologischer Aufbau der Aortenklappe

Die Aortenklappenanlage ist im Normalfall trikuspid. Hier besteht die Aortenklappe aus drei halbmondförmigen Taschen (Valvulae semilunares), die während der Systole den Blutausstrom vom linken Ventrikel in die Aorta erlauben und während der Diastole eine Regurgitation verhindern. Bei 0,5 bis 2% der Bevölkerung liegt eine bikuspidale Anlage vor, bei der die Aortenklappe nur aus zwei Taschenklappen besteht (5). Diese Kondition kann sowohl angeboren sein, als auch postnatal durch eine Fusionierung von zwei Taschen der primär trikuspid angelegten Klappe entstehen (5). Im Gesunden sind die Taschenklappen weniger als 1 Millimeter dick. Sie haben eine endotheliale Umhüllung aus valvulären Endothelzellen (VECs) und einen interstitiellen Kern, der aus drei Schichten, der Lamina fibrosa, der Lamina spongiosa und der Lamina ventricularis, besteht. Das Interstitium besteht aus einem zellulären Anteil, den sogenannten valvulären interstitiellen Zellen (VICs), und einer komplexen extrazellulären Matrix. Der hochspezialisierte histologische Aufbau der Valvulae semilunares ist angepasst an die mechanischen Anforderungen und hämodynamische Belastung der Aortenklappe. Die Lamina ventricularis, welche sich auf der ventrikulären Seite der Taschen befindet und

sich bei der Öffnungs- und Schließbewegung mit jedem Herzschlag am meisten verbiegen muss, weist neben Kollagenfasern einen hohen Anteil des biegsamen Proteinpolymers Elastin auf, um die Verformung und Elastizität zu ermöglichen. Die Lamina fibrosa, welche sich auf der aortalen Seite der Taschen befindet und beim Klappenschluss einer hohen Krafteinwirkung widerstehen muss, enthält einen hohen Anteil von Fibroblasten und reißfesten Kollagenfasern Typ I auf, welche stabilisierend wirken. Zwischen den beiden Schichten befindet sich die Lamina spongiosa, welche eine mucopolysaccharidreiche, lockere Matrix enthält und als Verschiebeschicht zwischen Lamina ventricularis und Lamina fibrosa dient. (6)

2.1.3 Pathogenese

Die häufigste Form der valvulären AS ist die sogenannte kalzifizierende Aortenklappenstenose. Während diese Form der AS in der Vergangenheit lange als passive degenerative Erkrankung des Klappengewebes angesehen wurde, wird sie heutzutage als aktive, chronisch inflammatorische Krankheit verstanden (6). Sie wird durch Endothelschädigung, lokale und systemische inflammatorische Prozesse, bindegewebiges Remodeling und ektopische Kalzifizierung charakterisiert, welche zur Stenosierung der Klappe führen (6).

Bei bikuspiden Aortenklappen wird angenommen, dass im Vergleich zur trikuspiden Aortenklappe verstärkte mechanische Scherkräfte vorliegen, welche eine schnellere Entstehung der AS begünstigen. Patienten mit bikuspider Klappe zeigen somit häufig bereits vor dem 55. Lebensjahr klinische Auffälligkeiten. Darüber hinaus konnten bei Patienten mit bikuspider Aortenklappenanlage genetische Varianten zum Beispiel eine Defizienz des Notch homolog 1 translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1) - Gens identifiziert werden, welche über die mechanische Mehrbelastung hinaus über molekulargenetische Pathomechanismen eine schnellere Degeneration und Kalzifizierung der bikuspiden Aortenklappe bewirken können (5) (7). Weitere, seltene Ursachen für das Auftreten einer AS sind unter anderem die Spätfolgen des rheumatischen Fiebers und ein Zustand nach Bestrahlung des Mediastinums. Da diese Formen der AS insgesamt eher selten sind, konzentriert sich die vorliegende Dissertation auf die häufigste Form der valvulären AS, die erworbene, kalzifizierende AS.

Als initialisierender Faktor der kalzifizierenden AS wird eine endotheliale Dysbalance der VECs angenommen, welche vordergründig durch mechanische Scherbelastung (engl.

shear stress) entsteht (8). Das beschädigte Endothel ermöglicht die Infiltration und Akkumulation von Low-density Lipoprotein (LDL), dem Lipoprotein (a) (Lp(a)) und den Apolipoproteinen apoB und apoE (9). Über oxidative Prozesse erfolgt die Umwandlung in oxidiertes LDL (ox-LDL). Hierbei spielt unter anderem eine erhöhte Aktivität der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), welche reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert, eine tragende Rolle.

Durch die Akkumulation von ox-LDL wird eine Hochregulation der Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen induziert. Histologische Studien fanden in chirurgisch explantiertem Aortenklappenmaterial bei Patienten mit hochgradiger AS eine erhöhte endotheliale Expression von Endothel-Selektinen und Integrinen, insbesondere dem Interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und dem Vaskulären Zelladhäsionsprotein-1 (VCAM-1) (10), welche an der Zelladhäsion im Rahmen einer Immunreaktion beteiligt sind und die Extravasation von Leukozyten mittels Diapedese ermöglichen. Analog zur atherosklerotischen Plaque erfolgt eine Infiltration des Klappengewebes durch aktivierte T-Zellen sowie Monozyten, welche in diesem Prozess zu Makrophagen reifen (8). Innerhalb des Aortenklappengewebes nehmen die Makrophagen, ähnlich wie bei der Atherosklerose, Lipide auf. Sie sezernieren wiederum das Interleukin 1-beta (IL-1 β), eines der zentralen proinflammatorischen Zytokine in der Pathophysiologie der Atherosklerose. Somit werden weitere inflammatorische Prozesse im Sinne eines, sich selbst verstärkenden Kreislaufes aufrechterhalten.

Diese inflammatorischen Prozesse führen im weiteren Verlauf zur Metaplasie der VICs. Ein Teil der valvulären Zellen unterläuft eine Metaplasie zu Myelofibroblasten, sodass es zur Sklerosierung und zu ektopen Kalzifizierungsprozessen der Aortenklappe kommt. Zudem erfolgt die Ausdifferenzierung eines Teils der VICs zu Osteoblasten, sodass es über ektopen Kalzifizierung hinaus zur ossären Metaplasie der Aortenklappe kommt. In einzelnen histopathologischen Studien wurde in 10-15% der chirurgisch explantierten kalzifizierten Aortenklappen ein ossärer Umbau des Klappenmaterials, teils mit Nachweis von Knochenmark und hämatopoietischen Elementen innerhalb der Aortenklappe nachgewiesen (6, 11).

Die aktiven inflammatorischen und kalzifizierenden Prozesse der AS können auch mittels radiologischer bildgebender Verfahren dargestellt werden. Mittels Positron-Emissions-Tomographie-Computertomographie (PET-CT) wurden die Aortenklappen von Patienten

mit einer AS in unterschiedlichem Schweregrad auf erhöhte Stoffwechselprozesse untersucht und mit gesunden Probanden verglichen. Radioaktiv markierte 18F-Fluorodesoxyglukose (18F-FDG) wurde als Marker für Inflammation und 18F-Natriumfluorid (18F-NaF) als Marker für aktive Kalzifizierungsprozesse verwendet. Es konnte eine erhöhte Aufnahme beider Marker im erkrankten Aortenklappengewebe nachgewiesen werden, wobei die Aufnahme von 18F-NaF mit zunehmender Krankheitsschwere anstieg, während die Aufnahme von 18F-FDG unabhängig vom Schweregrad der AS auf erhöhtem Niveau annähernd gleichblieb. (12) Dies verdeutlicht, dass in späteren Krankheitsstadien die Inflammation in den Hintergrund tritt und Kalzifizierungsprozesse des Klappengewebes im Vordergrund stehen (13, 14).

Über die, lokal im Klappengewebe stattfindenden Prozesse hinaus, lassen sich im Rahmen einer AS auch systemische Inflammations- und Kalzifikationszeichen nachweisen. Hier liefern Biomarkerstudien, welche Marker für die verschiedenen pathophysiologischen Prozesse der AS im peripheren Blut identifizierten, wichtige Hinweise auf den systemischen Charakter der Erkrankung. Im Blut nachgewiesene Biomarker beinhalten Entzündungsmediatoren wie das C-reaktive Protein (CRP), Interleukin 6 (IL-6) und den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) (15-20) sowie Ossifikationsmarker wie das Protein Osteopontin (19). Der Nachweis dieser Biomarker im peripheren Blut verdeutlicht, dass sich die pathophysiologischen Veränderungen nicht nur auf die Klappentaschen beschränken, sondern dass sich der gesamte Organismus in einem erhöhten inflammatorischen Status befindet.

Die kalzifizierende AS weist pathogenetisch große Ähnlichkeiten mit der Entstehung der Atherosklerose auf. Multiple histologische Analysen haben pathophysiologische Parallelen zwischen der atherosklerotischen Plaque und der kalzifizierenden Aortenklappe aufgezeigt (8, 21). In beiden Entitäten wurde eine endotheliale Dysfunktion mit Infiltration des Subendotheliums mit Lipiden und Lipoproteinen sowie oxidiertes LDL gefunden. Läsionen beider Erkrankungen beinhalten inflammatorische Veränderungen und die Infiltration von Entzündungszellen, insbesondere Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen, sowie einen erhöhten Gehalt einer Vielzahl von inflammatorischen Zytokinen (22, 23). Jedoch bestehen auch histologische Unterschiede zwischen den Erkrankungen. Während glatte Muskelzellen, welche die Kappe der atherosklerotischen Plaque bilden, in der Atherosklerose dominieren, sind die VICs und ihre fibroblastischen und osteoblastischen Metaplasien der

vorherrschende Zelltyp in der AS. Die für die AS typischen Kalzifizierungen und ossären Umbauprozesse treten bei der Atherosklerose in deutlich geringerem Ausmaß auf (22, 23).

Im klinischen Kontext zeigen sich die Ähnlichkeiten zwischen der Atherosklerose und der AS insbesondere in epidemiologischen Studien, die bei beiden Krankheiten starke Übereinstimmungen hinsichtlich der Patientenprofile nachweisen. Es besteht bei der AS wie auch bei der Atherosklerose eine signifikante Assoziation zu den konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren, insbesondere zu hohem Alter, männlichem Geschlecht, erhöhtem Low-density Lipoprotein-Spiegel (LDL), arterieller Hypertonie, Nikotinkonsum, Diabetes mellitus und dem metabolischen Syndrom (24, 25). Die Konstellation einer Komorbidität aus AS und koronarer Herzkrankheit (KHK) liegt bei Patienten über 71 Jahren in über 50% der Fälle vor. Dieser Umstand muss bei der Wahl der Therapieoption berücksichtigt werden, da bei entsprechender Komorbidität im Rahmen einer Klappensanierung auch gleichzeitig eine Koronarrevaskularisation durchgeführt werden kann (26).

2.1.4 Auswirkung der AS auf das Herz

Die inflammatorischen Vorgänge innerhalb der Aortenklappe führen zu morphologischen Veränderungen des Klappenapparats. Initial kommt es durch das fibrotische Remodeling zu einer Verdickung und Zunahme der Steifheit der Valvulae semilunares, einer sogenannten Aortenklappensklerose. Diese bleibt in der Regel ohne wesentliche hämodynamische Relevanz. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es durch die Kalzifikations- und Ossifikationsprozesse der sklerosierten Aortenklappe zu einer weiteren Verhärtung der Taschenklappen und somit zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Öffnungs- und Schließbewegung der betroffenen Klappen. Bei 10 – 15 Prozent der Patienten mit Aortenklappensklerose entwickelt sich eine hämodynamisch wirksame Klappenstenose (27). Die AS führt zu einem Anstieg der transvalvulären Flussgeschwindigkeit und des Druckgradientens. Diese veränderte Hämodynamik bewirkt langfristig eine myokardiale Adaptation des linken Herzventrikels. Es resultiert primär eine konzentrische Linksherzhypertrophie, die den Aufbau eines erhöhten linksventrikulären Drucks zur Überwindung der erhöhten Nachlast ermöglicht, wodurch die systolische Pumpleistung trotz der Klappenstenose zunächst aufrechterhalten wird (8). In dieser Latenzphase verspürt der Patient häufig noch keine

wesentliche Beschwerdesymptomatik. Mit fortschreitender Krankheitsdauer führen die Druckbelastung und die konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels jedoch zu einer diastolischen myokardialen Dysfunktion mit gestörter Myokardrelaxation und einer verminderten Koronarreserve. Bei unbehandelter Krankheit kann die systolische Funktion des linken Ventrikels im Verlauf ebenfalls abnehmen und es kommt zum klinischen Vollbild einer Linksherzinsuffizienz. (28)

2.1.5 Klinik

Die Symptome der AS treten in der Regel erst bei einer hochgradigen Stenosierung der Aortenklappe auf, sodass die Erkrankung in den früheren Krankheitsphasen oft unentdeckt bleibt oder nur als Zufallsbefund diagnostiziert wird. Die Dauer dieser Latenzzeit kann interindividuell stark variieren, sodass eine frühzeitige Diagnosestellung sowie Aussagen zum individuellen Verlauf und zur Prognose der Erkrankung in dieser Frühphase nur schwer möglich sind. Bleibt die Erkrankung unerkannt oder unbehandelt, entwickelt sich im Verlauf eine typische, jedoch unspezifische Trias aus (Belastungs-) Dyspnoe, pektanginösen Beschwerden und zerebraler Symptomatik von Schwindel bis hin zur Synkope (9). Bei einer hämodynamisch relevanten AS kann eine Synkope unter Belastungssituation das klinische Erstsymptom sein (9). Oft sind darüber hinaus aufgrund der o.g. kardialen Umbauprozesse und der progredienten Einschränkung der linksventrikulären Funktion weitere Zeichen der Herzinsuffizienz wie Nykturie, Orthopnoe, eine pulmonalvenöse Stauung bis hin zum Lungenödem sowie auch periphere Ödeme vorhanden, die sich in Abhängigkeit des Schweregrads der AS in unterschiedlicher Ausprägung manifestieren. Mit Auftreten von klinischen Symptomen steigt die Mortalität von Patienten mit hochgradiger AS deutlich an (28, 29). Die Gesamt-Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit einer maximalen Flussgeschwindigkeit von mehr als 4m/s über die Aortenklappe beträgt unbehandelt nur 30-50% (30).

2.1.6 Diagnostik

In der internistischen körperlichen Untersuchung fällt unter anderem ein typischer Auskultationsbefund mit spindelförmigem Systolikum über dem rechtsseitigen 2. Interkostalraum mit Ausstrahlung in die Carotiden auf. Das Elektrokardiogramm (EKG) zeigt häufig unspezifische Zeichen einer Linksherzhypertrophie. Die transthorakale

Echokardiographie (TTE) ist der empfohlene Goldstandard zur Diagnostik der AS nach der European Society of Cardiology (ESC) (Klasse I, Evidenzlevel B) (30).

Unter adäquaten Untersuchungsbedingungen kann die TTE die morphologischen und funktionellen Verhältnisse der Aortenklappe zuverlässig darstellen (31). Zudem kann eine bikuspidale Klappenanlage echokardiographisch erkannt werden (32).

Mittels TTE können neben der Graduierung des Schweregrads der Klappenstenose auch die möglichen myokardialen Komplikationen der AS wie die linksventrikuläre Hypertrophie sowie die eingeschränkte Kontraktilität des linken Ventrikels und die Dilatation der Herzhöhlen evaluiert werden. Ergänzend zur TTE liefern die transösophageale Echokardiographie (TEE), Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) weitere Informationen zur Morphologie des Aortenklappenannulus, der Aortenwurzel und der Aorta ascendens. Mittels nativem Kardio-CT kann zudem eine radiologische Quantifizierung der Kalklast im Bereich der Taschenklappe und des Aortenklappenannulus mittels des sogenannten Agatston-Scores erfolgen. Initial für die Quantifizierung der Kalzifizierung von Koronararterien entwickelt, hat dieser Calcium-Score mittlerweile auch Eingang in die Leitlinien für die AS gefunden und kann bei insbesondere bei Patienten mit echokardiographisch uneindeutigen hämodynamischen Befunden Hinweise auf eine hochgradige AS geben. (30)

Die Herzkatheteruntersuchung ist ein invasives Verfahren, die Informationen über die Druckgradienten über die Aortenklappe und über den Koronarstatus liefert, sodass die präoperative Linksherzkatheteruntersuchung eine wichtige Rolle für die Therapieplanung spielt.

2.1.7 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung der AS erfolgt anhand funktioneller und morphologischer Parameter. Dies beinhaltet die Berechnung oder Messung der Klappenöffnungsfläche (AVA oder KÖF) sowie die Bestimmung der maximalen transvalvulären Geschwindigkeit (V_{max}) und den mittleren transaortalen Druckgradient (ΔP_{mean}) (31). Es werden drei Schweregrade unterschieden: gering-, mittel- und hochgradig. Zudem werden weitere Unterformen differenziert: die sogenannten „low flow low gradient“ AS und die „paradoxical low flow low gradient“ AS. Bei diesen Sonderformen der AS liegen trotz Vorliegen einer hochgradig reduzierten Klappenöffnungsfläche keine entsprechend hochgradig veränderten funktionellen Messparameter vor. Aufgrund einer starken

Verminderung des Schlagvolumens, welche durch eine verminderte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LV-EF), durch ein verkleinertes ventrikuläres Cavum (zum Beispiel bei starker konzentrischer Hypertrophie), oder durch eine verringerte (restriktive) linksventrikuläre Füllung bedingt ist, kann in der Systole keine hochgradige Flussbeschleunigung beziehungsweise kein erhöhter Druckgradient über die Aortenklappe aufgebaut werden.

Tabelle 1: Einteilung der AS nach morphologischen und hämodynamischen Kriterien

Schweregrad	Morphologie	KÖF (cm ²)	Indexierte KÖF (cm ² /m ²)	Vmax (m/s)	Pmean (mmHg)
Leichtgradig	Geringe Verdickung der Taschenklappen mit leicht reduzierter Öffnungs- und Schlussbewegung	> 1,5		< 3,0	< 20
Mittelgradig	Beginnende Kalzifizierung	1,0-1.5		3,0 - 4,0	20 - 40
Hochgradig	Starke Kalzifizierung, kaum noch Bewegung	< 1,0	< 0,6	> 4,0	> 40

Modifiziert nach (31)

2.1.8 Therapie

Aktuell existiert keine kurative medikamentöse Therapiemöglichkeit um den Progress einer AS zu beeinflussen. Dies stellt einen großen Unterschied zur Atherosklerose dar, in der eine konsequente Therapie der Lipidstoffwechselstörungen positive Effekte auf den Krankheitsverlauf bewirkt. Zwar wiesen retrospektive und Fall-Kontrollstudien mit kleinen Fallzahlen auf eine mögliche Verzögerung der Progression der Sklerosierung der Aortenklappentaschen unter einer hochdosierten Statintherapie hin, allerdings konnte in zwei großen randomisierten Studien („Aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin“, ASTRONOMER und „Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis trial“, SEAS) kein positiver Einfluss einer Statintherapie auf den Progress der AS festgestellt werden (33-35). Diskutiert wurden außerdem die Einnahme von ACE-Hemmern, AT1-Antagonisten sowie Antiosteoporotika zur Verlangsamung der

Erkrankung, jedoch konnte auch hier kein positiver Effekt bei Patienten mit AS gemessen werden (36). Insgesamt existiert aktuell keine evidenzbasierte medikamentöse Therapie, welche nachweislich zur Verlangsamung der Progression oder sogar zur Reduktion der pathophysiologisch wesentlichen Mikroinflammation und Kalzifizierung bei der AS beiträgt. Darüber hinaus existieren keine nicht-invasiven Maßnahmen zur Reversion eines funktionell oder morphologisch bereits beeinträchtigten Aortenklappenapparats. Somit kommen aktuell, abgesehen von einem konservativen Therapieansatz, welcher insbesondere im palliativen Setting bevorzugt wird, mechanische Therapiemethoden in der Behandlung der hochgradigen AS zum Einsatz.

Dieses sind im Wesentlichen der konventionell-chirurgische Aortenklappenersatz (AKE) und die interventionell-katheterbasierte Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI). Beim AKE wird über den Zugangsweg der Sternotomie und mit Hilfe einer Herz-Lungenmaschine ein extrakorporaler Kreislauf hergestellt. Unter iatrogen herbeigeführtem Herzstillstand (sog. Kardioplegie) wird dann die erkrankte Aortenklappe entfernt und eine künstliche Aortenklappenprothese orthotop implantiert. Hierzu kommen, je nach Patientenprofil, biologische oder mechanische Aortenklappenprothesen zum Einsatz (30). Wurde im Rahmen der präoperativen Therapieplanung der AS eine interventionsbedürftige koronare Herzkrankheit diagnostiziert, kann zudem im selben Eingriff eine Bypassoperation der Koronararterien zeitgleich mit dem AKE erfolgen.

Die TAVI hingegen stellt ein minimalinvasives Verfahren dar, welches in den späten 1980ern durch Alain Cribier, einem französischen interventionellen Kardiologen, entwickelt wurde. 2002 erfolgte die erste Klappenimplantation mittels TAVI an einem Menschen (37, 38). Bei der TAVI wird über einen transarteriellen Zugang (transfemorale/-axilläre/-aortale) oder über einen transapikalen Zugang zuerst mittels Ballondilatation eine Dehnung der stenosierten Aortenklappe durchgeführt (sog. Ballonvalvuloplastie) und dann in einem zweiten Schritt ein Metallstentgerüst mit eingnähter biologischer Aortenklappenprothese eingebracht. Während der Ballondilatation erfolgt eine ventrikuläre Hochfrequenzstimulation (sog. rapid pacing), bei der das Herz für kurze Zeit mittels einer eingebrachten Herzschrittmacherelektrode „stillgelegt“ wird, um die Genauigkeit der Prothesenplatzierung zu gewährleisten. Aktuell werden verschiedene Prothesenmodelle verwendet, welche entweder eigenständig expandieren oder mittels Ballonkatheter platziert und aufgedehnt werden. Die native Klappe wird bei der TAVI gesprengt, an die Aortenwand gedrängt und mit der Prothese „überstentet“. Das

erkrankte Klappengewebe wird somit, im Gegensatz zum AKE, nicht entfernt, sondern verbleibt im Körper des Patienten. Bei der TAVI schlägt das Herz intraprozedural weiter, eine Kardioplegie inklusive Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine ist somit nicht notwendig. (37, 38)

Mittlerweile ist die TAVI als Alternative zum AKE im klinischen Alltag etabliert. Sie wird bei Patienten mit erhöhtem Operationsrisiko beispielsweise durch hohes Alter oder Multimorbidität (berechnet mittels STS-PROM Score oder EuroScore II) angewandt. Die federführenden Studien, welche die beiden Verfahren vergleichen sind die PARTNER (Placement of Aortic Transcatheter Valves) und die SURTAVI (Surgical or Transcatheter Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients) -Studien. Die PARTNER-1-Studie zeigte 2010 nicht nur eine Überlegenheit der TAVI im Vergleich zur konservativen Therapie bei inoperablen Patienten mit hochgradiger symptomatischer AS, sondern auch eine Nicht-Unterlegenheit im Vergleich zur AKE bei Patienten mit hochgradiger AS und einem hohen Operationsrisiko (39). Darauf folgende Studien zeigten eine Nichtunterlegenheit der TAVI bei Patienten mit mittlerem Operationsrisiko (nach STS-PROM-Score) und diskutierten eine weitere Ausweitung der Indikationsstellung für die TAVI (PARTNER II- und SURTAVI-Studien) (40, 41). So trat in der SURTAVI Studie, an der 1660 Patienten mit intermediärem Operationsrisiko teilnahmen, nach 24 Monaten in 12,6% (TAVI) beziehungsweise 14,0% (AKE), ein Primärendpunkt (Versterben jeder Ursache und nicht-letaler Schlaganfall) ein. Die 2016 veröffentlichte PARTNER II Studie mit 994 Patienten zeigte mit 19,3% (TAVI) versus 21,1% (AKE) für den Endpunkt Tod oder schwerere Schlaganfall vergleichbare Ergebnisse. Die Nachfolgestudie PARTNER III, die sich zum aktuellen Zeitpunkt (Juni 2020) in der Nachbeobachtungsphase befindet, untersuchte 1000 Patienten mit niedrigem Operationsrisiko (STS-Score < 4), welche randomisiert entweder einer TAVI oder einem chirurgischen AKE zugeführt wurden. Vorläufig veröffentlichte Ergebnisse zeigten mit Hinblick auf die primären Endpunkte Tod, Schlaganfall oder kardiovaskulär bedingte Rehospitalisierung nach 2-jährigem Beobachtungszeitraum eine Inzidenz des primären Endpunktes von 11,5% (TAVI) versus 17,4% (AKE). Weitere Nachuntersuchungen über einen Zeitraum von insgesamt 10 Jahren sind geplant. (42)

Der AKE, dessen Hauptindikation die AS ist, wurde 2017 in Deutschland 9011 Mal durchgeführt. Der AKE ist somit nach der Bypass-Operation der zweit häufigste kardiochirurgische Eingriff in Deutschland. Zugleich nimmt die Anzahl der

kathetergestützten transarteriellen Aortenklappenimplantationen stetig zu, bei ungefähr gleichbleibenden AKE-Zahlen. 2017 wurden 19752 TAVIs in Deutschland durchgeführt. (43)

2.2 Humane Monozytensubpopulationen

Humane Monozyten werden im Knochenmark gebildet. Hämatopoetische Stammzellen differenzieren sich unter Stimulation der Wachstumsfaktoren GM-CSF (Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) und M-CSF (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) zu Monoblasten weiter (44). Auf weitere Stimuli erfolgt die Ausdifferenzierung der Monoblasten zu Monozyten welche das Knochenmark verlassen und ins Blut ausgeschwemmt werden (44). Hier zirkulieren Monozyten durchschnittlich 1-4 Tage. Auf entzündliche Stimuli erfolgt die Rekrutierung der Monozyten ins Zielgewebe, wo sie in Makrophagen oder dendritische Zellen ausdifferenzieren (44).

Die Entdeckung der Monozyten wird Paul Ehrlich zugeschrieben, der mit Hilfe von selbst erfundenen Färbemethoden als erstes die verschiedenen Leukozyten im Lichtmikroskop voneinander unterschied (45). Ursprünglich wurden Monozyten als homogene Zellpopulation beschrieben (46). Durch Zwei-Farben-Fluoreszenz-Versuche wurde 1989 erstmals von der Forschungsgruppe um Prof. Dr. Ziegler-Heitbrock eine Monozytensubpopulation beschrieben, die neben dem etablierten Monozytenantigen CD14 (CD, Cluster of Differentiation), den Fc gamma Region III - Rezeptor (FcγIII-Rezeptor) CD16 koexprimiert (47). Diese Subpopulation wurde neben der dominanten „klassischen“ Subpopulation (classical monocytes) als „nicht-klassische“ Subpopulation (non-classical monocytes) bezeichnet. Weitere Arbeitsgruppen unterstützten diese Entdeckung, indem sie zeigten, dass die Subpopulationen sich hinsichtlich des Genoms, des Phänotyps und der Funktion unterscheiden (48, 49).

Durch ihre geringe Anzahl und ihrer transitionellen Eigenschaften wurde eine weitere Monozytensubpopulation innerhalb der CD16-positiven Monozyten zunächst nicht erkannt und den nicht-klassischen Monozyten zugeordnet. Erst nach der Jahrtausendwende zeigten klinische Studien erste Hinweise auf die Existenz dieser dritten Subpopulation, die sich im durchflusszytometrisch erstellten CD14/CD16 – Zytogramm „zwischen“ den klassischen und nicht-klassischen Subpopulationen befindet:

Die „intermediären Monozyten“ (intermediate monocytes), die verglichen zur nicht-klassischen Subpopulation mehr CD14 und weniger CD16 exprimieren.

Im Jahr 2010 wurde vom Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Societies die aktuelle Nomenklatur der humanen Monozyten veröffentlicht, welche auch von der WHO anerkannt wurde. Anhand der Expression des Lipopolysaccharid- (LPS-) Rezeptors CD14 und des Fc μ III-Rezeptors CD16 werden demnach aktuell drei Monozytensubpopulationen unterschieden: Klassische (CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$), intermediäre (CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$) und nicht-klassische (CD14 $^{+}$ CD16 $^{++}$) Monozyten. (46)

Mit ca. 85% - 90% der Gesamtmonozyten stellen die klassischen (classical) CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$ Monozyten die quantitativ größte Subpopulation dar. Sie exprimieren hohe Konzentrationen der Chemokinrezeptoren 2 (CCR2) und CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren (CXCR) 1, 2 und 4 sowie CD62L, jedoch wenig C-X3-C-Motiv-Chemokinrezeptor 1 (CX3CR1), auch Fraktalkinrezeptor genannt. Klassische Monozyten besitzen unter den drei Monozytensubpopulationen die höchste Phagozytosefähigkeit, welches sich in der hohen Expression von Phagozytose-begünstigenden Oberflächenmarkern (unter anderem CD32, CD64, CD93 und SIRP α) widerspiegelt. Darüber hinaus zeigen klassische Monozyten einen hohen Peroxidasespiegel, welcher für die Prozessierung des phagozytierten Materials und von Pathogenen essentiell ist. Nach LPS-Stimulation wird in klassischen Monozyten die Produktion von Zytokinen wie beispielsweise Interleukin-1 β , -6, -8 -10, TNF-alpha und CCL2 induziert. (50, 51)

CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$, intermediäre (intermediate), Monozyten weisen Marker sowohl von klassischen Monozyten, als auch von nicht-klassischen Monozyten auf, sodass ihnen transitionelle Eigenschaften zugeschrieben werden: Es werden auf der Zelloberfläche gleichzeitig CCR2, CXCR2 sowie auch CX3CR1 exprimiert. Trotzdem besitzen intermediäre Monozyten eigenständige phänotypische und funktionelle Eigenschaften, insbesondere die höhere Produktion von IL-1 β und TNF-alpha im Vergleich zu den klassischen und nicht-klassischen Monozyten (44). Darüber hinaus sind intermediäre Monozyten in der Lage, große Mengen an proinflammatorischer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu produzieren (50, 52). Zudem wurde auf der intermediären Monozytensubpopulation die höchste Dichte von Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II (MHC-II) Molekülen auf der Zelloberfläche nachgewiesen, welches die

Verbindung zur humoralen Immunantwort im Sinne einer CD4-T-Zellaktivierung darstellt. Außerdem weisen intermediäre Monozyten eine hohe Oberflächenexpression des C-C-Motiv Chemokinrezeptors 5 (CCR5) auf. Dieses findet sich bei klassischen und nicht-klassischen Monozyten nicht. Mittels genomweiter Mikro-RNA-Sequenzierung konnten bei intermediären Monozyten zudem eine Vielzahl von miRNAs identifiziert werden, welche diese mit Toll-like Rezeptoren (TLR) assoziieren (53). Toll-Like-Rezeptoren sind zellmembranständige Rezeptoren aus dem Kreis der angeborenen Immunantwort, welche unter anderem bei der Homöostase und der Immunreaktion im Rahmen von Gewebeschädigung eine tragende Rolle spielen, somit besteht eine Assoziation zwischen intermediären Monozyten und einer Immunantwort auf Gewebebeziehungweise Endothelschädigung. Zusammenfassend wird angenommen, dass intermediäre Monozyten im Vergleich zu den klassischen und nicht-klassischen Monozyten das höchste inflammatorische Potential besitzen (50, 54).

CD14+CD16++ nicht-klassische (non-classical) Monozyten stellen die reifste Stufe der Monozyten dar. Sie exprimieren im Gegensatz zu klassischen Monozyten eine hohe Dichte von CX3CR1, jedoch wenig CCR2 oder CD62L. In Nicht-klassischen Monozyten wurde eine hohe Expression von Genen gefunden, welche mit der Diapedese vergesellschaftet sind. Dazu zählen die Ras homologue (Rho-) GTPasen C und F, welche den Umbau des Zytoskeletts koordinieren (50). Auch die Aktivatoren dieser, für die aktiven Zellbewegungen essenziellen Enzyme, VAV2 und ARHGEF18 werden bei der nicht-klassischen Monozytensubpopulation stark exprimiert (50). Die korrelierende phänotypische Eigenschaft der nicht-klassischen Monozyten ist eine hohe Motilität und die Fähigkeit, entlang des Endothels zu „patrouillieren“ (51).

Nach der heutigen Vorstellung stellen die Monozytensubpopulationen keine ausdifferenzierten Endpunkte verschiedener myeloischer Zelllinien dar. Es wird vermutet, dass alle Monozytensubpopulationen ursprünglich die gleiche Abstammung haben und während des Durchlaufens eines Reifungsprozesses 3 verschiedene, chronologisch aufeinander folgende Stadien repräsentieren. So wird angenommen, dass klassische Monozyten im Knochenmark produziert werden und sich dann im Verlauf im Blut über den Status der intermediären Monozyten in nicht-klassische Monozyten ausdifferenzieren. (46, 50) Entsprechend wurde die niedrigste Expression von zellreifungsassoziierten Genen bei klassischen Monozyten und die höchste Expression bei nicht-klassischen Monozyten nachgewiesen (46, 50). Ein weiteres Indiz für dieses

„Verwandschafts- und Reifungsverhältnis“ ist eine geringe Telomerlänge bei nicht-klassische Monozyten im Vergleich zu den anderen Monozytensubpopulationen (55). Eine kurze Telomerlänge wird als Zeichen eines hohen Zellalters angesehen (53).

Eine Studie an gesunden Individuen, entsprechend eines inflammationsfreien „steady-states“, zeigte, dass nach Injektion von Deuterium-markierter Glucose im zeitlichen Verlauf zuerst markierte klassische Monozyten im peripheren Blut messbar waren. Mit dem anschließenden Rückgang der klassischen Monozyten wurde parallel zuerst ein Anstieg der intermediären Monozyten und zuletzt auch der nicht-klassischen Monozyten im Blut gemessen (56). Im experimentellen humanen Endotoxin-Modell, welches eine Entzündungsreaktion im Sinne eines Systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) am menschlichen Probanden simuliert, wurde nach intravenöser Endotoxininjektion zuerst eine absolute Monozytopenie induziert und danach die Neubildung der Monozytensubpopulationen im peripheren Blut gemessen. Nach kurzer Zeit konnte ein ansteigender Gehalt der klassischen CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten im peripheren Blut gemessen werden, zeitlich gefolgt von einer Transition zu Gunsten der intermediären und nicht-klassischen Monozyten. (56) Letztlich wurde im Mausmodell gezeigt, dass transplantierte humane klassische Monozyten innerhalb von 24 Stunden eine Transition in den intermediären Phänotyp vollziehen und nach weiteren 72 Stunden eine komplette Transition in den nicht-klassischen Phänotypen erfolgt (56). Die Autoren der Studie werten dies als Beweis, dass die drei Monozytensubpopulationen zueinander in einem ontogenetischen „Verwandschaftsverhältnis“ stehen und dass im peripheren Blut eine schrittweise Ausdifferenzierung vom einem Teil der klassischen Monozyten zu intermediären Monozyten und vom intermediären Monozyten zum nicht-klassischen Monozyten erfolgt (56).

Zusätzlich zur Differenzierung der drei Monozytensubpopulationen wurde in dieser Dissertation die Monozytenaktivierung mit Hilfe des Zelloberflächenproteins Integrin alpha-M (Itgam), auch bekannt als CD11b bestimmt. CD11b bildet als α -Untereinheit zusammen mit dem Integrin-beta-2, auch als CD18 bezeichnet, das Transmembranglykoprotein Mac-1, das auch alpha-M beta-2 (α M β 2) genannt wird (57). Dieses Integrin wird insbesondere auf den Zelloberflächen von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten gefunden und ist in der Lage, an die Interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM)- 1 und 2 sowie an das Vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) zu binden (58). Mac-1 vermittelt unter anderem die Leukozytenadhäsion auf Endothelzellen sowie

die Leukozytenmigration ins subendotheliale Gewebe. Hierbei erfüllt CD11b die Funktion der Adhäsion und des intravasalen Kriechens der Leukozyten entlang des Endothels, während die endotheliale Transmigration durch CD18 vermittelt wird (58). CD11b wird weithin als Aktivierungsmarker für Immunzellen angesehen und als solcher in diversen experimentellen Studien verwendet (59-61).

2.3 Ziel der Studie

Monozyten nehmen in der Pathogenese der Atherosklerose eine Schlüsselposition ein (62) und eine Umverteilung der drei Monozytensubpopulationen (klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten) kann bei verschiedenen Atherosklerose-assoziierten Erkrankungen nachgewiesen werden. Die Pathogenese der AS weist grundlegende Ähnlichkeiten zur Atherosklerose auf. Es kann daher angenommen werden, dass die Verteilung der Monozytensubpopulationen sowie deren Aktivierungsstatus bei dem Krankheitsbild der AS ebenfalls verändert ist. Diese Annahme wurde jedoch bisher nicht durch Daten belegt. In der vorliegenden Dissertation wird daher die Verteilung der drei Monozytensubpopulationen bei Patienten mit einer hochgradigen Aortenklappenstenose untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Das vorliegende Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Die Studie wurde im Einklang mit der Erklärung von Helsinki und nach der Satzung der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis durchgeführt.

Einschlusskriterien waren die schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme durch die Probanden, das Mindestalter von 18 Jahren und das Vorliegen einer hochgradigen AS nach der oben genannten Definition beziehungsweise das Nicht-Vorliegen einer AS in der Kontrollgruppe.

Zur Rekrutierung homogener Patientengruppen wurden stringente Ausschlusskriterien definiert. Patienten mit einer bekannten bikuspid angelegten Aortenklappe wurden ausgeschlossen, da sich die pathophysiologischen Prozesse der AS in bikuspiden und trikuspiden Aortenklappenanlagen unterscheiden (63). Weitere Ausschlusskriterien umfassten Begleiterkrankungen, welche zu einer Umverteilung der Monozytensubpopulationen führen. Hierzu gehören insbesondere inflammatorische Erkrankungen. Daher wurden Patienten mit Fieber oder laborchemischer Entzündungskonstellation mit Leukozytose, Leukopenie (Referenzbereich: 4 - 11,0/nL) oder erhöhtem CRP-Wert über 15mg/dL (Referenzbereich: \leq 5mg/dL) ausgeschlossen. Das Vorliegen von rheumatischen und nicht-rheumatischen autoimmunen Erkrankungen, welche ebenfalls mit Inflammation assoziiert sind, stellte ebenfalls ein Ausschlusskriterium dar. Patienten unter aktueller antibiotischer oder immunsuppressiver Therapie inkl. systemischer Glukokortikoidtherapie wurden ausgeschlossen, da dies eine relevante Manipulation des Immunsystems darstellt. Zudem wurden Patienten mit laborchemischem Nachweis einer hochgradigen akuten oder chronischen Niereninsuffizienz mit $GFR < 30\text{ml/min/1,73m}^2$ KOF (entsprechend CKD Stadium 4 oder höher) ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren ein stattgehabter Herzinfarkt und ein Schlaganfall in den letzten 30 Tagen. Auch Patienten mit malignen Erkrankungen oder eine stattgehabte Knochenfraktur in den letzten drei Monaten wurden von der Teilnahme an dieser Studie ausgeschlossen.

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Mindestalter 18 Schriftliche Einwilligungserklärung Hochgradige AS nach echokardiographischen Kriterien	Angeborene bikuspidale Aortenklappe Klinische Entzündungszeichen CRP > 15mg/L Leukozytose > 11/nL, Leukopenie < 4/nL Antibiotische Therapie Immunsuppressive Therapie Rheumatische- und nicht-rheumatische Autoimmunerkrankung GFR < 30ml/min/ 1.73 m ² KOF Akutes Koronarsyndrom in den letzten 30 Tagen Schlaganfall in den letzten 30 Tagen Maligne Tumorerkrankung Knochenfraktur oder Operation in den letzten 3 Monaten

3.2 Patientenrekrutierung

Zwischen September 2013 und Februar 2016 wurden Patienten der kardiologischen und kardiochirurgischen Abteilungen der Charité-Universitätsmedizin Berlin (Campus Mitte), die zur chirurgischen und interventionellen Therapie eines nicht näher quantifizierten Aortenklappenvitiums stationär aufgenommen wurden, für die Teilnahme an dieser Studie gescreent. Insgesamt hatten 711 Patienten eine hochgradige AS. Hiervon erfüllten 436 Patienten die Ein- und Ausschlusskriterien nicht, zudem lehnten 175 Patienten die Teilnahme an der Studie ab, sodass 100 Patienten in die vorliegende Dissertationsstudie eingeschlossen werden konnten. Als Gründe für eine Ablehnung der Studienteilnahme wurden besonders häufig persönliche Bedenken und die Sorge vor dem bevorstehenden Eingriff sowie die bereits bestehende Teilnahme an einer weiteren Studie angegeben.

Parallel konnten 75 Kontrollpatienten von der kardiologischen Normalstation in die Studie eingeschlossen werden. Sie wurden unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien und unter Anpassung nach Alter und Geschlecht an die AS Gruppe ausgesucht. Die Einweisungsgründe beziehungsweise Hauptdiagnosen der Patienten in

der Kontrollgruppe waren variabel: Stabile koronare Herzkrankheit (KHK, n=26), Ausschluss einer KHK (n=12), Vorhofflimmern (VHF, n=18), chronische Herzinsuffizienz (n=13), elektive Implantation eines Herzschrittmachers oder eines anderen kardialen Devices (n=4), obstruktives Schlafapnoe-Syndrom (n=1) und moderate Trikuspidalinsuffizienz (n=1).

Es erfolgte eine ausführliche Anamneseerhebung mit Erfassung der aktuellen Beschwerden, der kardiovaskulären Risikofaktoren und Vorgeschichte, der bekannten Systemerkrankungen und Nebendiagnosen und der häuslichen Dauermedikation. Eine internistische körperliche Untersuchung wurde durchgeführt. Die (Belastungs-)Dyspnoe-Symptomatik wurde anhand der New York Heart Association (NYHA)-Kriterien quantifiziert. Die echokardiographischen Untersuchungen wurden von erfahrenen ärztlichen Untersuchern nach den Empfehlungen der American Society of Echocardiography (ASE) und European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) durchgeführt (64).

Das Vorliegen einer hochgradigen AS wurde in Übereinstimmung mit der Empfehlung der European Society of Cardiology (ESC) definiert, wenn eine Aortenklappenöffnungsfläche (AVA) $< 1,0 \text{ cm}^2$ oder indexiert auf die Körperoberfläche $< 0,6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ vorlag, der mittlere transaortale Druckgradient $> 40 \text{ mmHg}$ oder die transaortale Spitzenflussgeschwindigkeit $> 4,0 \text{ m/s}$ betrug (65). Daten zur Aortenklappenöffnungsfläche lagen bei fünf AS-Patienten nicht vor; bei diesen Patienten stimmte jedoch mindestens einer der anderen oben genannten Parameter mit der Definition einer hochgradigen AS überein.

3.3 Blutentnahme

Nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung sowie schriftlicher Einwilligungserklärung erfolgte die Blutentnahme aus einer peripheren Armvene. Die untersuchten Laborparameter umfassten neben etablierten klinischen Parametern wie Differenzialblutbild, CRP, Kreatinin, Lipidstatus inklusive Triacylglyceride, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, unter anderem N-terminal pro-B-Typ-natriuretisches Peptid (NT-proBNP, Elecsys, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (beide IMMULITE, Siemens, Eschborn, Germany). Bis auf die Bestimmung der Monozytensubpopulationen und -aktivierung erfolgte die Messung der Laborparameter durch das mit der Charité

kooperierenden Labor Berlin mittels etablierter Nachweismethoden.

3.4 Laborchemische Analyse der Monozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie

3.4.1 Methodik der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Quantifizierung und Differenzierung von Zellen in einer Suspension. Dazu fließen Zellen in einem laminaren Fluss einzeln nacheinander durch eine Messkammer und passieren dabei einen oder mehrere Laser. Laser produzieren einen gebündelten Lichtstrahl mit einer vorher definierten Wellenlänge. Der eintreffende Laserstrahl wird von jeder einzelnen Zelle gestreut und anhand des Streulichts können verschiedene Eigenschaften einer jeden Zellen unterschieden werden (66, 67). Licht, das im Kleinwinkelbereich ($0-20^\circ$ Streuung zum Einfallswinkel des Laserstrahls) gestreut wird (Forward Scatter=FSC), lässt Aussagen zur Größe der Zelle zu (66, 67). Im orthogonalen Winkel, seitwärts gestreutes Licht (Side Scatter=SSC) liefert Informationen über die intrazelluläre Komplexität, insbesondere der Granularität des Zytoplasmas und der Größe des Nukleus der jeweiligen Zelle (66, 67). Anhand von FSC und SSC können morphologischen Eigenschaften von Leukozyten gut unterschieden werden. Beispielsweise produzieren die großen und vakuolenreichen Granulozyten mit heterogenem Nucleus wesentlich mehr frontales und seitliches Streulicht als die kleineren und vakuolenärmeren Lymphozyten. (66, 67) Anhand der FSC- und SSC-Eigenschaften kann bereits ein ungefähres Differenzialblutbild erstellt werden.

Die Markierung der Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern ermöglicht weitere Differenzierungen. Bei dieser Methodik wird eine Zellsuspension mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Epitope inkubiert. An diese Antikörper sind Fluoreszenzfarbstoffe, sogenannte Fluorochrome gekoppelt. Diese absorbieren Licht einer jeweils spezifischen Wellenlänge, wodurch Elektronen exzitieren und auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. (66, 67) Bei der Desaktivierung kehren die Elektronen auf ihr Grundniveau zurück; hierbei wird Energie in Form eines Photons in einer definierten Wellenlänge wieder abgegeben – es erfolgt eine Lichtemission. Jedes Fluorochrom weist eine spezifische Wellenlänge auf, bei der es am

Meisten Photonen absorbiert und am effizientesten exzitert wird. Diese Wellenlänge wird als Exzitationsmaximum bezeichnet.

Da der gesamte Prozess der Exzitation und Lichtemission in der Summe Energie verbraucht, ist das emittierte Licht von geringerer Energie und somit längerer Wellenlänge als das Exzitationslicht. Dieser Umstand wird Stokes-Verschiebung genannt. (66, 67)

Die Lichtemission wird von Photodetektoren aufgenommen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Durch die unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz können Aussagen über die Quantität der vorhandenen Oberflächenstrukturen einer jeden Zelle und der dadurch repräsentierten Eigenschaften getroffen werden. (66, 67)

Die Darstellung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten erfolgt graphisch in der Regel mittels Frequenzhistogramm oder Zytogramm.

Durch die Verwendung mehrerer Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen können verschiedene Farbstoffe mit unterschiedlichen Exzitationsmaxima angeregt werden, was eine gleichzeitige Differenzierung von mehreren Oberflächenmarkern erlaubt. (66, 67). Durch den zeitgleichen Einsatz mehrerer Fluorochrome kann es jedoch bei Überschneidungen der Emissionsspektren zu Additionseffekten kommen – auch „spillover“ (eng., Überlauf) genannt. Dadurch können Emissionssignale nicht mehr eindeutig einem einzigen Farbstoff zugeordnet werden und es kann zu Zählfehlern kommen. Beispielsweise emittiert der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein Isothiocyanat (FITC) nicht nur grünes, sondern auch gelbes Licht, welches im korrespondierenden Photodetektor gemessen und fälschlicherweise einem anderen gelben Farbstoff zugeschrieben werden kann. Dieses falsch positive Signal wird Interferenz genannt. Sollte ein solcher Additionseffekt vorliegen, muss eine sogenannte Kompensation durchgeführt werden. Mit Hilfe von diesem mathematischen Verfahren, werden die verfälschenden Additionseffekte wieder subtrahiert. Eine Kompensation geht allerdings immer mit einem Verlust der Messgenauigkeit einher, da es sich um eine errechnete Näherung handelt. (66, 67)

Das in dieser Studie verwendete Durchflusszytometer Cyan ADP Flow Cytometer von DAKO (Beckman Coulter) besitzt drei Laser mit den Wellenlängen 405 nm, 488 nm, 642 nm, sodass mehrere Fluoreszenzfarbstoffe mit verschiedenen Exzitationsmaxima

gleichzeitig angeregt werden können. Es enthält neun Detektionsmodule, sodass zusätzlich zu FSC und SSC noch sieben weitere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden können.

3.4.2 Verwendete Antikörper

Die in dieser Studie verwendeten Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 3 zusammengefasst und werden graphisch in Abbildung 1 dargestellt. Sie wurden aufgrund ihrer stark unterschiedlichen Emissionsspektren ausgewählt. Somit konnte eine Minimierung der Interferenz erreicht. Zur Erfassung der Interferenzen wurden Einzelprobenanalysen durchgeführt, in der die Proben jeweils nur mit einem einzelnen Farbstoff inkubiert wurden. Dann wurde die erfasste Fluoreszenzemission in allen Photodetektoren gemessen. Der Anteil der Zellen, welche im „falschen“ Emissionsbereich detektiert wurden stellt die Interferenz dar und müsste mittels Kompensation korrigiert werden.

Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Zielantigen	Farbstoff	Maximale Exzitation (nm)	Maximale Emission (nm)	Fluoreszenzfarbe
CD86	Phycoerythrin (PE)	405	455	Blau
CD14	Pacific Blue (PB)	488	575	Gelb
CD16	Allophycocyanin (APC)	650	660	Rot
CD11b	Phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7)	488	774	Infrarot

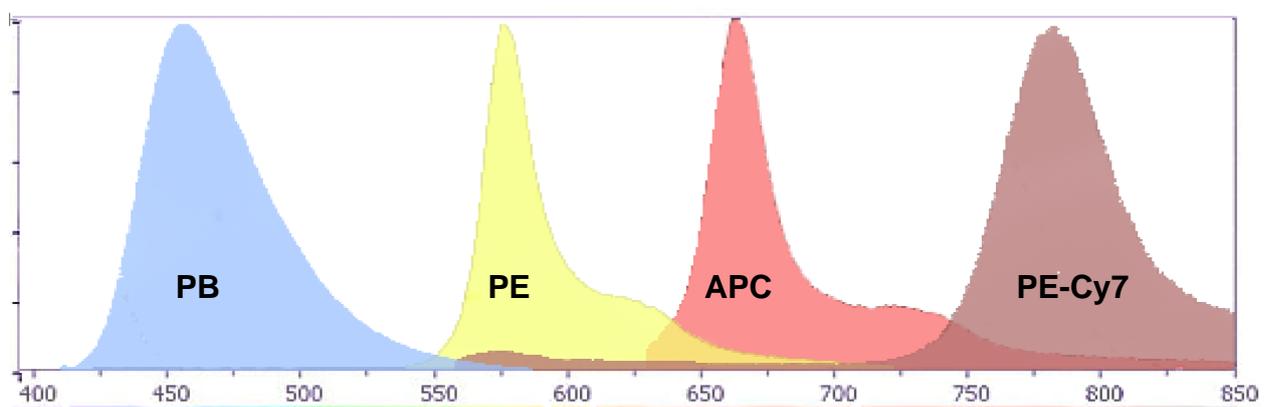


Abbildung 1: Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

X-Achse: Wellenlänge in nm

Modifiziert aus www.bdbiosciences.com

Die Vorversuche zeigten bei jedem der verwendeten Farbstoffe jeweils eine Interferenz von weniger als einem Prozent. Somit konnte in dieser Studie auf eine Kompensation verzichtet werden. Im Folgenden sind die Interferenzen zwischen den einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen graphisch dargestellt:

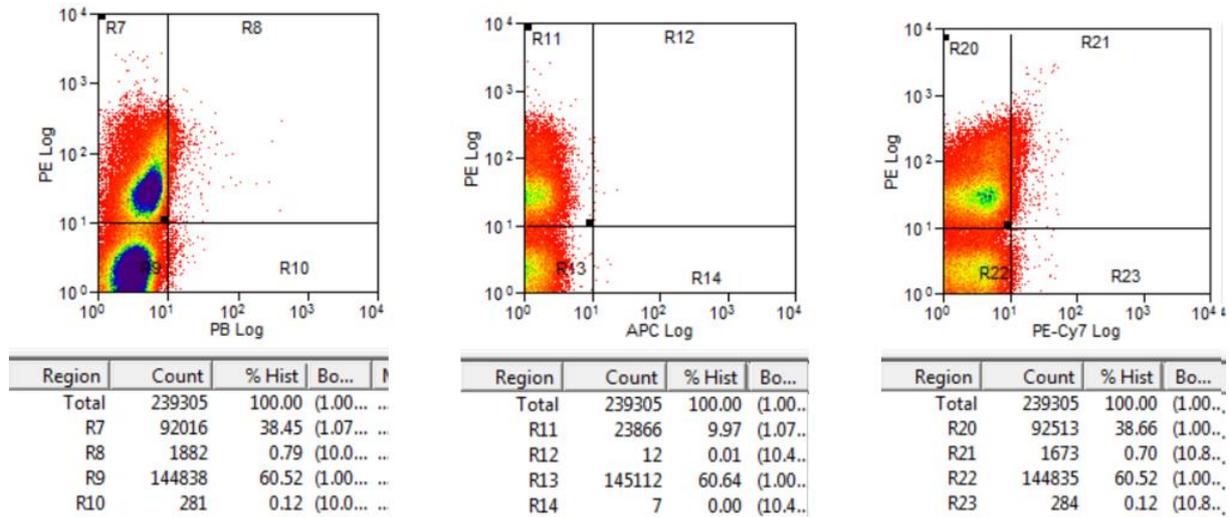


Abbildung 2 a: Interferenz, Einzelprobe CD86 Antikörper, Farbstoff PE

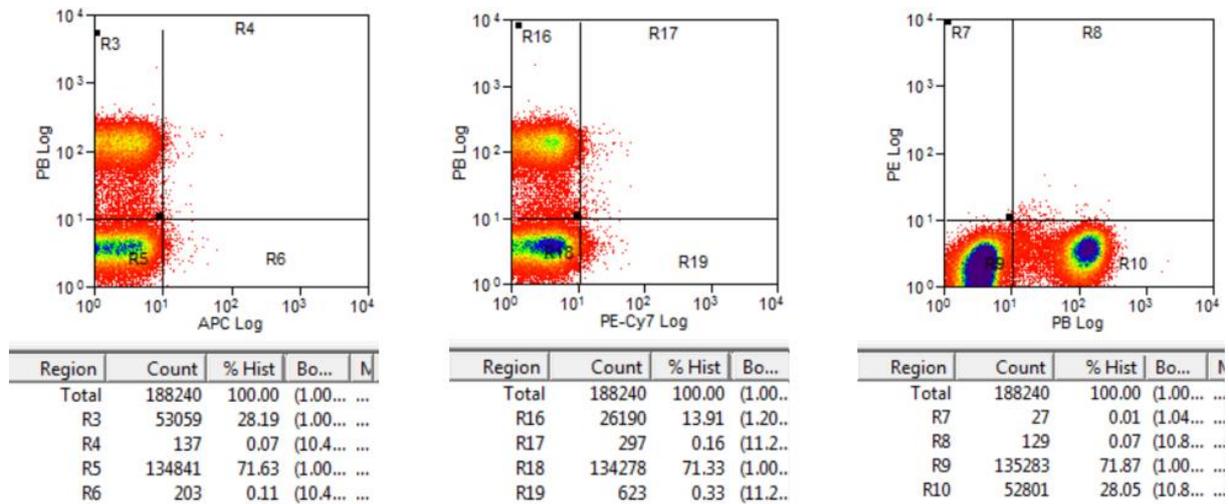


Abbildung 2 b: Interferenz, Einzelprobe CD14-Antikörper, Farbstoff PB

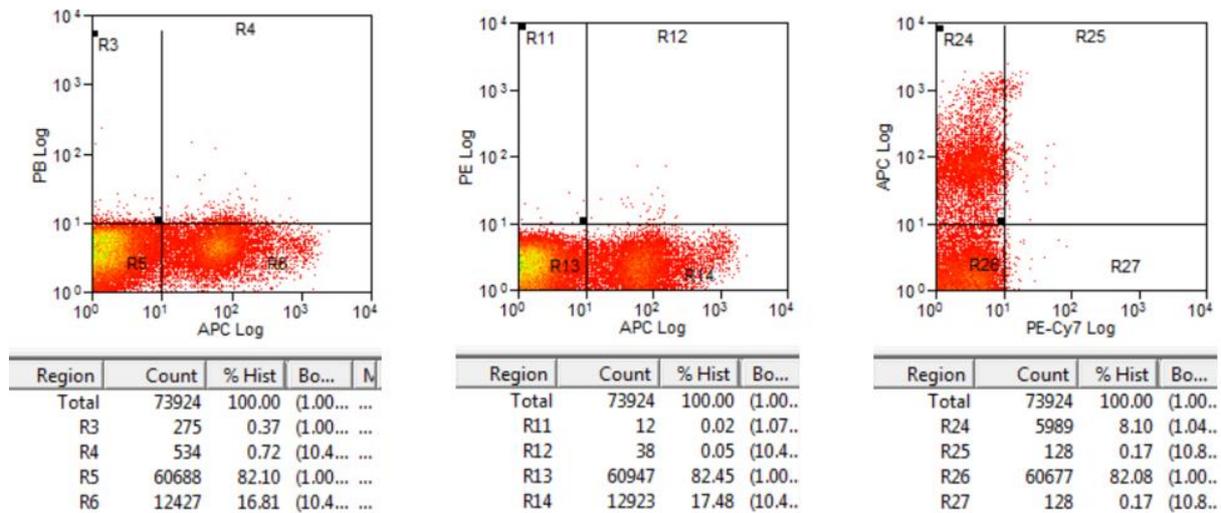


Abbildung 2 c: Interferenz, Einzelprobe CD16 Antikörper, Farbstoff APC

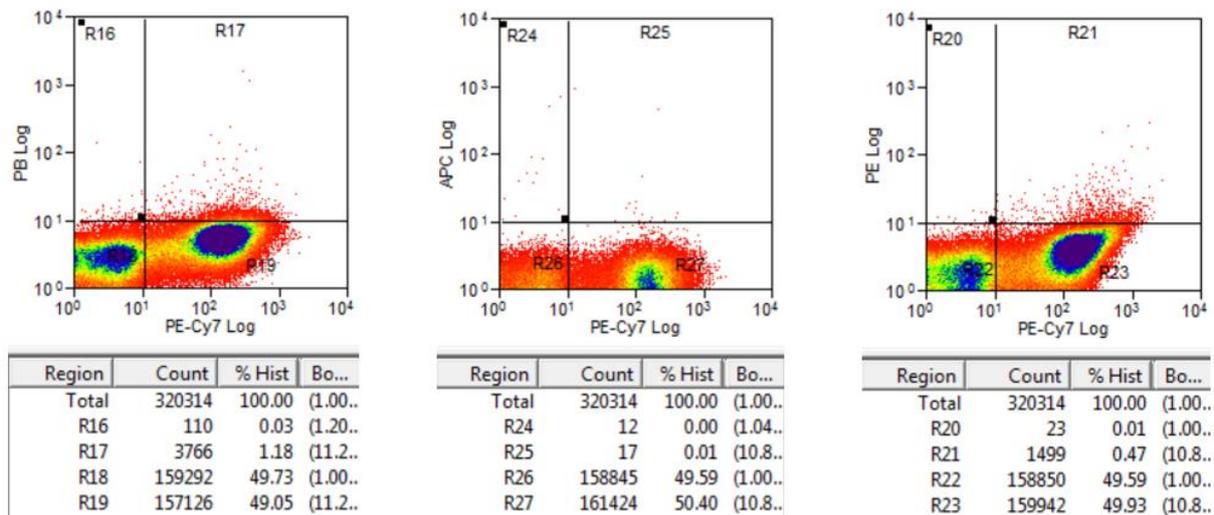


Abbildung 2 d: Interferenz, Einzelprobe CD11b Antikörper, Farbstoff PE-Cy7

3.4.3 Isotypkontrollen

In den Vorversuchen wurden außerdem für jeden benutzten Antikörper Isotypkontrollen durchgeführt. Isotypkontrollen testen die Spezifität der verwendeten Antikörper und dienen als Negativkontrolle. Die Isotypen-Antikörper sind vom selben Antikörpersubtyp und sind mit dem gleichen Fluorochrom gekoppelt. Sie unterscheiden sich jedoch vom tatsächlichen Antikörper, indem sie gegen ein Antigen gerichtet, welches in den zu untersuchenden Zellen nicht vorkommt. Eine Isotypkontrolle wäre somit perfekt, wenn sie überhaupt keine angefärbten Zellen zeigt. Mit Hilfe von Isotypkontrollen können ungewünschte unspezifische Anfärbungen, sogenannte Hintergrundsignale, detektiert

werden. Diese entstehen nicht durch spezifische Antikörper-Antigen-Bindungen mit dem Zielepitop der Zellen, sondern durch unspezifische Bindungen jeder anderen Art. Auch phagozytierte Fluorochrome sowie eine Autofluoreszenz der Zellen gehören zu den Artefakten, die mit Hilfe von Isotypkontrollen detektiert werden. (68)

Die vier in dieser Arbeit verwendeten Isotypkontrollen sind wie folgt: PE [MOPC-173; Biolegend], PB [MCP-11, Biolegend], APC [MOPC-21; Biolegend] und PE/Cy7 [MOPC-21; Biolegend].

In den Vorversuchen und auch in den Untersuchungen der ersten Patientenproben wurde mittels Isotypkontrollproben festgestellt, dass die intendiert angefärbten Zellpopulationen unter Anwendung des oben genannten Fluoreszenzfarbstoffpanels gut von den negativen Zellen sowie Hintergrundsignalen differenziert werden können. Somit kann der Einfluss von unspezifischen Antikörper-Zellbindungen und falsch-positiv gemessener Zellen auf die Messergebnisse als minimal betrachtet werden. In der Folge wurde auf eine Weiterführung der Isotypen-Kontrollen verzichtet. Die Isotypkontrolle für den CD86-Antikörper (Farbstoff PE) wird exemplarisch graphisch dargestellt:

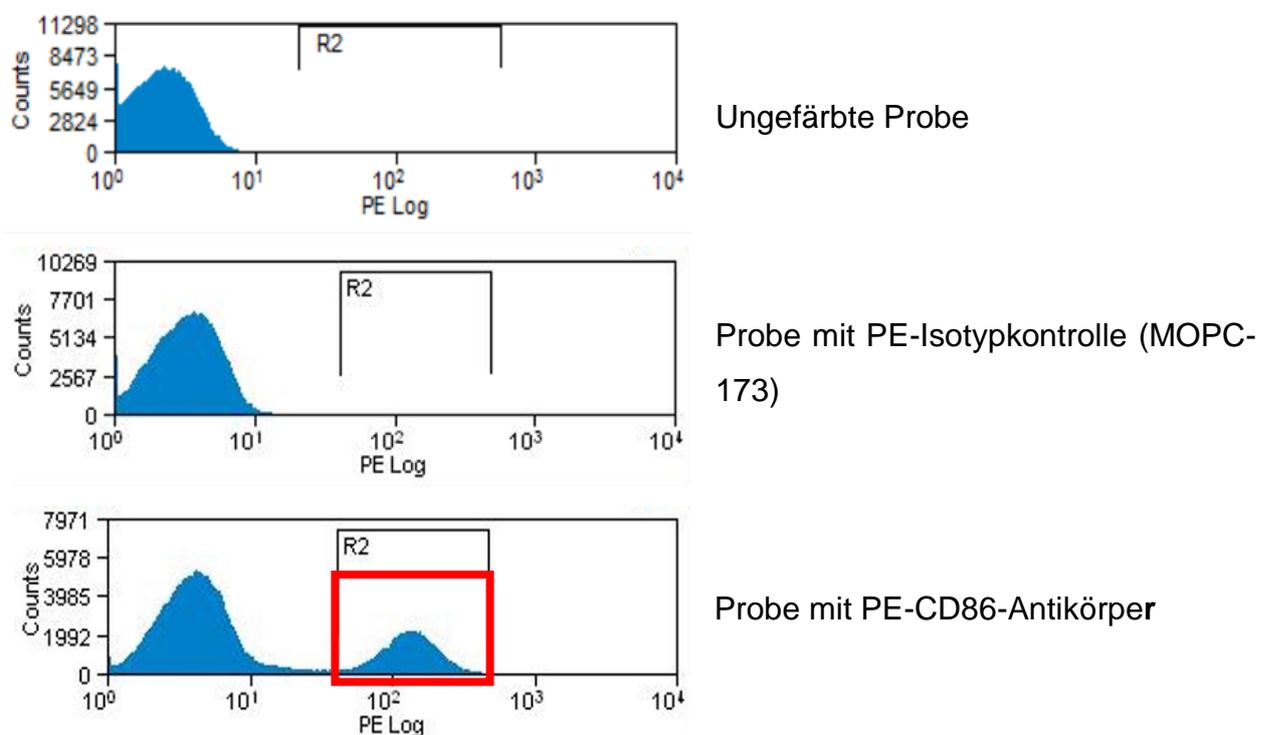


Abbildung 3: Isotypkontrolle

X-Achse: Intensität der gemessenen emittierten Fluoreszenz des jeweiligen Farbstoffes. Y-Achse: Anzahl der gemessenen Zellen.

Rote Box: CD86-positive Zellen/Monozyten, welche sich eindeutig von

3.4.4 Probenverarbeitung

Für die Messung der Monozytensubpopulationen und -aktivierung wurde das aus einer peripheren Vene entnommenen Blut in 2mL-EDTA-Vacutainern gesammelt und innerhalb von unter 2 Stunden weiterverarbeitet.

200 µL EDTA-Vollblut wurden für 15 Minuten mit der Antikörpermischung aus den monoklonalen Antikörpern (1 µL CD86 [PE; B7-2; Biolegend, San Diego, USA], 2 µL CD14 [PB; M5E2; Biolegend], 1 µL CD16 [APC, 3G8; Biolegend], 5 µL CD11b [PE-Cy7; ICRF44; Biolegend]) bei 4°C und im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte eine 15-minütige Erythrozytenlyse mit 2mL EasyLyse (Dako, Carpinteria, USA) nach Angaben des Herstellers abgedunkelt bei Raumtemperatur. Zur Entfernung von überschüssiger Lysereagenz, Erythrozytenfragmenten und ungebundenen Antikörpern wurden die Proben bei 300g für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 3.0R, Thermo Scientific). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Dabei bleibt das Leukozyten-Antikörper-Pellet am Boden des FACS-Röhrchens (Falcon) kleben. Das Pellet wurde in 400µL Phosphat-Buffered Saline (PBS, PAA Laboratories) resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen. Als Referenz wurde zu jeder mit Antikörpern behandelten Probe eine Messung mit ungefärbtem Blut und initial auch eine Messung mit einer kombinierten Isotypen-Antigenmischung (siehe oben) durchgeführt.

3.4.5 Differenzierung der Monozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie

Das in dieser Studie verwendete Protokoll orientiert sich an etablierten Nachweismethoden zur Identifizierung von Monozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie (69). Eine grobe Identifikation ist bereits durch die alleinige Betrachtung der physikalischen Eigenschaften, also des FSC- und SSC-Musters möglich, wegen Verunreinigungen mit Lymphozyten und Granulozyten jedoch ungenau. Allgemein wird die Anwendung eines Pan-Monozyten-Markers empfohlen, mit dem zuerst die Identifikation der gesamten Monozytenpopulation erfolgt, bevor mit Hilfe von CD14 und CD16 die Differenzierung in die einzelnen Subpopulationen durchgeführt wird. Durch die Gruppe um Zawada wurde 2011 gezeigt, dass zu diesem Zweck die Oberflächenmarker CD86 und HLA-DR (Humanes Leukozytenantigen vom DR Isotyp) geeignet sind und nahezu identische Ergebnisse in der Detektion von Monozyten und dem Ausschluss anderer Immunzellen erzielen (70). Die Nutzung solcher Gesamt-Monozytenmarker ermöglicht die Exklusion von Neutrophilen und Natural Killer (NK-) Zellen in der zu

untersuchenden Zellpopulation (52). Eine graphische Darstellung der Verwendung des Panmonozytenmarkers CD86 findet sich in der folgenden Abbildung (Abbildung 4)

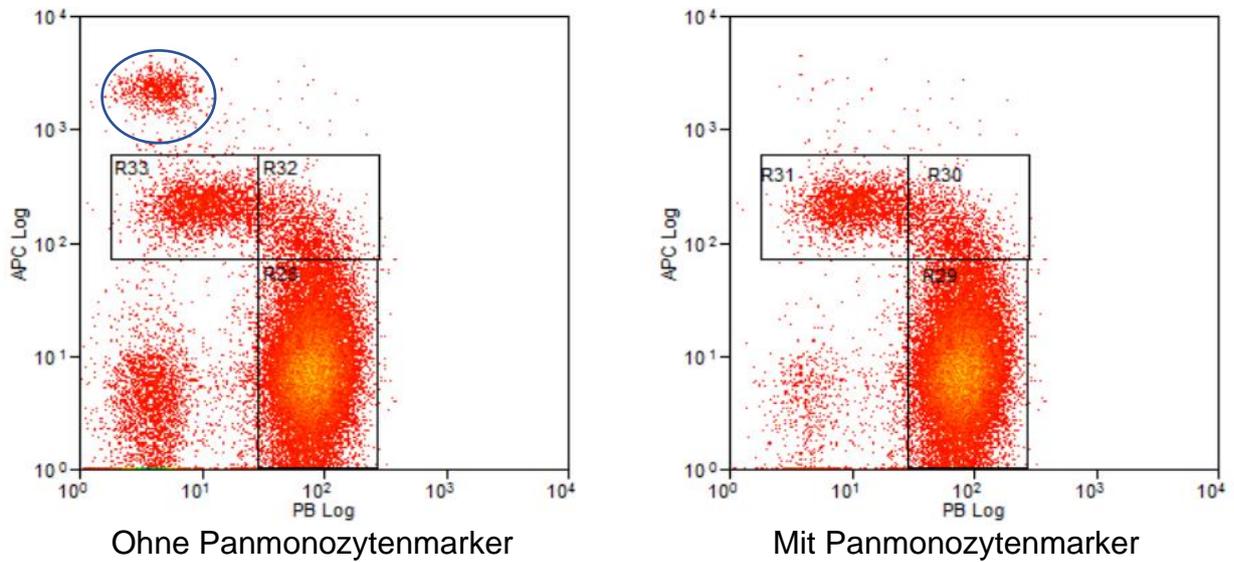


Abbildung 4: Verwendung des Panmonozytenmarkers CD86

Darstellung der Monozytensubpopulationen im CD14-CD16-Zytogramm. X-Achse: logarithmische Skala, Fluoreszenz Pacific Blue (PB), CD 14 repräsentierend. Y-Achse: logarithmische Skala, Fluoreszenz Allophycocyanin (APC), repräsentierend CD16. Blauer Kreis: Verunreinigung durch Granulozyten

Das Gatingprotokoll wird im folgenden Text und in der folgenden Abbildung 5 erläutert:

- Schritt 1: Die gefärbte Zellsuspension wurde mittels FSC-SSC-Zytogramm dargestellt. Zirkulierende mononukleäre Zellen wurden anhand ihrer typischen FSC- und SSC-Eigenschaften identifiziert, umrandet und auf ein CD86-Histogramm aufgetragen.
- Schritt 2: CD86-positive Zellen wurden zur weiteren Messung markiert, somit wurde die Monozytengesamtpopulation identifiziert und Granulozyten, Lymphozyten und Natural-Killer-Zellen und weitere Verunreinigungen ausgeschlossen.
- Schritt 3: Zur Qualitätskontrolle wird die Monozytengesamtpopulation auf ein FSC/SSC-Zytogramm „zurück-gegated“. Hier ist ersichtlich, dass Lymphozyten und Granulozyten komplett ausgeschlossen sind.
- Schritt 4: Die Monozytengesamtpopulation wird markiert und in einem CD14/CD16 - Zytogramm aufgetragen. Hier wurde die Aufteilung in CD14++CD16- (klassisch), CD14++CD16+ (intermediär) und CD14+CD16++ (nicht-klassisch) durchgeführt. Die Separation von intermediären und nicht-klassischen Monozyten wurde entsprechend des „Heterogeneity of Monocytes in Subjects Who Undergo Elective Coronary Angiography—The Homburg Evaluation“ (HOM SWEET HOME) Protokolls (69) durch eine Verlängerung der vertikalen Linie links der CD14-positiven Zellen festgelegt, welche die Abgrenzung der klassischen Monozyten darstellt.
- Schritt 5: Die Intensität der CD11b-Expression wurde sowohl für die Monozytengesamtpopulation, als auch für die individuellen Monozytensubpopulationen in Histogrammen aufgeteilt. Sie wird durch die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) repräsentiert.

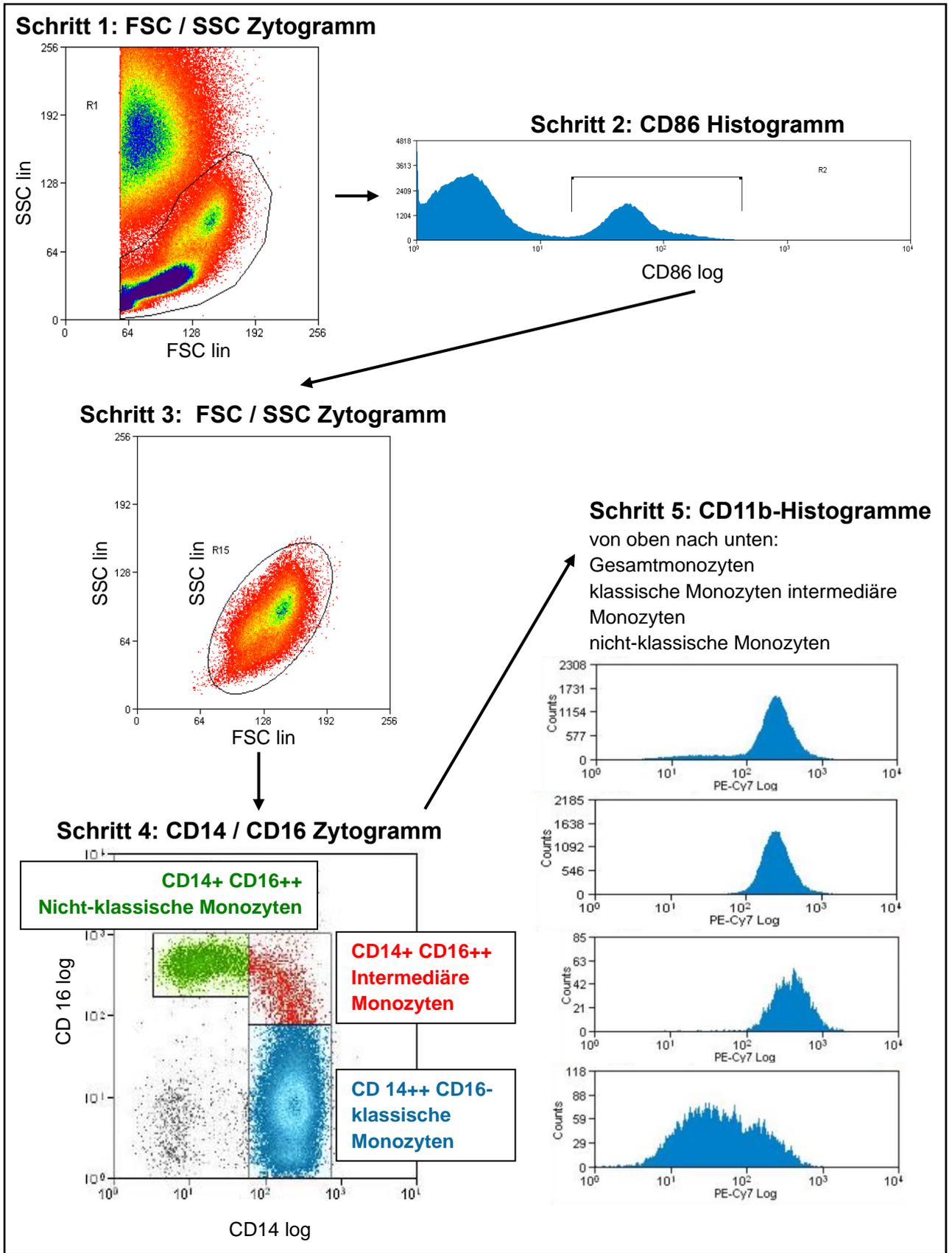


Abbildung 5: Gating-Strategie zur Bestimmung der Monozytensubpopulationen und der Monozytenaktivierung

Die durchflusszytometrischen Messungen und Analysen erfolgte mit Hilfe der Summit™ 4.3 Software von Beckman Coulter. Alle Analysen wurden von zwei verblindeten Untersuchern durchgeführt. Alle, in dieser Dissertation angegebenen Daten zu den Monozytensubpopulationen entsprechen dem Mittelwert beider Auswertungen. Eine Interobserver-Variabilitätsanalyse wurde mittels Intraklassen-Korrelation mit Hilfe von SPSS berechnet. Die Interobserver Übereinstimmung betrug 0.85 (95% Konfidenzintervall [KI]: 0.80-0.89), 0.88 (KI: 0.84-0.91), 0.97 (KI: 0.96-0.98), und 0.99 (KI: 0.99-1.00) für klassische, intermediäre, nicht- klassische Monozytenzahlen sowie für die Gesamtaktivierung.

3.5 Statistische Auswertung

Die deskriptive Darstellung von normalverteilten Daten erfolgte als arithmetischer Mittelwert \pm die Standardabweichung; die Darstellung von nicht-normalverteilten Daten als Median mit Angabe von Interquartilen (25. / 75.). Nominal- und ordinal skalierte Daten werden als absolute und relative Häufigkeit angegeben. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die folgenden statistischen Testverfahren wurden angewendet: Zum Vergleich zweier unabhängiger Variablen wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. Häufigkeiten wurden mittels chi-Quadrat-Test verglichen. Korrelationen wurden mit Hilfe der Rangkorrelation nach Spearman für nicht-parametrische Variablen berechnet. Zur Berechnung der Kovarianz der intermediären Monozyten mit den Variablen Alter, BMI, LDL-Cholesterin, NT-proBNP, NYHA-Klasse und Kreatinin sowie multifaktorielle Analysen mit den Faktoren Geschlecht, Diabetes, Hypercholesterinämie und Medikationen wurde die multivariate Analyse nach Brunner angewendet. (71)

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS Version 23.0 (IBM Corp.) und SAS 9.4 (Statistical Analysis System Institute Inc.).

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Charakteristika

100 Patienten mit hochgradiger AS sowie 75 Kontrollpatienten ohne AS wurden in die Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter der AS- und Kontrollgruppe betrug 77,0 (73,3-82,0) versus 75,0 (71,0-78,0) Jahre ($p=0,094$), die Geschlechterverteilung war mit einem Frauenanteil von 45,0% in der AS-Gruppe versus 38,7% in der Kontrollgruppe vergleichbar hoch ($p=0,442$) (Tabelle 4). In Hinblick auf kardiovaskuläre Risikofaktoren bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Tabelle 5); ähnlich viele Probanden in beiden Gruppen litten an einer arteriellen Hypertonie, einer Hyperlipoproteinämie und einem Diabetes mellitus. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Serum-Kreatinins zwischen beiden Gruppen. Der Body Mass Index (BMI) war in der AS-Gruppe gering, jedoch statistisch signifikant höher als in der Kontrollgruppe (27,5 kg/m² versus 26,0 kg/m², $p=0,021$).

Bezüglich der medizinischen Vorgeschichte waren beide Gruppen homogen (Tabelle 6). Eine koronare Herzkrankheit (KHK) lag in 55,0% (AS) versus 58,7% (Kontrollgruppe, $p=0,647$) der Patienten vor. Die Anzahl der stattgehabten kardiovaskulären Ereignisse wie Myokardinfarkt sowie der cerebro-vaskulären ischämischen Erkrankungen wie TIA und Schlaganfall ähnelte sich in beiden Gruppen. Die Häufigkeit vorausgegangener kardiovaskulärer Interventionen, wie Koronarstents oder Bypassoperationen war in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. In der AS-Gruppe gaben die Patienten eine stärkere Belastungsdypnoe (höheres NYHA-Stadium) an, als die Kontrollen ($p=0,005$). Die Serum-NT-proBNP-Konzentration der AS-Gruppe war signifikant höher als in der Kontrollgruppe (1030,0 pg/mL [419,8-2173,3] versus 313,0 pg/mL [134,5-1095,5], $p<0.001$).

Hinsichtlich der Dauermedikation nahmen Patienten der AS-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe weniger häufig einen ACE-Hemmer, jedoch häufiger ein Schleifendiuretika ein. Die Einnahme von ASS, weiteren Thrombozytenaggregationshemmern, Statinen, Betarezeptorblockern, Kalziumkanalantagonisten, Thiaziden und Mineralokortikoidrezeptorenantagonisten unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen (Tabelle 7).

Nach den morphologischen und hämodynamischen Kriterien der Echokardiographie wiesen alle Teilnehmer der AS-Gruppe eine hochgradige AS auf: Die durchschnittliche Öffnungsfläche (AVA) betrug $0,75 \text{ cm}^2 \pm 0,18 \text{ cm}^2$, die durchschnittliche maximale Flussgeschwindigkeit (AV Vmax) betrug $4,1 \text{ m/s} \pm 0,8 \text{ m/s}$ und der durchschnittliche mittlere Druckgradient (AV mean PG) betrug $41,5 \text{ mmHg} \pm 15,0 \text{ mmHg}$. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) war in beiden Gruppen vergleichbar ($53,4\% \pm 10,7$ versus $53,0\% \pm 11,1$, $p=0,788$) (Tabelle 4).

Laborchemisch gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der weißen Blutkörperchen im Differenzialblutbild und der Gesamtmonozyten im Vollblut sowie der Konzentration von C-reaktivem Protein, Interleukin-6 und TNF-alpha im Serum (Tabelle 8).

Tabelle 4: Alter, Geschlecht und echokardiographische Charakteristika

	AS-Gruppe	Kontrollgruppe	p
Anzahl, n	100	75	
Alter (Jahre)	77.0 (73.3-82.0)	75.0 (71.0-78.0)	0.094
Geschlecht (w / m), n (%)	45 (45.0) / 55 (55.0)	29 (38.7) / 46 (61.3)	0.442
Vmax, m/s	4.1 ± 0.8	1.4 ± 0.3	<0.001
KÖF, cm^2	0.75 ± 0.18		
Mitt. Druckgradient, mmHg	41.5 ± 15.0		
LVEF, %	53.4 ± 10.7	53.0 ± 11.1	0.788

Tabelle 5: Kardiovaskuläre Risikofaktoren

	AS-Gruppe	Kontrollgruppe	p
BMI, kg/m^2	27.5 (24.6-30.0)	26.0 (23.0-29.3)	0.021
IDDM, n (%)	15 (15.0)	10 (13.3)	0.829
NIDDM, n (%)	14 (14.0)	4 (5.3)	0.079
Hypercholesterinämie, n (%)	47 (47.0)	33 (44.0)	0.760
Gesamtcholesterin, mg/dL	179.9 ± 45.9	176.2 ± 40.6	0.579

LDL-Cholesterin, mg/dL	110.5 ± 38.7	106.5 ± 36.3	0.488
HDL-Cholesterin, mg/dL	54.7 ± 16.7	54.6 ± 16.8	0.978
Triglyceride, mg/dL	121.3 ± 57.7	132.7 ± 69.7	0.242
Arterielle Hypertonie, n (%)	78 (78.0)	53 (70.7)	0.294
Sys. Blutdruck, mmHg	131.0 ± 16.3	128.6 ± 14.0	0.314
Diast. Blutdruck, mmHg	76.0 ± 12.0	77.0 ± 9.2	0.538
Kreatinin, mg/dl	1.03 ± 0.32	0.95 ± 0.26	0.099

Tabelle 6: Kardiovaskuläre Vorerkrankungen

	AS-Gruppe	Kontrollgruppe	p
KHK, n (%)	55 (55.0)	44 (58.7)	0.647
Z. n. Myokardinfarkt, n (%)	22 (22.0)	22 (29.3)	1.0
Z. n. koronarer Stentimplantation, n (%)	35 (35.0)	30 (40.0)	0.530
Z. n. Bypass-Operation, n (%)	11 (11.0)	8 (10.7)	1.0
Z. n. TIA / Schlaganfall, n (%)	11 (11.0)	12 (16.0)	0.371
pAVK, n (%)	10 (10.0)	6 (8.0)	0.793

Tabelle 7: Medikation

	AS-Gruppe	Kontrollgruppe	p
ASS, n (%)	65 (65.0)	41 (54.7)	0.211
Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor, n (%)	22 (22.0)	20 (26.7)	0.481
Statine, n (%)	62 (62.0)	47 (62.7)	1.0
ACE-Hemmer, n (%)	43 (43.0)	48 (64.0)	0.006
AT1-Rez.-Antagonist, n (%)	32 (32.0)	27 (36.0)	0.629

Betarezeptorenblocker, n (%)	83 (83.0)	63 (84.0)	1.0
Kalziumkanalantagonisten, n (%)	30 (30.0)	20 (26.7)	0.736
Schleifendiuretika, n (%)	44 (44.0)	20 (26.7)	0.026
Thiazide, n (%)	26 (26.0)	23 (30.7)	0.610
Aldosteron-Antagonisten, n (%)	13 (13.0)	11 (14.7)	0.826

Tabelle 8: Immunzellen und Entzündungsmarker

	AS	Kontrollgruppe	p
Leukozyten, nL	7.2 ± 2.0	6.8 ± 1.6	0.121
Monozyten, nL	0.67 ± 0.24	0.65 ± 0.16	0.428
CRP, mg/L	2.1 (0.9-4.5)	1.8 (0.7-3.7)	0.252
Interleukin-6, pg/mL	2.9 (2.0-4.6)	2.5 (2.0-4.6)	0.218
TNF-α, pg/mL	10.3 (7.9-13.4)	9.7 (8.1-11.6)	0.325

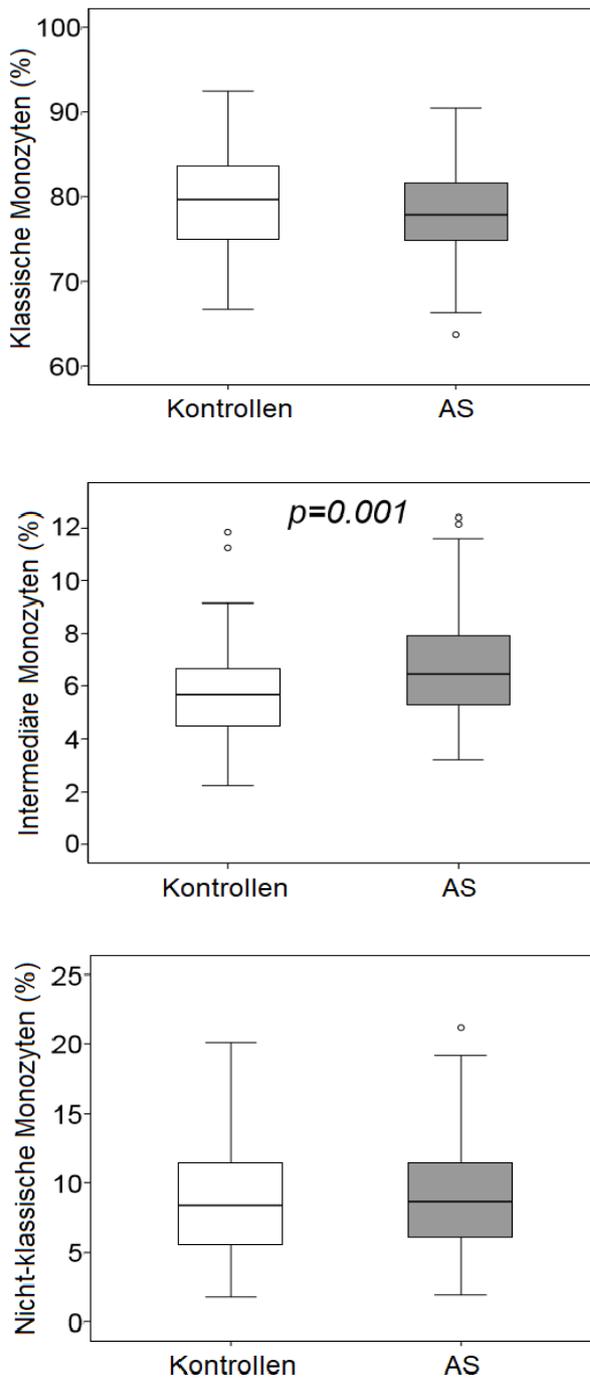


Abbildung 6: Box-Plots Monozytensubpopulationen bei Patienten mit und ohne hochgradige AS

Modifiziert aus Hewing B, Au SC, Ludwig A et al. Severe aortic valve stenosis is associated with increased levels of intermediate monocytes. J Cardiovasc Transl Res. 2017

4.2 Analyse der Monozytensubpopulationen

Die durchflusszytometrische Analyse der Monozyten-Subpopulationen zeigt, dass Patienten mit hochgradiger AS einen erhöhten relativen und absoluten Gehalt an intermediären Monozyten im Blut im Vergleich zu Patienten ohne AS aufweisen (Tabelle 9, Abbildung 6). Dagegen unterschied sich der Gehalt an zirkulierenden klassischen und nicht-klassischen Monozyten nicht signifikant zwischen beiden Gruppen.

Der „Aktivierungsstatus“ der Monozyten, gemessen mittels der medianen Fluoreszenzaktivität (MFI) des Markers CD11b, war in der AS und in der Kontrollgruppe für die Gesamtmonozyten sowie die drei individuellen Monozyten-subpopulationen nicht signifikant unterschiedlich. Es zeigte sich die höchste MFI bei den intermediären Monozyten und die geringste MFI bei den nicht-klassischen Monozyten (Tabelle 9). Dieses Verhältnis betrug stets etwa 4:1.

Tabelle 9: Absolute und relative Monozytenzahlen, Monozytenaktivierung

Parameter	Kontrollgruppe	AS-Patienten	p
Klassische Monozyten, n/μL	510,9 (396,5-610,7)	497,4 (381,5-624,7)	0,786
Intermediäre Monozyten, n/μL	34,3 (27,0-45,7)	40,1 (29,6-55,6)	0,015
Nicht-klassische Monozyten, n/μL	50,6 (33,0-78,0)	55,9 (35,6-77,9)	0,416
Klassische Monozyten, %	80,0 (74,9-83,6)	77,9 (74,7-81,7)	0,179
Intermediäre, Monozyten, %	5,7 (4,5-6,6)	6,5 (5,2-7,9)	0,001
Nicht-klassische Monozyten, %	8,4 (5,6-11,5)	8,7 (6,1-11,5)	0,488
CD11b Gesamtmonozyten, MFI	300,9 (246,8-360,5)	290,7 (242,8-373,3)	0,993
CD11b Klassische Monozyten, MFI	335,3 (265,2-401,7)	312,0 (246,1-407,3)	0,752
CD11b Intermediäre Monozyten, MFI	416,8 (360,5-481,2)	412,8 (323,5-524,4)	0,974
CD11b Nicht- klassische Monozyten, MFI	88,6 (67,2-120,0)	90,6 (61,4-130,5)	0,860

Alle Daten werden als Median mit Interquartilen angegeben.

Modifiziert aus Hewing B, Au SC, Ludwig A et al. Severe aortic valve stenosis is associated with increased levels of intermediate monocytes. J Cardiovasc Transl Res. 2017

Zur Untersuchung von Assoziationen des Gehalts an zirkulierenden intermediären Monozyten mit möglichen Einflussfaktoren auf das Vorliegen einer hochgradigen AS wurden eine multivariate Analyse nach Brunner durchgeführt (72). In die Analyse wurden aufgenommen: Patienteneigenschaften, welche sich zwischen den beiden Probandengruppen signifikant unterschieden (NYHA-Stufe, NT-proBNP, BMI, Medikation mit ACE-Hemmern und Schleifendiuretika), Faktoren, welche in vorhergehenden Studien die eine Beeinflussung der Monozytensubpopulationen zeigten (Alter, BMI und Nierenfunktionseinschränkung) und Faktoren, welche als Risikofaktoren für die AS

bekannt sind (Alter, Geschlecht, LDL-Cholesterin). Die Analyse zeigte, dass der Gehalt an intermediären Monozyten unabhängig von den oben genannten Einflussfaktoren ist.

Diese zeigte, dass die beobachteten Unterschiede des Gehalts an intermediären Monozyten auch nach Korrektur für die Kovariaten Alter, BMI, LDL, NT-proBNP, NYHA-Klasse und Serumkreatinin signifikant blieben ($p=0,006$ für den relativen intermediären Monozytengehalt und $p=0,01$ für den absoluten Monozytengehalt). Zudem zeigte die multivariate Analyse, dass die unterschiedlichen Spiegel der intermediären Monozyten unabhängig von Geschlecht, Vorliegen von Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Medikation mit ACE-Hemmern und Schleifendiuretika war.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde erstmalig die Verteilung der drei zirkulierenden Monozytensubpopulationen – klassischen CD14⁺⁺CD16⁻, intermediären CD14⁺⁺CD16⁺ und nicht-klassischen CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten – bei Patienten mit einer hochgradigen AS evaluiert. Die Studiengröße umfasste insgesamt 100 Probanden mit hochgradiger AS, welche mit einer Kontrollgruppe von 75 Probanden ohne AS verglichen wurde. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Aortenklappenstenose einen erhöhten absoluten und relativen Gehalt an intermediären Monozyten im peripheren Blut aufweisen.

5.1 Methodisches Vorgehen

Durch die Anwendung der oben genannten stringenten Ein- und Ausschlusskriterien bei der Patientenrekrutierung konnten zwei Patientenkollektive rekrutiert, welche hinsichtlich der klinischen und laborchemischen Eigenschaften sehr gut vergleichbar waren. Insbesondere inflammatorische Einflussfaktoren, welche einen Effekt auf die Verteilung der Monozytensubpopulationen haben und somit die Ergebnisse dieser Arbeit empfindlich stören könnten, wurden als Ausschlusskriterien definiert. Darunter fallen Erkrankungen, die mit systemischer oder lokaler Inflammation einhergehen - akute Entzündungen, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, akutes Koronarsyndrom - sowie Zustände, die eine verminderte Immunkompetenz bedingen - hämatologische und onkologische Erkrankungen und die Einnahme immunmodulatorischer Medikation, höhergradiger Leber- und Niereninsuffizienz. Anhand der konventionellen Entzündungs- und Immunparameter, welche in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich waren (Tabelle 8), kann gezeigt werden, dass homogene Probandengruppen rekrutiert werden konnten. Dies ist die Voraussetzung dafür, um die Verteilung der Monozytensubpopulationen als isolierte Variable in der hochgradigen AS untersuchen zu können. Die multivariate Analyse zeigte, dass der Gehalt der intermediären Monozytensubpopulation unabhängig von den wenigen verbleibenden Unterschieden zwischen beiden Gruppen (BMI, Schweregrad der Herzinsuffizienz, Verschreibungsrate von ACE-Hemmern und Schleifendiuretika) ist.

Somit kann ein erhöhter Gehalt von intermediären Monozyten als unabhängiger Faktor in der hochgradigen AS gewertet werden.

Limitierend ist anzumerken, dass die strengen Ein- und Ausschlusskriterien, welche die Untersuchung des isolierten Einflusses der AS auf die Monozytensubpopulationen ermöglichen, eine relevante Ausschlussrate in der Patientenrekrutierung zur Folge hatten. Nur 436 der insgesamt 711 gescreenten Patienten erfüllten die Ein- und Ausschlusskriterien (61,3%). Somit ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das realistische, alltägliche Patientenkontinuum, welches häufig eine der o.g. Komorbiditäten aufweist, möglicherweise eingeschränkt.

In der vorliegenden Dissertation wird die aktuell gültige Nomenklatur zur Einteilung der Monozytensubpopulationen beim Menschen angewendet (46). Das methodische Vorgehen der Fluoreszenzmarkierung und der durchflusszytometrischen Messungen mit oben beschriebenen Gating-Protokoll orientiert sich an einem etablierten Protokoll zur Differenzierung von Monozytensubpopulationen (69). Durch den Einsatz des Pan-Monozytenmarkers CD86 in Kombination mit dem typischen monozytären FFS- / SSC-Muster konnten der Einfluss von Granulozyten und andere weißen Blutkörperchen auf die Ergebnisse deutlich verringert werden, wie im Vorversuch gezeigt wurde (siehe Abbildung 3). Insbesondere phagozytierende Zellen müssen für die Analyse ausgeschlossen werden, da auch phagozytierte Fluoreszenzfarbstoffe in der durchflusszytometrischen Analyse gezählt werden und sie somit verfälschen können.

Eine grundlegende Unsicherheit der Unterteilung zwischen den drei Monozytensubpopulationen besteht in der Differenzierung zwischen den intermediären und den nicht-klassischen Monozyten. Aktuelle Protokolle, an der sich diese Dissertation orientiert, wie zum Beispiel in der HOM SWEET HOME Studie angewandt, nehmen die Separation anhand der CD14- und CD16-Eigenschaften vor. Im CD14-CD16-Zytogramm wird entlang der CD14-positiven klassischen Monozyten eine künstliche Separationslinie gezogen und somit zwischen CD14-positiven und CD14-negativen Zellen differenziert. Hierbei erfolgt somit eine künstlich definierte Unterteilung der CD16+-Zellen anhand des Zytogrammbildes, welche möglicherweise nicht die exakte Differenzierung in intermediäre und nicht-klassische Monozyten widerspiegelt.

Dieses Problem wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen erkannt. Neuere Studien zu Monozytensubpopulationen haben weitere Marker identifiziert, die zu einer besseren

labordiagnostischen Unterscheidung von nicht-klassischen und intermediären Monozyten beitragen können. Dabei handelt es sich beispielsweise um Zelloberflächenproteine wie den Chemokinrezeptor CCR2, welches hauptsächlich auf klassischen und intermediären Monozyten, jedoch beinahe gar nicht auf nicht-klassischen Monozyten vorkommt (73). Von Interesse ist auch das 6-sulfo LacNAc (SLAN), ein modifizierter P-selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSFL-1), welcher auf CD14+CD16++ Monozyten exprimiert wird, aber nicht auf CD14++CD16+ Monozyten (74). Die Relevanz dieser neuen, vielversprechenden Marker zur besseren Diskriminierung der individuellen Monozytensubpopulation sollte allerdings noch durch weiterführende Studien evaluiert werden. Ziel wäre, ein Standardprotokoll zu entwickeln, welches die Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Studien verbessern würde.

5.2 Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in den Kontext klinischer Studien

Intermediäre Monozyten werden als die Monozytensubpopulation mit besonders proinflammatorischen Eigenschaften angesehen (51). Sie sezernieren große Mengen entzündungsfördernder Zytokine und produzieren im Vergleich zu den klassischen und nicht-klassischen Monozyten mehr reaktive Sauerstoffspezies. Die in der vorliegenden Dissertation nachgewiesene Umverteilung der Monozytensubpopulationen im peripheren Blut zugunsten der inflammatorischen CD14++CD16+ Monozytensubpopulation zeigt, dass diese inflammatorischen Prozesse nicht nur auf den Klappenapparat limitiert sind, sondern dass ein systemisch veränderter Entzündungsstatus vorliegt (50). Eine wichtige Erkenntnis aus der Studie ist, dass sich die im Blut messbaren systemischen inflammatorischen Prozesse bei der AS nur in der Umverteilung der Monozytensubpopulation widerspiegelt. Hingegen zeigten sich zwischen AS-Patienten und Kontrollprobanden keine Unterschiede der klassischen Entzündungsparameter wie Leukozyten, hs-CRP, TNF- α oder IL-6. Bezüglich dieser konventionellen inflammatorischen Marker liegt eine heterogene Studienlage bei der AS vor. Es gibt sowohl Studien, welche bei AS Patienten erhöhte CRP-Spiegel maßen (16, 19), als auch Studien, welche keinen Unterschied feststellten (25). Ein möglicher Erklärungsansatz ist in den definierten Ausschlusskriterien zu finden, welche von vornherein alle Patienten mit erhöhtem CRP und aktiver inflammatorischer Erkrankung ausschlossen.

Die Assoziation zwischen der entzündungsfördernden Monozytensubpopulation und der Erkrankung der kalzifizierenden Aortenklappenstenose untermauert die gegenwärtige Ansicht der Pathophysiologie der AS, welche inflammatorische Prozesse als Grundpfeiler der Krankheitsinitiierung und der Krankheitsprogression beschreibt und daher große Parallelen zur Pathogenese der Atherosklerose aufweist. In der atherosklerotischen Plaque und ihren Krankheitsmanifestationen ist die Monozyten-Makrophagen-Linie der vorherrschende zelluläre Treiber der Inflammation. In rezenten Studien konnte hierbei eine Assoziation der inflammatorischen intermediären Monozytensubpopulation mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf identifiziert werden. Hierbei wurden stets die Monozytensubpopulationen im peripheren Blut gemessen. Im Folgenden werden einige dieser Studien vorgestellt:

Hervorzuheben ist die von Böhm et al. durchgeführte, „Heterogeneity of Monocytes in Subjects Who Undergo Elective Coronary Angiography—The Homburg Evaluation“ (HOM SWEET HOME-) Studie. Eingeschlossen wurden 951 Patienten, die zwischen 2007 und 2010 im Universitätsklinikum des Saarlandes zur elektiven Koronarangiographie eingewiesen wurden. Bei diesen Patienten konnte ein erhöhter Gehalt an intermediären Monozyten im Blut als prognostisch ungünstiger Faktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse (Beobachtungszeitraum: 2,6 [1,6-3,6] Jahre) identifiziert werden. Als Endpunkte der Studie wurden Ereignisse in Folge atherosklerotischer Erkrankungen definiert: Tod durch kardiovaskuläre Ursachen, akute Myokardinfarkte sowie nicht-hämorrhagische Schlaganfälle. Dabei diskriminierte ein Unterschied im Gehalt an intermediären Monozyten im Blut von im Median 47/ μ l versus 41/ μ l zwischen den Patientenkollektiven mit und ohne kardiovaskulärem Ereignis. Dieses Ergebnis ähnelt in der quantitativen Größenordnung dem Unterschied an intermediären Monozyten zwischen AS Patienten und Kontrollen in der vorliegenden Dissertation. In der HOM SWEET HOME - Studie bestand keine Assoziation von klassischen und nicht-klassischen Monozyten mit den kardiovaskulären Endpunkten. Interessanterweise konnte auch in der hier durchgeführten Dissertation keine Assoziation von klassischen und nicht-klassischen Monozytensubpopulationen mit dem Vorliegen einer hochgradigen AS nachgewiesen werden.

In weiteren Studien zur koronaren Herzkrankheit konnte mittels Koronar-Computertomographie gezeigt werden, dass ein erhöhter Gehalt an intermediären

CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten einen prädiktiven, unabhängigen Marker für eine schwere kalzifizierende KHK mit hoher Plaque-Last darstellt. (66, (75)). Zudem gibt es Hinweise, dass ein erhöhter Gehalt an intermediären Monozyten mit einer erhöhten Plaquevulnerabilität assoziiert ist, welche mittels intravaskulärer Sonographie (IVUS) nachgewiesen wurde (76, 77).

Als weiteres Beispiel für atherosklerotisch bedingte Krankheiten mit Assoziation zu einer vermehrten intermediären Monozytensubpopulation ist die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) zu nennen (78). Zudem zeigte sich, dass ein Anstieg der intermediären Monozytenzahlen nach erfolgter perkutaner Angioplastie die Entwicklung einer Restenose des Gefäßes voraussagen konnte. Im Einklang mit der hier vorliegenden Dissertation bestand auch in der pAVK keine Assoziation von klassischen und nicht-klassischen Monozyten mit der Erkrankung. (79)

5.3 Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in den Kontext experimenteller Studien

In der vorliegenden Dissertation wurde eine Assoziation zwischen der inflammatorischen intermediären CD14⁺⁺CD16⁺ Monozytensubpopulation mit dem Vorliegen einer hochgradigen AS festgestellt. Aufgrund des observativen Designs dieser Studie mit einer einzeitigen Messung lässt sich über die Kausalität der beobachteten Ergebnisse aktuell nur spekulieren. Es verbleibt unklar, ob der erhöhte Gehalt an intermediären Monozyten ein kausaler Faktor in der inflammatorischen Pathophysiologie der AS ist, oder lediglich eine Konsequenz der hämodynamischen Veränderungen im Rahmen der Stenosierung widerspiegelt. Für beide Theorien lassen sich in der Literatur Hinweise finden.

Einerseits findet sich eine enge Assoziation von Monozyten und insbesondere der CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten mit inflammatorischen Signalwegen, speziell des Aortenklappengewebes. Hierzu gehört insbesondere der Interleukin-1 β (IL-1 β) vermittelte Signalweg, welcher mehrere Schnittstellen mit der intermediären Monozytensubpopulation aufweist. IL-1 β wird unter anderem als zentrales, multifunktionelles Zytokin der atherosklerotischen Plaqueentwicklung angesehen (80) und mehrere Studien weisen auf eine Rolle von IL-1 β auch in der pathophysiologisch verwandten AS hin (81, 82). Speziell bezüglich der kalzifizierenden AS konnte *in vitro* ein erhöhter IL-1 β Gehalt in perioperativ explantiertem Klappengewebe bei erkrankten

Aortenklappen im Vergleich zu gesundem Klappengewebe gemessen werden (81, 82). Es konnte gezeigt werden, dass durch IL-1 β -Stimulation eine Veränderung der valvulären Interstitiumszellen zu Gunsten eines myofibroblasten-ähnlichen Phänotyps mit ausgeprägten inflammatorischen Eigenschaften induziert wird. Diese veränderten VICs nehmen über CD36 und Lipoxygenase-1 (LOX-1) vermittelte Prozesse oxidiertes LDL auf und werden zur Produktion erhöhter Mengen inflammatorischer Zytokine angeregt; dazu gehören die Interleukine IL-6 und IL-8 und der Entzündungsmediator Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (81). Zugleich finden sich Hinweise auf eine Dysfunktion der IL-1 β -Rezeptorantagonisten in VICs aus erkrankten Aortenklappen. Sie weisen somit eine Insuffizienz der antiinflammatorischen Mechanismen auf und sind vulnerabel gegenüber proinflammatorischen Stimuli durch IL-1 β (81, 83).

IL-1 β wirkt auf multiple Wege monozytotrop. So stimuliert IL-1 β einerseits die Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf den valvulären Endothelzellen und vermittelt somit eine vermehrte Aufnahme von Monozyten ins vaskuläre und valvuläre Endothel (84). Andererseits kommt es durch IL-1 β -Stimulation zu einer erhöhten Produktion von MCP-1 durch die VICs der Aortenklappe (81). Dieses wirkt insbesondere auf die intermediäre Monozytensubpopulation, mehr als auf die anderen beiden Monozytensubpopulationen, chemotaktisch (81, 84). MCP-1 ist auch unter dem Namen Chemokin (C-C motif) Ligand 2 (CCL2) bekannt und erhöhte MCP-1-Spiegel sind unter anderem mit atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (85).

MCP-1 bewirkt sowohl eine Rekrutierung neuer Monozyten aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation, als auch eine C-C Chemokinrezeptor Typ 2 (CCR2) vermittelte Chemotaxis und somit eine Mobilisierung von Monozyten in Richtung der Inflammation (86). Dabei werden von den drei Monozytensubpopulationen insbesondere die intermediären Monozyten durch MCP-1 stimuliert (81, 84). Eine mögliche Erklärung liegt in der besonders hohen Expression von CCR2, welche auf intermediären Monozyten gefunden wurde. Auch das Transmembranprotein C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5 (CCR5, CD195), welches ein weiterer Rezeptor für MCP-1 ist und eine Chemotaxis von Immunzellen hin zu inflammatorisch verändertem Gewebe bewirkt, wird unter den Monozytensubpopulationen beinahe ausschließlich von CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$ Monozyten exprimiert. (20, 86, 87).

Somit wird deutlich, dass Interleukin-1 β und MCP-1, maßgebliche Faktoren der inflammatorischen Vorgänge der AS, eine potentielle Schnittstelle zwischen der lokalen Inflammation mit der intermediären Monozytensubpopulation darstellen.

Die Induktion von MCP-1 und ein potentieller konsekutiver Anstieg der intermediären Monozytensubpopulation kann jedoch neben den oben genannten inflammatorischen Triggern auch durch hämodynamische Belastung ausgelöst werden. So konnte beispielsweise *in vitro* eine erhöhte endotheliale MCP-1-Sekretion durch Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (HUVECs) in Folge einer erhöhten Scherbelastung in einem Modell für hämodynamischen Fluss induziert werden (88, 89). *In vivo* wurde ein erhöhter MCP-1 Spiegel bei Probanden nach akuter maximaler körperlicher Belastung gemessen (90). Somit ist auch ein hämodynamischer Trigger, welchen eine stenosierte Aortenklappe mit erhöhter Flussgeschwindigkeit und erhöhtem Druckgradienten darstellt, als Ursache der Erhöhung des intermediären Monozytenspiegels denkbar.

In einer klinischen Studie untersuchten Kastellanos et al. bei Patienten mit einer AS den MCP-1 Spiegel im peripheren Blut. Sie maßen bei Patienten mit AS einen erhöhten Gehalt an MCP-1 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe sowie eine Regredienz des MCP-1-Spiegels in Verlaufsmessungen nach chirurgischem AKE (91). Die Autoren diskutieren dies als Zeichen der Abnahme des inflammatorischen systemischen Status nach AKE durch die Entfernung des entzündeten und verkalkten Aortenklappengewebes. Neben der Elimination der inflammatorischen Stimuli muss jedoch auch die Reduktion der hämodynamischen Scherkräfte durch die Entfernung der stenosierten Taschenklappe als Ursache für die Abnahme des MCP-1 Gehalts diskutiert werden, sodass in dieser Studie ebenfalls keine Aussage über die Kausalität der laborchemischen MCP-1 Reduktion getroffen werden kann. Eine Messung der Monozytensubpopulationen wurde in dieser Studie allerdings nicht durchgeführt.

5.4 Ausblick

Wie zuvor aufgeführt sind der IL-1 β -Signalweg und das Monozyten-Makrophagen-System potente Mediatoren der Inflammation und spielen sowohl in atherosklerotisch bedingten Erkrankungen als auch in der kalzifizierenden AS eine zentrale pathophysiologische Rolle. Infolgedessen sind diese beiden Faktoren interessante Targets für antiinflammatorische Therapieansätze.

Ein spezifischer Eingriff in den IL-1 β Signalweg mit therapeutischer Intention wurde erstmalig in der „Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study“ (CANTOS)-Studie durchgeführt, in diesem Fall für das Krankheitsbild der koronaren Herzkrankheit. In dieser 2017 publizierten, randomisierten, multizentrischen klinischen Studie konnte eine Reduktion des Risikos kardiovaskulärer Ereignisse durch gezielt antiinflammatorische Therapie bei Patienten mit bekannter KHK gezeigt werden. Unter der Gabe des Interleukin-1 β bindenden, monoklonalen Antikörpers Canakinumab wurde über einen Zeitraum von 48 Monaten eine Reduktion des IL-1 β -Spiegels, des hochsensitiven CRPs sowie letztlich auch einer Reduktion der Eventrate für kardiovaskuläre Ereignisse beobachtet (92).

Spezifische antiinflammatorische Ansätze zur Behandlung der Atherosklerose befinden sich noch in den Kinderschuhen. Bei der AS existiert ein solcher Therapieansatz gegen die maßgebliche Inflammation aktuell noch gar nicht. Dennoch erscheint es therapeutisch sinnvoll zu sein, die maßgeblichen inflammatorischen und kalzifizierenden Prozesse der AS bereits im frühen Krankheitsverlauf, beispielsweise im Stadium der Aortenklappensklerose, zu verlangsamen oder gar zu verhindern, bevor sie zur irreversiblen Ossifikation und Zerstörung des Klappengewebes führen. Da nur ca. 10 bis 15% der Patienten mit einer Aortenklappensklerose im weiteren Verlauf auch eine hämodynamisch relevante AS entwickeln (13), müssen die Mechanismen identifiziert werden, die diesen Progress bedingen. Diese sind zum aktuellen Zeitpunkt noch unbekannt. Die konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren, insbesondere die Hypercholesterinämie, welche ein maßgeblicher Treiber der Atherosklerose ist, scheinen nicht die einzigen Einflussfaktoren für die Entwicklung einer AS zu sein, da die Optimierung der Risikofaktoren im Fall der AS nicht zur gewünschten Verlangsamung des Fortschreitens der Erkrankung bewirkt. Insbesondere die Statintherapie konnte im Gegensatz zur Atherosklerose keine Prognoseverbesserung bei Patienten mit AS erzielen (33, 35). Neue Erkenntnisse um die Mechanismen, welche den Progress von der Sklerose zur Stenose fördern, werden einerseits helfen, gefährdeten Patienten zu erfassen und andererseits ermöglichen, zielgerichtete antiinflammatorische Therapieansätze zu entwickeln.

Möglicherweise sind die Hochregulation des IL-1 β Signalwegs sowie der erhöhte Gehalt an proinflammatorischen intermediären Monozyten, welcher einen unabhängigen Faktor

der AS darstellt, Treiber der lokalen und systemischen Inflammation und Einflussfaktoren auf den Progress von der Sklerose zur Stenose.

Für ein besseres Verständnis der Erkrankung sind Studien mit longitudinalem Design mit sequentiellen Monozytenmessungen von Interesse. In frühen Stadien der Krankheit, beim Vorliegen einer Aortenklappensklerose und beginnenden Stenose wurde eine hohe inflammatorische Aktivität im Klappenmaterial festgestellt (6). Diese nehmen mit Progression der AS wieder ab und in späteren Stadien überwiegen dann die Kalzifizierungsprozesse des Klappenapparats (13). In großen Kohorten könnten, den Krankheitsverlauf begleitend, wiederholte Messungen der Monozytensubpopulationen durchgeführt werden. Durch chronologische Daten lassen sich möglicherweise Rückschlüsse über die ätiologische und pathophysiologische Bedeutung der Monozytensubpopulation in Beziehung zur Krankheitsprogression ziehen.

Die vorliegende Dissertation und die in diesem Zusammenhang erwähnten Studien weisen auf eine Beteiligung des Monozyten-Makrophagen-Systems und insbesondere der intermediären Monozytensubpopulation in der AS hin. Klinische und experimentelle Studien weisen auf einen Einfluss der intermediären Monozyten in der Pathogenese atherosklerotischer Erkrankungen hin. Intermediäre Monozyten sowie deren Affektoren und Effektoren können ein interessanter potentieller Ansatz bei der Entwicklung eines diagnostischen Biomarkers darstellen. Zudem können sie ein Target für eine gezielte antiinflammatorische Therapie bei Erkrankungen aus dem atherosklerotischen Formenkreis, im Speziellen bei der verwandten AS sein und sollten daher in weiterführenden Studien untersucht werden. Weitere phänotypische und funktionelle Charakterisierungen der einzelnen Monozytensubpopulationen sind notwendig, um die Rolle jedes individuellen Subtyps in der komplexen Pathogenese der AS sowie der nahe verwandten Atherosklerose weiter zu spezifizieren

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Assoziation zwischen den im Blut zirkulierenden Monozytensubpopulationen mit dem Vorliegen einer hochgradigen, kalzifizierenden Aortenklappenstenose untersucht. Die genauen Eigenschaften und Funktionen der drei Monozytensubpopulationen – klassischen (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediären (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassischen (CD14⁺CD16⁺⁺) Monozyten – ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Insbesondere den intermediären Monozyten wird eine enge Verknüpfung mit dem IL-1 β -Signalweg und MCP-1 sowie inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde bei 100 Patienten mit AS und 75 Kontrollprobanden ohne AS eine durchflusszytometrische Messung der drei Monozytensubpopulationen durchgeführt. Patienten mit hochgradiger AS hatten einen signifikant höheren absoluten und relativen Gehalt an intermediären Monozyten im peripheren Blut im Vergleich zu Patienten ohne AS (40,1 Zellen/ μ L versus 34,3 Zellen/ μ L, $p=0,015$; relativ 6.5% [5.2-7.9%] versus 5.7% [4.5-6.6%], $p=0.001$). Klassische und nicht-klassische Monozyten unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nicht. Die, mittels CD11b gemessene, Monozytenaktivierung war in keiner der drei Monozytensubpopulationen signifikant unterschiedlich. Diese Assoziation zwischen der erhöhten intermediären Subpopulation und der hochgradigen AS war unabhängig von weiteren klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren sowie aller Variablen, welche zwischen den beiden Probandengruppen signifikant unterschiedlich waren, sodass ein erhöhter Gehalt an intermediären Monozyten als unabhängiger Faktor bei der hochgradigen Aortenklappenstenose angesehen werden kann. Diese Erkenntnis erweitert das Wissen um die Pathophysiologie der AS und spiegelt die gegenwärtige Ansicht wider, dass es sich bei der AS um eine chronische, inflammatorische Erkrankung mit komplizierten zellulären und humoralen Prozessen handelt. Eine Umverteilung der Monozytensubpopulationen zu Gunsten der inflammatorischen intermediären Monozyten findet sich auch bei atherosklerotisch bedingten Erkrankungen. Inwiefern der erhöhte Gehalt an intermediären Monozyten im Blut bei Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose eine kausale Bedeutung in der Entstehung der AS hat, oder nur eine Folge der Erkrankung - insbesondere der hämodynamischen Situation - darstellt, kann aufgrund des einzeitigen observativen Charakters der Studie nicht beantwortet werden. Hierzu sind weiterführende Studien in Form von Langzeitstudien, histologischer

und funktioneller Untersuchungen sowie weiterer Charakterisierung der einzelnen Monozytensubpopulationen erforderlich.

7 Literaturverzeichnis

1. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, Vahanian A. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. 2003;24(13):1231-43.
2. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet*. 2006;368(9540):1005-11.
3. Eveborn GW, Schirmer H, Heggelund G, Lunde P, Rasmussen K. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromsø study. *Heart*. 2013;99(6):396-400.
4. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(3):630-4.
5. Siu SC, Silversides CK. Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(25):2789-800.
6. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005;111(24):3316-26.
7. Liu T, Xie M, Lv Q, Li Y, Fang L, Zhang L, Deng W, Wang J. Bicuspid Aortic Valve: An Update in Morphology, Genetics, Biomarker, Complications, Imaging Diagnosis and Treatment. *Front Physiol*. 2018;9:1921.
8. 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;90(2):844-53.
9. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16006.
10. Ghaisas NK, Foley JB, O'Briain DS, Crean P, Kelleher D, Walsh M. Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels and effects of valve replacement. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(7):2257-62.
11. Mazzone A, Epistolato MC, Gianetti J, Castagnini M, Sassi C, Ceravolo R, Bevilacqua S, Glauber M, Biagini A, Tanganelli P. Biological features (inflammation and neoangiogenesis) and atherosclerotic risk factors in carotid plaques and calcified aortic

valve stenosis: two different sites of the same disease? *Am J Clin Pathol*. 2006;126(4):494-502.

12. Dweck MR, Jenkins WS, Vesey AT, Pringle MA, Chin CW, Malley TS, Cowie WJ, Tsampasian V, Richardson H, Fletcher A, Wallace WA, Pessotto R, van Beek EJ, Boon NA, Rudd JH, Newby DE. ¹⁸F-sodium fluoride uptake is a marker of active calcification and disease progression in patients with aortic stenosis. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014;7(2):371-8.

13. Otto CM, Prendergast B. Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med*. 2014;371(8):744-56.

14. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*. 2001;103(11):1522-8.

15. Stangl V, Baldenhofer G, Knebel F, Zhang K, Sanad W, Spethmann S, Grubitzsch H, Sander M, Wernecke KD, Baumann G, Stangl K, Laule M. Impact of gender on three-month outcome and left ventricular remodeling after transfemoral transcatheter aortic valve implantation. *Am J Cardiol*. 2012;110(6):884-90.

16. Galante A, Pietroiusti A, Vellini M, Piccolo P, Possati G, De Bonis M, Grillo RL, Fontana C, Favalli C. C-reactive protein is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(4):1078-82.

17. Skowasch D, Tuleta I, Steinmetz M, Pabst S, Preusse CJ, Welz A, Nickenig G, Bauriedel G. Pathogen burden in degenerative aortic valves is associated with inflammatory and immune reactions. *J Heart Valve Dis*. 2009;18(4):411-7.

18. Gerber IL, Stewart RA, Hammett CJ, Legget ME, Oxenham H, West TM, French JK, White HD. Effect of aortic valve replacement on c-reactive protein in nonrheumatic aortic stenosis. *Am J Cardiol*. 2003;92(9):1129-32.

19. Beckmann E, Grau JB, Sainger R, Poggio P, Ferrari G. Insights into the use of biomarkers in calcific aortic valve disease. *J Heart Valve Dis*. 2010;19(4):441-52.

20. Kapelouzou A, Tsourelis L, Kaklamanis L, Degiannis D, Kogerakis N, Cokkinos DV. Serum and tissue biomarkers in aortic stenosis. *Global cardiology science & practice*. 2015;2015(4):49.

21. Saladze T, Gogiashvili L, Tsagareli Z, Bakhutashvili Z, Kavtaradze T. HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES OF ATHEROSCLEROTIC AND SENILE CALCIFIC AORTIC VALVE STENOSIS. *Georgian Med News*. 2015(244-245):94-9.

22. Novaro GM, Griffin BP. Calcific aortic stenosis: another face of atherosclerosis? *Cleve Clin J Med*. 2003;70(5):471-7.
23. Sathyamurthy I, Alex S. Calcific aortic valve disease: is it another face of atherosclerosis? *Indian Heart J*. 2015;67(5):503-6.
24. Katz R, Wong ND, Kronmal R, Takasu J, Shavelle DM, Probstfield JL, Bertoni AG, Budoff MJ, O'Brien KD. Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation*. 2006;113(17):2113-9.
25. Novaro GM, Katz R, Aviles RJ, Gottdiener JS, Cushman M, Psaty BM, Otto CM, Griffin BP. Clinical factors, but not C-reactive protein, predict progression of calcific aortic-valve disease: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(20):1992-8.
26. Paradis JM, Fried J, Nazif T, Kirtane A, Harjai K, Khalique O, Grubb K, George I, Hahn R, Williams M, Leon MB, Kodali S. Aortic stenosis and coronary artery disease: what do we know? What don't we know? A comprehensive review of the literature with proposed treatment algorithms. *Eur Heart J*. 2014;35(31):2069-82.
27. Owens DS, Katz R, Takasu J, Kronmal R, Budoff MJ, O'Brien KD. Incidence and progression of aortic valve calcium in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Cardiol*. 2010;105(5):701-8.
28. Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis. *Lancet*. 2009;373(9667):956-66.
29. Rosenhek R, Zilberszac R, Schemper M, Czerny M, Mundigler G, Graf S, Bergler-Klein J, Grimm M, Gabriel H, Maurer G. Natural history of very severe aortic stenosis. *Circulation*. 2010;121(1):151-6.
30. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, Bonis M, Hamm C, Holm PJ, Iung B, Lancellotti P, Lansac E, Muñoz DR, Rosenhek R, Sjögren J, Mas PT, Vahanian A, Walther T, Wendler O, Windecker S, Zamorano JL. [2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease]. *Kardiol Pol*. 2018;76(1):1-62.
31. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Edvardsen T, Goldstein S, Lancellotti P, LeFevre M, Miller F, Otto CM. Recommendations on the echocardiographic assessment of aortic valve stenosis: a focused update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2017;18(3):254-75.

32. Ayad RF, Grayburn PA, Ko JM, Filardo G, Roberts WC. Accuracy of two-dimensional echocardiography in determining aortic valve structure in patients >50 years of age having aortic valve replacement for aortic stenosis. *Am J Cardiol.* 2011;108(11):1589-99.
33. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, Gerds E, Gohlke-Bärwolf C, Holme I, Kesäniemi YA, Malbecq W, Nienaber CA, Ray S, Skjaerpe T, Wachtell K, Willenheimer R, Investigators S. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2008;359(13):1343-56.
34. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J, Investigators A. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation.* 2010;121(2):306-14.
35. Teo KK, Corsi DJ, Tam JW, Dumesnil JG, Chan KL. Lipid lowering on progression of mild to moderate aortic stenosis: meta-analysis of the randomized placebo-controlled clinical trials on 2344 patients. *Can J Cardiol.* 2011;27(6):800-8.
36. Ngo DT, Sverdlow AL, Horowitz JD. Prevention of aortic valve stenosis: a realistic therapeutic target? *Pharmacol Ther.* 2012;135(1):78-93.
37. Cribier A. Development of transcatheter aortic valve implantation (TAVI): a 20-year odyssey. *Arch Cardiovasc Dis.* 2012;105(3):146-52.
38. Cribier AG. The Odyssey of TAVR from concept to clinical reality. *Tex Heart Inst J.* 2014;41(2):125-30.
39. Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, Tuzcu EM, Webb JG, Fontana GP, Makkar RR, Brown DL, Block PC, Guyton RA, Pichard AD, Bavaria JE, Herrmann HC, Douglas PS, Petersen JL, Akin JJ, Anderson WN, Wang D, Pocock S, Investigators PT. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *N Engl J Med.* 2010;363(17):1597-607.
40. Reardon MJ, Van Mieghem NM, Popma JJ, Kleiman NS, Søndergaard L, Mumtaz M, Adams DH, Deeb GM, Maini B, Gada H, Chetcuti S, Gleason T, Heiser J, Lange R, Merhi W, Oh JK, Olsen PS, Piazza N, Williams M, Windecker S, Yakubov SJ, Grube E, Makkar R, Lee JS, Conte J, Vang E, Nguyen H, Chang Y, Mugglin AS, Serruys PW, Kappetein AP, Investigators S. Surgical or Transcatheter Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients. *N Engl J Med.* 2017;376(14):1321-31.
41. Leon MB, Smith CR, Mack MJ, Makkar RR, Svensson LG, Kodali SK, Thourani VH, Tuzcu EM, Miller DC, Herrmann HC, Doshi D, Cohen DJ, Pichard AD, Kapadia S, Dewey T, Babaliaros V, Szeto WY, Williams MR, Kereiakes D, Zajarias A, Greason KL,

- Whisenant BK, Hodson RW, Moses JW, Trento A, Brown DL, Fearon WF, Pibarot P, Hahn RT, Jaber WA, Anderson WN, Alu MC, Webb JG, Investigators P. Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients. *N Engl J Med.* 2016;374(17):1609-20.
42. Mack MJ, Leon MB, Thourani VH, Makkar R, Kodali SK, Russo M, Kapadia SR, Malaisrie SC, Cohen DJ, Pibarot P, Leipsic J, Hahn RT, Blanke P, Williams MR, McCabe JM, Brown DL, Babaliaros V, Goldman S, Szeto WY, Genereux P, Pershad A, Pocock SJ, Alu MC, Webb JG, Smith CR, Investigators P. Transcatheter Aortic-Valve Replacement with a Balloon-Expandable Valve in Low-Risk Patients. *N Engl J Med.* 2019;380(18):1695-705.
43. Herzbericht Deutschland 2016 <https://www.dgthg.de/de/node/304>: Deutsche Gesellschaft für Thorax- Herz- und Gefäßchirurgie; 2017 [<https://www.dgthg.de/de/node/304>], abgerufen am 01.09.2019.
44. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014;2(1):1.
45. Kasten FH. Paul Ehrlich: pathfinder in cell biology. 1. Chronicle of his life and accomplishments in immunology, cancer research, and chemotherapy. *Biotech Histochem.* 1996;71(1):2-37.
46. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-80.
47. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527-34.
48. Mobley JL, Leininger M, Madore S, Baginski TJ, Renkiewicz R. Genetic evidence of a functional monocyte dichotomy. *Inflammation.* 2007;30(6):189-97.
49. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F, Habenicht AJ, Ziegler-Heitbrock L, Randolph GJ. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood.* 2010;115(3):e10-9.
50. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011;118(5):e16-31.

51. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):41-57.
52. Zawada AM, Rogacev KS, Schirmer SH, Sester M, Böhm M, Fliser D, Heine GH. Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology.* 2012;217(12):1273-84.
53. Zawada AM, Zhang L, Emrich IE, Rogacev KS, Krezdorn N, Rotter B, Fliser D, Devaux Y, Ziegler-Heitbrock L, Heine GH. MicroRNA profiling of human intermediate monocytes. *Immunobiology.* 2017;222(3):587-96.
54. Zhao C, Zhang H, Wong WC, Sem X, Han H, Ong SM, Tan YC, Yeap WH, Gan CS, Ng KQ, Koh MB, Kourilsky P, Sze SK, Wong SC. Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *J Proteome Res.* 2009;8(8):4028-38.
55. Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, Aljama P, Ramirez R, Carracedo J. Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J Immunol.* 2011;186(3):1809-15.
56. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, Bigley V, Flavell RA, Gilroy DW, Asquith B, Macallan D, Yona S. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med.* 2017;214(7):1913-23.
57. Tanaka T. *Encyclopedia of Immunobiology*: Elsevier Ltd. ; 2016.
58. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem.* 2005;280(2):1336-45.
59. Diehl P, Nagy F, Sossong V, Helbing T, Beyersdorf F, Olschewski M, Bode C, Moser M. Increased levels of circulating microparticles in patients with severe aortic valve stenosis. *Thromb Haemost.* 2008;99(4):711-9.
60. Christensen JE, Andreasen SO, Christensen JP, Thomsen AR. CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8(+) T cells and memory cells. *Int Immunol.* 2001;13(4):593-600.
61. van Oostrom AJ, van Wijk JP, Sijmonsma TP, Rabelink TJ, Castro Cabezas M. Increased expression of activation markers on monocytes and neutrophils in type 2 diabetes. *Neth J Med.* 2004;62(9):320-5.

62. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138(5 Pt 2):S419-20.
63. Wang R, Chen W, Ma Z, Li L, Chen X. M1/M2 macrophages and associated mechanisms in congenital bicuspid aortic valve stenosis. *Exp Ther Med.* 2014;7(4):935-40.
64. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt JU. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015;16(3):233-70.
65. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, Jung B, Otto CM, Pellikka PA, Quiñones M, Echocardiography ASo, Echocardiography EAo. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *J Am Soc Echocardiogr.* 2009;22(1):1-23; quiz 101-2.
66. Rahman M. Introduction to Flow Cytometry: AbD serotec; 2009.
67. Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. Dritte Edition ed: John Wiley and Sons; 1995.
68. Bio-Rad Laboratories I. Flow Cytometry Basics Guide. Bulletin 6636 Ver C.
69. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, Große-Dunker G, Heisel I, Hornof F, Jeken J, Rebling NM, Ulrich C, Scheller B, Böhm M, Fliser D, Heine GH. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(16):1512-20.
70. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, Heine GH. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood.* 2011;118(12):e50-61.
71. Brunner E, Domhof S, Langer F. Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. 1st ed New York: Wiley. 2002; :187-210.
72. Brunner E, Domhof S, Langer F. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. Wiley: 1st ed. New York: Wiley,; 2002.

73. Tallone T, Turconi G, Soldati G, Pedrazzini G, Moccetti T, Vassalli G. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4(2):211-9.
74. Hofer TP, Zawada AM, Frankenberger M, Skokann K, Satz AA, Gesierich W, Schuberth M, Levin J, Danek A, Rotter B, Heine GH, Ziegler-Heitbrock L. slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation. *Blood.* 2015;126(24):2601-10.
75. Lo SC, Lee WJ, Chen CY, Lee BC. Intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte predicts severe coronary stenosis and extensive plaque involvement in asymptomatic individuals. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2017;33(8):1223-36.
76. Yamamoto H, Yoshida N, Shinke T, Otake H, Kuroda M, Sakaguchi K, Hirota Y, Toba T, Takahashi H, Terashita D, Uzu K, Tahara N, Shinkura Y, Kuroda K, Nagasawa Y, Nagano Y, Tsukiyama Y, Yanaka KI, Emoto T, Sasaki N, Yamashita T, Ogawa W, Hirata KI. Impact of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes on coronary plaque vulnerability assessed by optical coherence tomography in coronary artery disease patients. *Atherosclerosis.* 2018;269:245-51.
77. Yoshida N, Yamamoto H, Shinke T, Otake H, Kuroda M, Terashita D, Takahashi H, Sakaguchi K, Hirota Y, Emoto T, Amin HZ, Mizoguchi T, Hayashi T, Sasaki N, Yamashita T, Ogawa W, Hirata KI. Impact of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes on plaque vulnerability in diabetic and non-diabetic patients with asymptomatic coronary artery disease: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2017;16(1):96.
78. Wildgruber M, Aschenbrenner T, Wendorff H, Czubba M, Glinzer A, Haller B, Schiemann M, Zimmermann A, Berger H, Eckstein HH, Meier R, Wohlgemuth WA, Libby P, Zerneck A. The "Intermediate" CD14. *Sci Rep.* 2016;6:39483.
79. Wildgruber M, Czubba M, Aschenbrenner T, Wendorff H, Hapfelmeier A, Glinzer A, Schiemann M, Zimmermann A, Eckstein HH, Berger H, Wohlgemuth WA, Meier R, Libby P, Zerneck A. Increased intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes subset levels associate with restenosis after peripheral percutaneous transluminal angioplasty. *Atherosclerosis.* 2016;253:128-34.
80. Libby P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(18):2278-89.
81. Nadlonek N, Lee JH, Reece TB, Weyant MJ, Cleveland JC, Meng X, Fullerton DA. Interleukin-1 Beta induces an inflammatory phenotype in human aortic valve interstitial cells through nuclear factor kappa Beta. *Ann Thorac Surg.* 2013;96(1):155-62.

82. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kiliç R, Sarikoç A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, Borggreffe M. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. 2003;170(2):205-11.
83. Lee JH, Meng X, Weyant MJ, Reece TB, Cleveland JC, Fullerton DA. Stenotic aortic valves have dysfunctional mechanisms of anti-inflammation: implications for aortic stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;141(2):481-6.
84. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 2011;12(3):204-12.
85. Ikeda U, Matsui K, Murakami Y, Shimada K. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol*. 2002;25(4):143-7.
86. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007;117(4):902-9.
87. Mandl M, Schmitz S, Weber C, Hristov M. Characterization of the CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte population in human bone marrow. *PLoS One*. 2014;9(11):e112140.
88. Yu H, Zeng Y, Hu J, Li C. Fluid shear stress induces the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2002;26(3):199-207.
89. Aoki T, Yamamoto K, Fukuda M, Shimogonya Y, Fukuda S, Narumiya S. Sustained expression of MCP-1 by low wall shear stress loading concomitant with turbulent flow on endothelial cells of intracranial aneurysm. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):48.
90. Van Craenenbroeck AH, Van Ackeren K, Hoymans VY, Roeykens J, Verpooten GA, Vrints CJ, Couttenye MM, Van Craenenbroeck EM. Acute exercise-induced response of monocyte subtypes in chronic heart and renal failure. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:216534.
91. Kastellanos SS, Toumpoulis IK, Aggeli C, Zezas S, Chlapoutakis E, Kastellanos S, Stefanadis CI. Time course of C-reactive protein, tumour necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 following the surgical treatment of patients with aortic valve stenosis. *Hellenic J Cardiol*. 2007;48(1):5-14.

92. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ, Group CT. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1119-31.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sebastian Chi-Diep Au, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
Monozytensubpopulationen bei Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose,
Monocyte Subpopulations in Patients with Severe Aortic Valve Stenosis selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

13.10.2020

Datum

Unterschrift

9 Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

B Hewing, **SCD Au**, A Ludwig, R Ellerbroek, P van Dijck, L Hartmann, H Grubitzsch, C Giannini, M Laule, V Stangl, G Baumann, K Stangl

Titel: Severe aortic valve stenosis is associated with increased levels of intermediate monocytes.

Journal of Cardiovascular Translational Research, Februar 2017

Das Projekt basiert auf den Ideen von Herrn PD Dr. med. Bernd Hewing und Prof. Dr. med. Karl Stangl.

Sebastian Au war folgend beteiligt: Mitarbeit bei der Konzeption des Projektes, Studienplanung, Erarbeitung der Ein- und Ausschlusskriterien sowie Erstellen der Protokolle und Fragebögen zur Patientenrekrutierung. Angeleitete und selbstständige Durchführung der Vorversuche, Auswahl der Materialien, Etablierung der laborchemischen Methodik, größter Anteil der Patientenrekrutierung, größter Anteil der Monozytenmessungen und Erfassung der klinischen und laborchemischen Daten. Entscheidender Anteil bei der Konzeption und der Durchführung der Datenanalyse, Mitarbeit bei der statistischen Auswertung, entscheidender Anteil bei der Dateninterpretation, entscheidender Anteil bei der wissenschaftlichen Diskussion sowie der Verfassung und der Korrekturen des Textteils des Manuskriptentwurfs. Mitarbeit bei der Erstellung der Grafiken und Tabellen. Mitbearbeitung der Revisionsvorschläge.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischer Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischer Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Publikationsliste

1. B Hewing, **SCD Au**, A Ludwig, R Ellerbroek, P van Dijck, L Hartmann, H Grubitzsch, C Giannini, M Laule, V Stangl, G Baumann, K Stangl
Severe aortic valve stenosis is associated with increased levels of intermediate monocytes.
Journal of Cardiovascular Translational Research, Februar 2017
2. B Hewing, R Ellerbroek, **SCD Au**, V Stangl, H Dreger, M Laule, H Grubitzsch, F Knebel, G Baumann, A Ludwig, K Stangl
Levels of Circulating Intermediate Monocytes Decrease after Aortic Valve Replacement in Patients with Severe Aortic Stenosis.
Thrombosis and Haemostasis, Dezember 2017

Posterpräsentationen

1. American Heart Association (AHA) – Scientific sessions 2014 in Chicago, USA:
B Hewing, **SCD Au**, A Ludwig, V Stangl, G Baumann, K Stangl
Monocyte Subsets in Patients with Severe Aortic Valve Stenosis Undergoing TAVI
2. European Society of Cardiology (ESC) – EuroPREvent 2015 in Lissabon, Portugal:
SCD Au, A Ludwig, V Stangl, G Baumann, K Stangl, B Hewing
P850: Monocyte subsets in patients with severe aortic valve stenosis undergoing TAVI

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Bernd Hewing für die Überlassung des Themas, seine tatkräftige Unterstützung und die wissenschaftliche Betreuung. Er hat mich in die wissenschaftliche Arbeit eingeführt, und mir die Möglichkeit des Einstiegs in die Welt der Kardiologie und der kardiologischen Forschung ermöglicht und somit auch meine weitere berufliche Laufbahn mitgeprägt. Zudem danke ich Frau Dr. Antje Ludwig für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit, Einführung in der laborchemischen Methodik und ihre stets konstruktive und wertvolle Kritik, sowie ihre hilfreichen Anregungen.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl, Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl und Herrn Prof. Dr. med. Gert Baumann für die Möglichkeit, im kardiologischen Forschungslabor CCR der Medizinischen Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin zu arbeiten. Ebenfalls sei dem gesamten Team der AG Stangl des CCRs gedankt, das die Rahmenbedingungen für die Laborarbeit großzügig angelegt hat, und mir mit großer Expertise und Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Besonders danke ich auch Frau Urte Lemma für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Patientenrekrutierung.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Chi Lan und Diep Thanh, die nicht nur mir mein Studium und meine Dissertation ermöglicht haben, sondern auch jederzeit eine große moralische Stütze waren. Herzlichst danke ich meiner Ehefrau Lisa Au: Ohne deinen Optimismus, deine Motivation, deine Geduld und deine Liebe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.