

Aus der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäß-Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schäfers

Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

Histomorphologische Charakterisierung dilatierter und nicht-dilatierter Aortenwand bei unikuspider Aortenklappenmorphologie im Vergleich zur Aorta bei trikuspider Aortenklappe

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der **Universität des Saarlandes***

2021

Vorgelegt von Federspiel, Jan Michael geboren am 23/06/1994 in Bonn

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
1 Zusammenfassung	9
1.1 Deutschsprachige Zusammenfassung	9
1.1.1 Hintergründe	9
1.1.2 Fragestellung	9
1.1.3 Material und Methoden	10
1.1.4 Ergebnisse	10
1.1.5 Schlussfolgerung	10
1.2 Englischsprachige Zusammenfassung	11
1.2.1 Background	11
1.2.2 Objectives	11
1.2.3 Material and methods	12
1.2.4 Results	12
1.2.5 Conclusion	12
2 Einleitung	13
2.1 Anatomische Grundlagen	13
2.2 Terminologie der Aortenaneurysmen	14
2.3 Klinische Bedeutung und Epidemiologie	15
2.4 Ätiologie	15
2.5 Fehlbildungen der Aortenklappe und Aortenaneurysmen	17
2.5.1 Normale Anatomie der Aortenklappe und Fehlbildungen	17
2.5.2 Aortenaneurysmen bei kongenitaler Fehlbildung der Aortenklappe	18
2.5.3 Pathophysiologie der Aneurysmenbildung bei Fehlbildung der Aortenklappe	18
2.5.3.1 Die endotheliale Stickoxidsynthese	19
2.5.3.2 Apoptose in der Aortenwand	20
2.6 Fragestellung	20

3	Material und Methoden	21
3.1	Proben- und Datengewinnung	21
3.2	Auswahl und Etablierung der Methoden	22
3.3	Aufarbeitung des Gewebes	24
3.3.1	Vorbereitung für die Färbungen	24
3.3.2	Standardfärbungen	25
3.3.3	Immunhistochemien	25
3.4	Mikroskopie und Befundung	27
3.4.1	Verwendete Geräte und Software	27
3.4.2	Morphometrie	27
3.4.3	Analyse der VV und der eNOS	27
3.4.3.1	Analyse der VV	27
3.4.3.	Analyse der eNOS	28
3.4.4	Histomorphologische Analyse der Aorta ascendens	29
3.4.5	Analyse der Immunhistochemie zum Nachweis der gespaltenen Caspase 3	32
3.5	Statistik	33
3.5.1	Subanalyse junger Individuen	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Analyse klinischer Daten	35
4.2	Auswertbarkeit der mikroskopischen Analysen	36
4.3	Ergebnisse der Morphometrie	37
4.4	Analyse der VV und der eNOS	37
4.4.1	Analyse der morphologisch abgrenzbaren VV	37
4.4.2	Analyse der okkulten VV	40
4.4.3	Analyse der eNOS-Positivität	43
4.5	Analyse der Immunhistochemie zum Nachweis der gespaltenen Caspase 3	45
4.6	Analyse des SMC-Kernverlustes	47
4.7	Analyse der MEMA	48
4.8	Subanalyse junger Individuen	52
4.8.1	Subanalyse junger Individuen: Vergleich der Aorta bei UAV und TAV ohne Betrachtung des Dilatationsstatus	54

4.8.2	Subanalyse junger Individuen: Vergleich dilatierter und nicht-dilatierter Aorten ohne Betrachtung der Klappenmorphologie	57
4.8.3	Subanalyse junger Individuen: Vergleich dilatierter Aorten bei UAV und TAV	58
5	Diskussion	60
5.1	Hintergründe und Diskussion der Ergebnisse	60
5.1.1	Vasa vasorum	60
5.1.2	Endotheliale Stickoxidsynthese	61
5.1.3	SMC-Kernverlust und Apoptose	63
5.1.4	Mukoide extrazelluläre Matrixakkumulation	63
5.2	Beantwortung der Fragestellung	65
5.2.1	Unterscheiden sich Aorten bei UAV und TAV hinsichtlich der VV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?	65
5.2.2	Unterscheidet sich die Verteilung der eNOS in Aorten von Individuen mit UAV und TAV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?	65
5.2.3	Gibt es Unterschiede im Auftreten von Apoptose in der Aorta von Individuen mit UAV und TAV?	66
5.2.4	Bestehen Unterschiede zwischen Aorten bei UAV und TAV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus hinsichtlich des SMC-Kernverlustes?	66
5.2.5	Gibt es Unterschiede hinsichtlich der MEMA in der Aortenwand von Individuen mit UAV und TAV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?	67
5.3	Methodendiskussion und Limitationen	68
5.3.1	Einfluss des Untersuchers auf die Untersuchung	68
5.3.2	Einfluss der Probengewinnung und des Gewebes auf die Untersuchung	68
5.3.3	Einfluss der gewählten Methodik auf die Untersuchung	69
5.3.4	Einfluss der Statistik auf die Untersuchung	71
5.4	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	72
6	Literaturverzeichnis	74

7	Publikationen und Dank	85
7.1	Publikationen	85
7.2	Danksagung	85
8	Lebenslauf	88
	Appendix	91
I	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	92
II	Alcian-blau-Färbung	93
III	Elastica-Hämatoxylin-Eosin-Färbung	94
IV	Toluidin-Färbung	95
V	Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung	95
VI	CD31-Immunhistochemie	97
VII	eNOS-Immunhistochemie	98
VIII	Immunhistochemie zum Nachweis gespaltener Caspase 3	99

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Englisch: Avidin-Biotin-Complex; Deutsch: Avidin-Biotin-Komplex
ACTA2	Englisch: Actin alpha 2; Deutsch: Aktin alpha 2
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BAV	Englisch: Bicuspid aortic valve; Deutsch: Bikuspidale Aortenklappe
CD31	Cluster of Differentiation 31
DAB	3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
eNOS	Englisch: Endothelial nitric oxide synthase; Deutsch: Endotheliale Stickoxidsynthase
FBN-1	Fibrillin-1
H₂O₂	Chemische Formel von Wasserstoffperoxid
MEMA	Mukoide extrazelluläre Matrixakkumulation
mRNA	Englisch: Messenger ribonucleic acid; Deutsch: Messenger Ribonukleinsäure
NGS	Englisch: Normal Goat Serum; Deutsch: Normal-Serum aus der Ziege
PBS	Englisch: Phosphate buffered saline; Deutsch: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
ROI	Englisch: Region of Interest; Deutsch: Für die Untersuchung interessante Region
SD	Englisch: Standard deviation; Deutsch: Standardabweichung
SMC	Englisch: Smooth muscle cell; Deutsch: Glatte Muskelzelle
TAV	Englisch: Tricuspid aortic valve; Deutsch: Trikuspidale Aortenklappe
UAV	Englisch: Unicuspid aortic valve; Deutsch: Unikuspidale Aortenklappe
VV	Vas(a) vasorum

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Graduierung histomorphologischer Parameter	32
Tabelle 2	Übersicht der klinischen Daten	35
Tabelle 3	Auswertbarkeit nach durchgeführter statistischer Analyse	36
Tabelle 4	Durchschnittliche Anschnittfläche nach Gruppe	37
Tabelle 5	Analyse okkultur VV	42
Tabelle 6	Analyse von Zellen mit Nachweis gespaltener Caspase 3	46
Tabelle 7	Klinische Daten zur Subanalyse junger Individuen	53
Tabelle 8	Vergleich dilatierter Aorten von Individuen mit UAV und TAV in der Subanalyse junger Individuen	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Beurteilung des Schweregrades histomorphologischer Parameter	30
Abbildung 2	Beurteilung der Ausdehnung histomorphologischer Parameter	31
Abbildung 3	Balkendiagramm zur Eindringtiefe morphologisch abgrenzbarer VV	39
Abbildung 4	Morphologisch abgrenzbares VV in der sub-intimalen Tunica media	40
Abbildung 5	Okkulte VV tief in der Tunica media	41
Abbildung 6	eNOS-positive SMC	43
Abbildung 7	eNOS-positive aortale Tunica intima	44
Abbildung 8	eNOS-positives VV	45
Abbildung 9	Zellen mit Nachweis von gespaltener Caspase 3	47
Abbildung 10	Balkendiagramm zur Ausdehnung des SMC Kernverlustes nach Gruppe	48
Abbildung 11	Schwere und weit ausgedehnte MEMA	49
Abbildung 12	Balkendiagramm zu den MEMA Subtypen nach Gruppe	50
Abbildung 13	Balkendiagramm zur MEMA Ausdehnung nach Gruppe	51
Abbildung 14	Balkendiagramm zum MEMA Schweregrad nach Gruppe	52
Abbildung 15	Balkendiagramm zur MEMA-Ausdehnung nach Klappenmorphologie in der Subanalyse junger Individuen	55
Abbildung 16	Balkendiagramm zum MEMA-Schweregrad nach Klappenmorphologie in der Subanalyse junger Individuen	56
Abbildung 17	Boxplot zur Anzahl apoptotischer Zellen pro mm ² nach Aortenklappenmorphologie	57
Abbildung 18	Balkendiagramm zum MEMA-Schweregrad im Vergleich dilatierter Aorten von Individuen mit TAV und UAV in der Subanalyse junger Individuen	59
Abbildung 19	Sampling-Ebenen und ihr Einfluss auf die Varianz	69
Abbildung 20	Immunhistochemie mit einem Sekundärantikörper mit gekoppelter Peroxidase	70
Abbildung 21	Immunhistochemie in ABC-Technik	71

1 Zusammenfassung

1.1 Deutschsprachige Zusammenfassung

1.1.1 Hintergründe

Fehlbildungen der Aortenklappe sind mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Aneurysmen der Aorta ascendens assoziiert. Ein Großteil der dazu verfügbaren Daten stammt aus der Analyse von Aorten von Individuen mit bikuspidaler Aortenklappe. Dies ist dadurch begründet, dass es sich bei der bikuspidalen Aortenklappe um die häufigste angeborene Fehlbildung des Herzens handelt. Deutlich seltener ist eine sogenannte unikuspidale Aortenklappe. Weniger Daten zu Aorta ascendens Aneurysmen bei unikuspidaler Aortenklappe sind verfügbar. Basierend auf alten Studien gilt die Degeneration der Aorta ascendens in Assoziation mit der unikuspidalen Aortenklappe als ein relevanter Risikofaktor für Aortendissektionen.

1.1.2 Fragestellung

Folgende Fragestellung wurde bearbeitet: (1) Unterscheiden sich Aorten bei unikuspidaler und trikuspidaler Aortenklappe hinsichtlich der VV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus? (2) Unterscheidet sich die Verteilung der endothelialen Stickoxidsynthase in Aorten von Individuen mit unikuspidaler und trikuspidaler Aortenklappe unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus? (3) Gibt es Unterschiede im Auftreten von Apoptose in der Aorta von Individuen mit unikuspidaler und trikuspidaler Aortenklappe? (4) Bestehen Unterschiede zwischen Aorten bei unikuspidaler und trikuspidaler Aortenklappe unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus hinsichtlich des Kernverlustes glatter Muskelzellen? (5) Gibt es Unterschiede hinsichtlich der mukoiden extrazellulären Matrixakkumulation in der Aortenwand von Individuen mit unikuspidaler und trikuspidaler Aortenklappe unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?

1.1.3 Material und Methoden

Nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission, Aufklärung und schriftlicher Einwilligung erfolgte im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe an der Aortenklappe und / oder der Aorta ascendens die Entnahme von Gewebeproben aus der Aorta ascendens. Insgesamt wurden 74 Individuen in die vorliegende Studie eingeschlossen. Davon hatten 25 Individuen eine unikuspide Aortenklappe. Es dienten 49 Aorten, von Individuen mit trikuspider Aortenklappe als Vergleich. Es erfolgte eine feingewebliche Untersuchung des Aortengewebes mit Standardfärbungen und Immunhistochemien.

1.1.4 Ergebnisse

Im Zusammenhang mit Dilatation der Aorta ascendens beobachtete man ein tieferes Einwachsen der Vasa vasorum in die Aortenwand. Die relative Anzahl von Zellen mit dem Nachweis der endothelialen Stickoxidsynthase in der Tunica intima und den Vasa vasorum war vergleichbar. Außerdem lag bei aneurysmatischen Aorten weiter verbreiteter Kernverlust glatter Muskelzellen vor. Hinsichtlich der mukoiden extrazellulären Matrixakkumulation zeigten dilatierte Aorten signifikant schwerere und ausgedehntere Befunde. Betrachtet man die Aortenklappenmorphologie, so beobachtete man bei unikuspider Aortenklappe signifikant mehr apoptotische Zellen pro mm². Interessanterweise zeigten Individuen mit trikuspider Aortenklappe eine schwerwiegendere Degeneration der Aorta ascendens als Individuen mit unikuspider Aortenklappe.

1.1.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie suggerieren, dass das Einwachsen der Vasa vasorum in die Aortenwand Teil der Kompensationsmechanismen bei Degeneration der Gefäßwand ist. Ferner implizieren die Befunde, dass die Vasa vasorum die Hauptlokalisierung der endothelialen Stickoxidsynthase in der Aortenwand sind. Außerdem wurde die Apoptose als möglicherweise relevanter Prozess in der Pathophysiologie der Degeneration der Aorta ascendens bei unikuspider Anlage der Aortenklappe identifiziert. Weiter zeigten

nicht Aorten von Individuen mit unikuspider Aortenklappe, sondern Aorten von Individuen mit trikuspider Aortenklappe histologische Merkmale einer aggressiven und schwerwiegenden Degeneration. Somit scheint die Degeneration der Aorta ascendens in Assoziation mit einer unikuspiden Aortenklappe weniger aggressiv als bisher angenommen.

1.2 Englischsprachige Zusammenfassung

1.2.1 Background

Malformation of the aortic valve is associated with ascending aortic aneurysm formation. A large amount of data on this topic was generated by analyzing individuals with bicuspid aortic valve with the bicuspid aortic valve being the most frequent cardiac malformation. Compared to the bicuspid aortic valve the unicuspid aortic valve is a rare cardiac malformation. Thus, little is known on ascending aortic degeneration and associated aneurysm formation in this entity. Based on older trials ascending aortic degeneration in association with a unicuspid aortic valve is believed to be a relevant risk factor for aortic dissections.

1.2.2 Objectives

Following objectives were analyzed: (1) Differ aortas in presence of unicuspid and tricuspid aortic valve regarding the vasa vasorum under consideration of the dilatation status? (2) Are there differences in the distribution of the endothelial nitric oxide synthase within the aortic wall of individuals with unicuspid and tricuspid aortic valve with regard of the dilatation status? (3) Differ aortas from individuals with unicuspid and tricuspid aortic valve regarding the abundance of apoptosis? (4) Do aortas with unicuspid and tricuspid aortic valve morphology differ regarding smooth muscle cell nuclei loss considering the dilatation status? (5) Does mucoid extracellular matrix accumulation differ in aortas of individuals with unicuspid and tricuspid aortic valve under consideration of the aortic width?

1.2.3 Material and methods

After approval by the local ethics committee and written informed consent of the patients ascending aortic tissue during surgery of the ascending aorta and/or the aortic valve was obtained. Overall 74 individuals were included in this analysis. Of these, 25 individuals had unicuspid aortic valve morphology. The tissue of 49 individuals with a tricuspid aortic valve served as control. Histological analysis were performed using standard stains and immunohistochemistry.

1.2.4 Results

Deeper ingrowth of the vasa vasorum was observed in association with aortic dilatation. Regarding the distribution of the endothelial nitric oxide synthase the relative number of cells expressing the endothelial nitric oxide synthase was comparable between the tunica intima and the vasa vasorum. Dilated aortas presented with significantly more smooth muscle cell nuclei loss. In addition, dilated aortas had significantly more widespread and more severe mucoid extracellular matrix accumulation. Regarding aortic valve morphology, aortas from individuals with unicuspid aortic valve morphology had significantly more apoptotic cells per mm². Interestingly, aortas from individuals with a tricuspid aortic valve showed significantly more severe aortic degeneration than aortas from individuals with a unicuspid aortic valve.

1.2.5 Conclusion

The data presented suggest ingrowth of the vasa vasorum to be part of compensatory mechanisms in the degeneration of the aortic wall. Further, it is implicated that the vasa vasorum seems to be the main localization of the endothelial nitric oxide synthase within the aortic wall. In addition, apoptosis seems to be relevant in the aortic wall degeneration in association with unicuspid aortic valve morphology. Interestingly aortas from individuals with a tricuspid aortic valve instead of aortas from individuals with a unicuspid aortic valve showed signs of severe aortic degeneration. Thus, aortic wall changes in association with unicuspid aortic valve morphology seem to be more benign than generally assumed.

2 Einleitung

2.1 Anatomische Grundlagen

Die Aorta ist der Hauptstamm für eine Serie verschiedener Gefäße [1]. Sie wird unterteilt in einen thorakalen und einen abdominalen Anteil [1]. Der Übergang von linksventrikulärem Ausflusstrakt und Aorta ascendens wird gebildet durch die sogenannte Aortenwurzel [2]. Die Aortenwurzel dient als Aufhängung der Aortenklappe [3]. Aufgrund ihrer Form wird die Aortenwurzel auch als Aorten-Bulbus bezeichnet [4]. Diese Form ist bedingt durch die sogenannten Valsalva-Sinus [3], [5]. Dies sind Ausbuchtungen der Aortenwurzel, jeweils korrespondierend zu den einzelnen Taschen der Aortenklappe [3], [5]. Es wird angenommen, dass diese Sinus für einen stabilen Fluss in den Koronararterien verantwortlich sind [6]. Der Übergang der bauchigen Aortenwurzel auf die tubuläre Aorta ascendens wird als sinutubulärer Übergang bezeichnet [3]. Die Aorta ascendens geht dann in den Aortenbogen über [1]. Am sogenannten Aortenisthmus beginnt dann die deszendierende thorakale Aorta [1]. Ab dem Durchtritt durch das Zwerchfell spricht man von der Aorta abdominals [1]. Die vorliegende Arbeit setzte sich mit der Aorta ascendens auseinander.

Mikroskopisch lässt sich die Aorta (von innen nach außen) in die Tunica intima, die Tunica media und die Tunica adventitia gliedern [7].

Die Tunica intima umfasst unter anderem das Endothel und seine Basalmembran [7]. Sie dient der Abdichtung des Gefäßes und der Regulation der Gefäßweite [7]. Die Gefäßweite wird durch endotheliale Mediatoren wie das Endothelin oder das Stickstoffmonoxid beeinflusst [7].

Die Tunica media ist für die mechanischen Eigenschaften der Aorta verantwortlich [8]. Dabei ist die Tunica media aus den funktionellen Einheiten der Aortenwand aufgebaut [9], [10]. In der dreidimensionalen Ansicht bezeichnet man die funktionellen Einheiten als muskulo-elastische Faszikel [10]. In der zweidimensionalen feingeweblichen Darstellung werden die Einheiten als sogenannte "lamellare Einheiten" bezeichnet [9], [11].

Eine lamellare Einheit besteht aus elastischen Fasern, die einen Raum begrenzen [9]. Dieser Raum enthält glatte Muskelzellen (Englisch: smooth muscle cell; Abkürzung: SMC), Kollagen und Proteoglykan-reiche Grundsubstanz [9], [11]. Alle nicht zellulären Komponenten lassen sich auch als extrazelluläre Matrix zusammenfassen [7].

Die Tunica adventitia erfüllt unter anderem trophische Funktionen [7]. Sie führt die, die Gefäßwand versorgenden Vasa vasorum (Abkürzung: VV), Nerven und Lymphgefäße [7]. Der Hauptbestandteil der Tunica adventitia ist Kollagen [7]. Das Kollagen der Tunica adventitia trägt wesentlich zu den mechanischen Eigenschaften der Aorta bei [8].

VV sind kleine Gefäße, die physiologisch in der Wand großer Gefäße vorkommen [12]. Sie dienen der Nährstoffversorgung der Gefäßwand [12] und ergänzen die Versorgung per Diffusion aus dem Lumen des Gefäßes [7]. Typischerweise sind die VV in der Tunica adventitia lokalisiert [7], [11]. Physiologisch wachsen VV bis in das sub-adventitielle Drittel der Tunica media ein [11].

2.2 Terminologie der Aortenaneurysmen

Der Begriff Aneurysma beschreibt „lokale Ausweitungen einer Arterienwand“¹ [13]. Es wird zwischen echten Aneurysmen (Aneurysma verum) und falschen Aneurysmen (Aneurysma spurium) unterschieden [13]. Ein Aneurysma verum ist über folgende Kriterien definiert [14]:

- Es liegt eine lokalisierte, permanente Erweiterung einer Arterie vor [14].
- Die Erweiterung tritt segmental auf [14].
- Die gesamte Arterienwand ist betroffen [14].
- Die Aussackung vergrößert den Durchmesser des Gefäßes um mindestens 50 Prozent, verglichen mit dem normalen Durchmesser für das Gefäß [14].

Von Aneurysma verum und spurium abzugrenzen ist die Aortendissektion, welche teilweise auch als Aneurysma dissecans bezeichnet wird [13]. Bei einer Aortendissektion handelt es sich um eine Wühlblutung in der Aortenwand unter Ausbildung eines sogenannten Pseudolumens [13]. Aortendissektionen können theoretisch überall in der Aorta auftreten [13]. Sie werden üblicherweise nach Stanford klassifiziert [15]. Von einer Stanford Typ-A Dissektion wird bei Beteiligung der Aorta ascendens gesprochen [15]. Ansonsten liegt eine Dissektion vom Stanford Typ-B vor [15].

¹ [13]: U.-N. Riede und M. Werner, Hrsg., *Allgemeine und Spezielle Pathologie*, 2. Aufl. Springer.

Die vorliegende Arbeit setzte sich mit echten Aneurysmen der Aorta ascendens auseinander.

2.3 Klinische Bedeutung und Epidemiologie

Erweiterungen der Körperschlagader sind meist lange asymptomatisch [15] und manifestieren sich häufig erst durch Komplikationen mit hoher Mortalität [16]. Aorta ascendens Aneurysmen sind mit 57 Prozent die häufigste Form thorakaler Aortenaneurysmen [17], [18]. Damit errechnet sich eine Inzidenz von Aorta ascendens Aneurysmen von etwa 5,7 pro 100.000 pro Jahr [19]. Die Inzidenz hat sich seit 1980 etwa verdoppelt [19]. Dies ist auf verbesserte Bildgebungsverfahren, die zunehmende Alterung der Bevölkerung und den zunehmenden Einsatz transthorakaler Echokardiographie als Screening zurückzuführen [19].

In 95 Prozent der Fälle stellen Komplikationen die klinische Erstmanifestation eines Aortenaneurysmas dar [16]. Komplikationen von Aorta ascendens Aneurysmen sind Aortenklappeninsuffizienz [19], sowie Aortendissektion und Aortenruptur [16]. Das Risiko für Komplikationen steigt mit dem Durchmesser der Aorta [20] und der Wachstumsgeschwindigkeit des Aneurysmas [19] an. Ab einem Durchmesser von 6 cm liegt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Aortendissektion bei 6,9 Prozent [20]. Die Letalität einer Aortendissektion vom Stanford-Typ A beträgt 1 bis 2 Prozent pro Stunde ab dem Symptombeginn [21], [22]. Von den Betroffenen versterben etwa 12 bis 26 Prozent im Krankenhaus trotz chirurgischer Behandlung [23]–[25].

2.4 Ätiologie

Die Ursachen von Aorta ascendens Aneurysmen lassen sich in drei Gruppen gliedern [19]:

- Erworben [19]
- Hereditär [19]
- Kongenital [19]

Zur Gruppe erworbener Aorta ascendens Aneurysmen gehören beispielsweise Aneurysmen bei arterieller Hypertonie [19] oder Aneurysmen bei Autoimmunerkrankungen (zum Beispiel Riesenzell-Aortitis) [26].

Die Gruppe hereditärer Aorta ascendens Aneurysmen umfasst unter anderem Aneurysmen bei Vorliegen einer Bindegewebserkrankung [19]. Eine Erkrankung dieser Gruppe ist das sogenannte Marfan-Syndrom [27]. Dieses wurde erstmals 1869 beschrieben [28]. Die Prävalenz des Syndroms wird mit 1 zu 3000 bis hin zu 1 zu 5000 angegeben [29]. Das Syndrom ist bedingt durch Mutationen des Fibrillin-1 (FBN-1) Gens [27]. Etwa 25 Prozent der Fälle treten sporadisch auf [29]. Die Vererbung des Syndroms ist autosomal-dominant mit vollständiger Penetranz [29]. Circa 70 Prozent der betroffenen Individuen entwickeln bis zum 20. Lebensjahr ein relevantes Aortenaneurysma [30]. Dabei am häufigsten ist eine fortschreitende Erweiterung der Aortenwurzel [29]. Aneurysmen der Aorta ascendens mit Ihren Komplikationen sind die Haupttodesursache der Betroffenen [29].

Ein weiterer Teil der hereditären Aorta ascendens Aneurysmen wird durch die Gruppe der sogenannten familiären nicht-syndromalen Aneurysmen gebildet [27], [31]. Bei dieser Gruppe hereditärer Aneurysmen gibt es, anders als bei syndromalen Bindegewebserkrankungen, wie dem Marfan-Syndrom, keine typischen klinischen Stigmata [31]. In dieser Gruppe wurde beispielsweise das ACTA2-Gen (Englisch: Actin alpha 2; Deutsch: Aktin alpha 2) als eines der ursächlichen Gene identifiziert [27]. Mutationen dieses Gens sollen für bis zu 14 % der vererbten Aneurysmen verantwortlich sein [19]. Pathophysiologisch greift dieses Gen an den SMC an, da es für die schwere Kette des Myosins der glatten Muskulatur kodiert [19].

Zur Gruppe kongenitaler Aorta ascendens Aneurysmen zählen Aneurysmen in Assoziation mit angeborenen kardialen Fehlbildungen, wie beispielsweise der Fallot'schen Tetralogie oder Fehlbildungen der Aortenklappe [19].

In allen drei Gruppen von Aorta ascendens Aneurysmen kommt es zur Degeneration der Aortenwand [11], [19]. Dabei werden unter anderem Fragmentation oder Verlust der elastischen Fasern und SMC-Verlust beobachtet [11]. Außerdem kommt es zur pathologischen Akkumulation von Mukopolysacchariden [11]. Diese sind ein physiologischer Bestandteil der extrazellulären Matrix [7]. Vermehrte und so pathologische Ansammlungen dieser Substanz wurden früher unter anderem als „zystische Mediadegeneration“ bezeichnet [11]. Heute wird dieser Befund als mukoide extrazelluläre Matrixakkumulation (Abkürzung: MEMA) bezeichnet [11]. Je nach zugrundeliegender Ätiologie zeigen sich unterschiedliche histologische Befunde

besonders ausgeprägt [11]. So zeigt sich beispielsweise beim Marfan-Syndrom eine exzessive MEMA, welche die lamellaren Einheiten zerstört (sogenannte translamellare MEMA) [11].

Auch die VV sind relevant im Zusammenhang mit der Degeneration der Aortenwand [32], [33]. Tieferes Einwachsen der VV dient beispielsweise der Kompensation trophischer Störungen der Gefäßwand [11], [12], [34].

In dieser Arbeit wurden Aneurysmen im Zusammenhang mit Fehlbildungen der Aortenklappe untersucht.

2.5 Fehlbildungen der Aortenklappe und Aortenaneurysmen

2.5.1 Normale Anatomie der Aortenklappe und Fehlbildungen

Eine trikuspidale Aortenklappe (Englisch: tricuspid aortic valve; Abkürzung: TAV) stellt die anatomische Norm dar [1]. Bei ihr bestehen drei Kommissuren gleicher Höhe [3]. Diese grenzen drei Taschen voneinander ab [3]. Im Zusammenhang mit Aorta ascendens Aneurysmen relevante Fehlbildungen der Aortenklappe sind vor allem die häufige bikuspidale Aortenklappe (Englisch: bicuspid aortic valve; Abkürzung: BAV) [11], [27], [35] und die seltene unikuspidale Aortenklappe (Englisch: unicuspid aortic valve; Abkürzung: UAV) [36].

Die BAV besitzt zwei Taschen [37] und eine nicht vollständig ausgebildete Kommissur [37], [38]. Sie wird bei etwa 1 bis 2 Prozent der Menschen beobachtet [35]. Damit ist die BAV die häufigste kardiale Fehlbildung des Menschen [35].

Die UAV wiederum besitzt nur eine Tasche [36]. Anhand der Kommissuren unterscheidet man zwei Formen [36]. Die häufige unikommissurale Form (92 Prozent der Fälle) [39], [40] besitzt eine vollständig ausgebildete Kommissur [36]. Die seltenere akommissurale Form (8 Prozent der Fälle) [39], [40] besitzt keine vollausgebildete Kommissur [36]. Echokardiographische Studien in der Normalbevölkerung zeigten eine Prävalenz der UAV von 0,02 Prozent [38], [41]. Echokardiographisch sind UAV und BAV schwer zu unterscheiden [41]. Damit wird die UAV in ihrer Prävalenz wahrscheinlich in der Echokardiographie unterschätzt [42]. Dies wird durch Daten aus kardiochirurgischen

Studien unterstützt [43], [44]. So fand sich in etwa 5 Prozent der Individuen älter als 20 Jahre mit Aortenklappenstenose eine UAV [43], [44].

2.5.2 Aortenaneurysmen bei kongenitaler Fehlbildung der Aortenklappe

Bei Vorliegen einer BAV wurde eine höhere Rate an relevanter Dilatation im Vergleich mit der Normalbevölkerung mit TAV beschrieben [45]. Bis zu 60 Prozent der Individuen mit BAV entwickeln ein Aneurysma der Aorta ascendens [46]. Die Angaben zur Rate an Aneurysmen bei UAV schwanken stark [36], [47]. Für Erwachsene liegt die Häufigkeit an Aneurysmen zwischen 14 Prozent [36] und 60 Prozent [47]. Bei Vorliegen einer UAV kommt es auch zur Aneurysma-Bildung im Kindesalter [48]. Etwa 5 Prozent der Kinder mit UAV entwickeln eine Dilatation der Aorta [48].

Aortendissektionen als Komplikation der Aneurysmen treten bei Menschen mit TAV etwa in der sechsten Lebensdekade auf [49]. Bei Vorliegen einer BAV treten Aortendissektionen meist schon in der fünften Lebensdekade auf [49]. Aortendissektionen bei Vorliegen einer UAV treten bereits in der vierten Lebensdekade auf [49]. Daher gelten Fehlbildungen der Aortenklappe als Risikofaktor für Komplikationen der Aneurysmen [49]. In Autopsie-Studien wurde das Risiko für das Auftreten einer Aortendissektion bei BAV um das 9-fache höher als bei TAV beschrieben [49]. Bei UAV wurde das Risiko für eine Aortendissektion um das 18-fache erhöht beschrieben [49].

2.5.3 Pathophysiologie der Aneurysmenbildung bei Fehlbildung der Aortenklappe

Für die Entstehung von Aneurysmen der Aorta ascendens in Assoziation mit der BAV existieren verschiedene Theorien [50], [51]. Eine der Theorien rückt den im Vergleich zur TAV turbulenten und helikalen Fluss über eine BAV in den Fokus [50], [52], [53]. Dieser Fluss über die BAV soll eine erhöhte Belastung der Aortenwand bedingen [50], [54].

Eine andere Theorie befasst sich mit den intrinsischen Eigenschaften der Gefäßwand [50], [55], [56]. Diese Theorie wird unter anderem dadurch gestützt, dass auch der Ersatz

der bikuspiden Aortenklappe das Fortschreiten der Dilatation nicht unterbricht [57], [58], obwohl eine Normalisierung des Flusses anzunehmen ist. Durch diese Theorie könnten auch gleichzeitig beobachtete Veränderungen des Truncus pulmonalis bei Vorliegen einer BAV erklärt werden [59]. Denn beide Arterien entwickeln sich embryologisch aus einem Stamm, dem sogenannten Cono-Truncus [1], [59]. Auch genetische Unterschiede [60], [61] und Unterschiede in der Proteinzusammensetzung [56] der Aortenwand zwischen Individuen mit TAV und BAV wurden beobachtet und wären durch diesen Ansatz zu erklären.

Über die Ursachen der Dilatation der Aorta ascendens bei UAV ist deutlich weniger bekannt. Auch bei der UAV kann die Fluss-Theorie Anwendung finden, da die Stressverteilung in der Aortenwand bei BAV und UAV vergleichbar ist [47]. Auch die Theorie über intrinsische Veränderungen der Aortenwand lässt sich wahrscheinlich auf die UAV übertragen. Dies lässt sich unter anderem damit begründen, dass die histologischen Veränderungen der Aortenwand bei UAV, BAV und TAV gleichartig sind [47]. Allerdings treten diese Veränderungen der Aortenwand bei kongenitaler Fehlbildung früher im Leben auf [47]. Als häufige Befunde im Zusammenhang mit Fehlbildung der Aortenklappe gelten der SMC-Kernverlust und die MEMA [11].

2.5.3.1 Die endotheliale Stickoxidsynthase

Studien suggerieren bei BAV [61], [62] und UAV [63] eine pathophysiologische Relevanz der endothelialen Stickoxidsynthase (Englisch: Endothelial nitric oxide synthase; Abkürzung: eNOS) in der Bildung von Aorta ascendens Aneurysmen. Die eNOS ist am strukturellen Erhalt der Aortenwand beteiligt [64]. Beispielsweise trägt sie zum Erhalt der endothelialen Funktion bei, ist Teil der Anpassung der Gefäßwand auf Stress und ist beteiligt an der Regulation von Apoptose [62]. Dabei unterliegt die eNOS einer komplexen Regulation, unter anderem durch Pooling der messenger Ribonukleinsäure (Englisch: Messenger ribonucleic acid; Abkürzung: mRNA) [65].

Die Hinweise für die Relevanz der eNOS im Zusammenhang mit Aorta ascendens Aneurysmen bei UAV stammen aus einer mRNA-Quantifizierung homogenisierter Proben der Aortenwand [63]. Es wurde dabei eine signifikant höhere Expression der eNOS in Aorten von Individuen mit UAV, verglichen mit Aorten von Individuen mit TAV beobachtet [63]. Bedingt durch das Studiendesign ist nicht bekannt, welche Struktur innerhalb der Aortenwand Ursprung der erhöhten Expression der eNOS ist. Die eNOS

wird neben Endothelzellen auch von anderen Zellen, wie beispielsweise vaskulären SMCs exprimiert [66].

2.5.3.2 Apoptose in der Aortenwand

Apoptose ist ein Prozess des kontrollierten Zelltodes [67]. An der Regulation dieses Prozesses ist unter anderem die Enzymkaskade der sogenannten Caspasen beteiligt [67]. So kann der immunhistochemische Nachweis von gespaltener Caspase 3 zum Nachweis von Apoptose genutzt werden [67].

Die Apoptose ist für viele physiologische Prozesse (zum Beispiel Entwicklung in utero) und viele pathologische Prozesse (zum Beispiel Tumorentstehung) relevant [67]. Auch für die Bildung von Aorta ascendens Aneurysmen bei BAV konnte die pathophysiologische Relevanz der Apoptose gezeigt werden [68]. Entsprechende Daten zur UAV liegen nicht vor.

2.6 Fragestellung

Basierend auf der dargelegten Literatur wurde folgende Fragestellung für diese Arbeit definiert:

- Unterscheiden sich Aorten bei UAV und TAV hinsichtlich der VV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?
- Unterscheidet sich die Verteilung der eNOS in Aorten von Individuen mit UAV und TAV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?
- Gibt es Unterschiede im Auftreten von Apoptose in der Aorta von Individuen mit UAV und TAV?
- Bestehen Unterschiede zwischen Aorten bei UAV und TAV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus hinsichtlich des SMC-Kernverlustes?
- Gibt es Unterschiede hinsichtlich der MEMA in der Aortenwand von Individuen mit UAV und TAV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?

3 Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde mit Zustimmung der ständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Ethikantrag Nummer 47/14) durchgeführt. Folgende Einschlusskriterien für Patienten und Gewebe wurden definiert:

- Bei dem Patienten bestand die Indikation zu einer Herzoperation mit Notwendigkeit der Eröffnung der Aorta ascendens (z.B. Aortenklappenersatz, Aortenklappenrekonstruktion, Ersatz der Aorta ascendens, Ersatz der Aortenwurzel mit oder ohne Erhalt der Aortenklappe).
- Nach eingehender Beratung und Information schriftliche Einwilligung des Patienten in die Teilnahme an der Studie.
- Es bestand in Blutanalysen und klinisch kein Anhalt für eine chronische virale Erkrankung wie beispielsweise Hepatitis B, Hepatitis C oder eine Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus.
- Bei dem Patienten bestand kein klinischer Anhalt beziehungsweise keine Diagnose einer Bindegewebserkrankung, welche mit der Bildung von Aneurysmen einhergeht (beispielsweise Marfan-Syndrom, Ehlers-Danlos-Syndrom, Loeys-Dietz-Syndrom [27]).
- Im Bereich der Entnahmestelle (siehe Kapitel 3.1) zeigte sich intraoperativ keine Verkalkung und keine hochgradige Atherosklerose.

3.1 Proben- und Datengewinnung

In die vorliegende Studie wurden 74 Proben der Aorta ascendens eingeschlossen. Dabei erfolgte die Gruppierung der Proben nach Klappenmorphologie und Vorliegen einer Dilatation der Aorta ascendens (Gruppen: UAV dilatiert n=12; UAV nicht-dilatiert n=13; TAV dilatiert n=25; TAV nicht-dilatiert n= 24). Für diese Studie wurde eine Weite von mehr als 40 mm als Dilatation definiert, basierend auf gängigen Normwerten [69]. Aorten mit einem Diameter von ≤ 40 mm wurden entsprechend als nicht-dilatiert eingestuft. Dabei wurde die Weite des aortoventrikulären Übergangs, der Aortenwurzel, des sinutubulären Übergangs und der tubulären Aorta ascendens berücksichtigt. Zur Erfassung dieser Diameter wurde falls vorhanden die präoperative Computertomographie genutzt. War eine solche nicht indiziert, erfolgte die Messung der

aortalen Dimensionen in der intraoperativ routinemäßig durchgeführten transösophagealen Echokardiographie. Die Klappenmorphologie wurde intraoperativ bestimmt. Entsprechende Definitionen wurden in der Einleitung dieser Arbeit gegeben (siehe Kapitel 2.5.1). Akommissurale UAVs wurden in diese Studie nicht eingeschlossen.

Die Probenentnahme erfolgte intraoperativ bei Eingriffen an der Aortenklappe und/oder der Aorta ascendens. Die Entnahmestelle war standardisiert und an der anterioren Zirkumferenz etwa 5 bis 10 Millimeter oberhalb des sinutubulären Übergangs lokalisiert. Die gewonnenen Proben maßen je nach Größe der Aorta bis zu 2 Zentimeter in der Breite und etwa 5 Millimeter in der Höhe.

3.2 Auswahl und Etablierung der Methoden

Auswahl, Etablierung und Validierung der Methoden erfolgten unter Supervision eines Pathologen mit kardio-vaskulärem Schwerpunkt. Als Grundlage erfolgte ein Review der Literatur zur Pathologie der Aorta ascendens. Dabei wurden verschiedene Systeme zur histologischen Bewertung mit entsprechenden Parameter-Definitionen identifiziert [11], [34], [59], [70]–[72]. Weiter erfolgte basierend auf den Ergebnissen der Arbeitsgruppe eine Literaturrecherche zu den VV und der eNOS. Ziel war es ein Auswertesystem zu etablieren, dass es erlaubt die bisherigen Arbeiten der Gruppe auf mRNA und Proteinebene [63], [73], [74] auf histologischer Ebene weiter zu charakterisieren.

Nach Auswertung der Literaturrecherche wurde folgendes Färbe-Panel ausgewählt:

- Hämatoxylin-Eosin-Färbung
- Elastica-Hämatoxylin-Eosin-Färbung
- Alcian-blau-Färbung
- Toluidin-Färbung
- Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung
- eNOS-Immunhistochemie mit Hämalan-Färbung nach Meyer
- CD31-Immunhistochemie mit Hämalan-Färbung nach Meyer
- Gespaltene Caspase 3-Immunhistochemie mit Hämalan-Färbung nach Meyer

Die Auswahl der Färbungen erfolgte so, dass jeder Befund in einer anderen Färbung im Rahmen einer Selbstvalidierung überprüft werden konnte. Die Immunhistochemie der gespaltenen Caspase 3 bildete hiervon die einzige Ausnahme.

Die CD31-Immunhistochemie wurde eingeschlossen um die Verteilung der eNOS mit der Verteilung eines eher spezifischen Endothelmarkers [75] vergleichen zu können.

Zur Etablierung der Immunhistochemien wurden die vom Hersteller der Antikörper geforderten Gewebe zur Positivkontrolle genutzt. Da das intraoperativ gewonnene Aortengewebe nicht als normales Referenzgewebe betrachtet werden kann, erfolgte eine zusätzliche Positivkontrolle der eNOS- und CD31-Immunhistochemie am Gewebe aus dem Musculus rectus abdominis. Eine Negativkontrolle wurde sowohl mit Immunglobulin G, als auch Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (engl. Phosphate buffered saline; Abkürzung: PBS) durchgeführt. Mit unauffälliger doppelter Positiv- und Negativkontrolle wurde die Immunhistochemie für eNOS und CD31 als valide eingestuft. Die Ergebnisse der Standardfärbungen wurden durch den Pathologen validiert.

Nach Abschluss der Etablierung der Färbungen wurden 75 Aorten ohne Betrachtung der Aortenklappenmorphologie und der Dilatation nach den Ergebnissen der Literaturrecherche untersucht. Unter fortlaufender Mikroskopie wurden so schließlich die im folgenden vorgestellten Methoden zur Auswertung ausgewählt und etabliert.

Da es sich bei der Aortenwand um ein komplexes dreidimensionales Gebilde handelt, kann die räumliche Struktur der einzelnen Komponenten, vor allem der elastischen Fasern, zu einer Fehlbewertung des Gewebes führen. Um das räumliche Verständnis für die Aorta ascendens des Untersuchers zu fördern, wurden 13 porcine Aorten analysiert. Dieses porcine Gewebe wurde freundlicherweise unentgeltlich zur Verfügung gestellt vom Schlachthof der Firma Färber in Zweibrücken. Nach Formalin Fixierung und Paraffinierung wurde das Gewebe in 1 µm, 4 µm und in 8 µm Dicke geschnitten. Unter Nutzung des „optical dissector“ [76] konnte unter anderem der Verlauf der elastischen Fasern und die hieraus resultierenden Artefakte erfasst werden.

Zur endgültigen Validierung der histologischen Auswertung und der Prüfung der Reproduzierbarkeit wurde der Untersucher stichpunktartig von dem an dieser Studie beteiligten Pathologen und zusätzlich, als unabhängigem Untersucher, von einem Anatomen kontrolliert.

Erst nach Abschluss des Etablierungs- und Validierungsprozesses erfolgte die Auswertung des Studienkollektivs.

3.3 Aufarbeitung des Gewebes

3.3.1 Vorbereitung für die Färbungen

Um die Proben für die Untersuchung durch Lichtmikroskopie dauerhaft aufarbeiten zu können, ist eine Fixierung der Probe erforderlich [77]. In dieser Studie wurde eine chemische Immersionsfixierung mit 4 prozentigem, Phosphat-gepuffertem Formalin (Roti-Histofix, Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Bei Formalin handelt es sich um eine wässrige Lösung von Formaldehyd [77]. Hiermit kann auch in größeren Proben eine gute Fixierung von Form, Farbe und Struktur erzielt werden [77]. Dabei arbeitet Formalin über die Quervernetzung von Proteinen [78]. Die Einlage in die Fixierungslösung erfolgte unmittelbar nach Entnahme der Probe. Das Gewebe wurde über mindestens 24 Stunden fixiert.

Nach Abschluss der Fixierung wurden die Proben in Paraffin ausgeblockt. Die Proben wurden hinsichtlich der räumlichen Orientierung so ausgeblockt, dass in der Mikrotomie Transversalschnitte durch die Aorta entstanden. Im Rahmen des Schneideprozesses wurden die Mikrotome (Type CUT5062, Firma SLEE medical, Mainz, Deutschland und RM 2265 REF 14050338780, Firma Leica, Nußloch, Deutschland) auf eine Schnittdicke von einem Mikrometer eingestellt. Es wurden Serienschnitte erstellt. Die Serienschnitte wurden in zufälliger Reihenfolge auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin reduziert das Abschwimmen der Proben während des Färbeprozesses [79]. Wenn es die Größe der Probe erlaubte, wurden immer zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden über Nacht in einem Brutschrank mit einer Temperatur von 60 Grad Celsius eingelagert. Dies diente dem Abschmelzen des Paraffins und der Fixierung der Proben auf dem Objektträger.

Zur Vorbereitung auf die einzelnen Färbungen wurden die Proben zunächst mit Xylol entparaffiniert und anschließend mit Hilfe einer Alkoholreihe entwässert. Die Färbeprotokolle der einzelnen Färbungen sind dem Anhang dieser Arbeit beigelegt. Nach Beendigung der Färbung wurden die Schnitte unter Verwendung eines Einschlussmittels eingedeckt (Roti-Histokitt II, Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

3.3.2 Standardfärbungen

Bei einer histologischen Färbung bindet ein sich in Lösung befindlicher Farbstoff an definierte Strukturen im Gewebe [77]. Woran ein Farbstoff bindet, richtet sich nach den chemischen Eigenschaften des Gewebes [77]. Im Rahmen solcher Färbungen werden dem gleichen Gewebe verschiedene Farbstoffe mit verschiedenen chemischen Eigenschaften angeboten [77]. Hieraus resultiert die verschiedenfarbige Darstellung verschiedener Bestandteile des Gewebes [77].

Zur histomorphologischen Begutachtung wurden eine Toluidin-blau-, eine Hämatoxylin-Eosin-, eine Elastica-Hämatoxylin-Eosin-, eine Alcian-blau- und eine Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung verwendet. Die jeweiligen Färbeprotokolle sind dem Appendix (I-V) dieser Arbeit beigelegt.

3.3.3 Immunhistochemien

Im Rahmen von Immunhistochemien geht es darum ein bestimmtes Protein gezielt nachzuweisen [80]. Zur Vorbereitung wurde in allen Immunhistochemien eine Hitzedemaskierung in der Mikrowellen-Technik durchgeführt. Danach wurden zum Nachweis des zu untersuchenden Proteins, zunächst sogenannte Primärantikörper verwendet [80]. Diese binden mit Ihrem Fab-Anteil an das nachzuweisende Protein [80]. Als primären Antikörper für die endotheliale Stickoxid-Synthase wurde der monoklonale murine Antikörper „clone 6H2, IgG1, anti-human eNOS“ der Firma Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Der primäre Antikörper zur Darstellung von Cluster of Differentiation 31 war der monoklonale Antikörper aus Kaninchen „clone EPR3094, IgG, anti-human CD31“ der Firma Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich) in einer Verdünnung von 1:100. Die Darstellung der gespaltenen Caspase 3 erfolgte mittels „Cleaved caspase-3 (ASP175) antibody #9661“ der Firma Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) in einer Verdünnung von 1:100 als primären Antikörper. Die Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper erfolgte jeweils über Nacht.

In dieser Studie wurde in einem nächsten Schritt ein sogenannter Sekundärantikörper verwendet. Dessen Fab-Segment bindet das Fc-Segment des Primärantikörpers [80].

Um diese Bindung sichtbar zu machen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Techniken genutzt.

Zur Darstellung von Cluster of Differentiation 31 (CD31) war der Sekundärantikörper mit einer Peroxidase gekoppelt. Dieser Peroxidase wurden Wasserstoffperoxid und 3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid (DAB) als Substrate angeboten [81]. Im Rahmen dieser Reaktion wird das DAB zu einem Polybenzimidazol [82] umgesetzt. Hierbei handelt es sich um einen braunen Stoff, der sich im Bereich der Reaktion mit der Peroxidase und damit im Bereich des nachzuweisenden Proteins ablagert [81].

Zum Nachweis der endothelialen Stickoxid-Synthase und der gespaltenen Caspase 3 wurde ein Avidin-Biotin-Verfahren verwendet. Dieses beruht auf der Bildung von Avidin-Biotin-Komplexen (Englisch: Avidin-Biotin-Complex; Abkürzung: ABC) [80]. Entsprechend bezeichnet man diese Methode auch als ABC-Technik [80]. Bei diesem Verfahren werden ein mit Biotin verbundener Sekundärantikörper und eine mit Avidin oder Streptavidin gekoppelte Peroxidase genutzt [80]. Durch Komplexbildung von Avidin bzw. Streptavidin mit Biotin kommt es zur Bindung der Peroxidase im Bereich des nachzuweisenden Proteins [80]. Auch in diesem Verfahren wurde erneut DAB und Wasserstoffperoxid verwendet um ein braunes Signal im Bereich des nachzuweisenden Proteins zu erzeugen.

In der Markierung der endothelialen Stickoxidsynthase wurde ein biotinylierter Ziege-anti-Maus Antikörper als Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:100 verwendet. Der Sekundärantikörper zur Darstellung von CD31 war ein mit Peroxidase konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper in der Verdünnung 1:100. In der Immunhistochemie der gespaltenen Caspase 3 wurde ein mit Biotin markierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper in der Verdünnung 1:100 als Sekundärantikörper verwendet.

Nach Abschluss der immunhistochemischen Reaktion kann eine Standardfärbung als Gegenfärbung verwendet werden, um nicht markierte Strukturen darzustellen [80]. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit die Hämalun-Färbung nach Meyer verwendet.

Die Färbeprotokolle der durchgeführten Immunhistochemien sind dem Appendix (VI-VIII) dieser Arbeit beigefügt.

3.4 Mikroskopie und Befundung

3.4.1 Verwendete Geräte und Software

Die Mikroskopie erfolgte mit einem Olympus BX60 (Firma Olympus, Tokio, Japan) Mikroskop. Als Kamera wurde eine Olympus D37 (Firma Olympus, Tokio, Japan) benutzt. Als Software zum Auszählen, Messen und Fotografieren wurde „cellSens Diemensions“ (Olympus Corporation, Tokio, Japan, Version 1.15 Build 14760 Copyright © 2009-2016) verwendet. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte verblindet durch einen Untersucher. Dieser wurde in Stichproben von einem Pathologen und einen Anatomen kontrolliert.

3.4.2 Morphometrie

Die Beurteilung der Ausdehnung der histomorphologischen Parameter beruht auf der Abschätzung der jeweils betroffenen Fläche [11]. Entsprechend wurde die Anschnittfläche morphometrisch erfasst, um überprüfen zu können, ob die Probengröße die Untersuchungsergebnisse beeinflusst. Hierzu wurde die durchschnittliche Anschnittfläche aus der Fläche fünf zufällig ausgewählter Anschnitte errechnet. Die Flächenmessung erfolgte bei 12,5-facher Vergrößerung.

3.4.3 Analyse der VV und der eNOS

3.4.3.1 Analyse der VV

Für diese Studie wurden die VV in zwei Gruppen gegliedert. Die morphologisch abgrenzbaren VV und in die okkulten VV wurden unterschieden. Dabei wurde ein morphologisch abgrenzbares VV als ein Gefäß innerhalb der Aortenwand definiert, welches sich morphologisch in einer Standardfärbung abgrenzen lässt. Okkulte VV dagegen lassen sich nur mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises von CD31 als Endothelmarker darstellen.

Morphologisch abgrenzbare VV wurden nach der Eindringtiefe in die Aortenwand beurteilt. Hierzu wurde die Tunica media in ein sub-intimales, ein mitt-mediales und ein sub-adventitielles Drittel gegliedert. Es wurden alle Schnitte in allen Färbungen einer Probe untersucht. Die tiefste, beobachtete Lokalisation eines VV wurde erfasst. Diese Beurteilung erfolgte in der 100-fachen Vergrößerung.

Die Analyse der okkulten VV erfolgte durch Ermittlung des Abstandes der okkulten VV vom Lumen der Aorta. Hierzu wurde die durchschnittliche Distanz der fünf meist luminal gelegenen VV berechnet. Gemessen wurde jeweils orthogonal zu den zirkulär um das Lumen [7] angeordneten Zellkernen der SMC. Die Untersuchung des Gewebes erfolgte in 200- bis 400-facher Vergrößerung. Zur Befundkontrolle erfolgte der Vergleich mit einer gleichartigen Auswertung der eNOS-Immunhistochemie.

3.4.3.2 Analyse der eNOS

Durch den Vergleich mit der CD31-Immunhistochemie konnte bestimmt werden, welche eNOS-positiven Signale auf Endothel zurückzuführen sind. So wurden eNOS-positive okkulte VV identifiziert und analog zu der CD-31-Immunhistochemie ausgewertet (Kapitel 3.4.3.1).

Zusätzlich wurden jeweils 100 zufällig ausgewählte Zellen in der Tunica intima der Aorta und in den VV analysiert (800-fache Vergrößerung). Der so ermittelte Prozentsatz der eNOS-positiven Zellen wird im Folgenden als eNOS-Positivität für Tunica intima beziehungsweise VV bezeichnet. Zur Vermeidung von Doppelzählungen wurde zur Gesichtsfeldauswahl ein Systematic Random Sampling-Design [83] verwendet.

Die eNOS-positiven Signale, die nach Zusammenschau mit der CD31-Immunhistochemie weder auf VV noch der aortalen Tunica intima zurückzuführen waren, wurden dokumentiert, aber nicht weiter objektiv quantifiziert. In der Zusammenschau aus Immunhistochemie für eNOS und CD31, sowie morphologischen Befunden der Standardfärbungen wurde das Aufkommen eNOS-positiver SMC orientierend geschätzt.

3.4.4 Histomorphologische Analyse der Aorta ascendens

Histomorphologisch wurden in der vorliegenden Studie die MEMA und der SMC-Kernverlust erfasst. Nach Maßgabe der Konsensus-Arbeit wurde jeweils nur die schwerste Ausprägung eines Parameters bewertet [11]. Die Parameterdefinitionen wurden aus dem aktuell gängigen Standard der Aortenpathologie übernommen [11].

Eine MEMA ist definiert als eine Zunahme der medialen mukoiden extrazellulären Matrix, die translamellare oder intralamellare Erweiterungen der lamellaren Einheiten verursacht [11]. Hierzu zählen auch sogenannte extrazelluläre Pools der Matrix [11]. Bei der MEMA wurden Subtyp (intralamellar und translamellar), Ausdehnung und Schweregrad beurteilt [11]. Hierzu wurden die Hämatoxylin-Eosin-, die Alcian-blau-, die Elastica-Hämatoxylin-Eosin- und die Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung verwendet.

Der SMC-Kernverlust ist definiert als eine Region der Tunica media, welche multiple lamellare Einheiten umfasst, in der Zellkerne der SMC nicht klar identifiziert werden können [11]. Zur Bewertung des SMC Kernverlustes wurde in der vorliegenden Studie die insgesamt befallene Fläche verwendet. Dabei wurden die verschiedenen Subtypen [11] zur besseren Gesamtbeurteilung der Aortenwand zusammengefasst. Hierzu verwendete Färbungen waren die Toluidin-blau- und die Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Die Konsensus-Arbeit differenziert in der Ausdehnung die Grade „focal“¹, „multifocal“¹ und „extensive“¹ [11]. Der ausgedehnte Befall [11] wurde in der vorliegenden Studie zur feineren Differenzierung weiter untergliedert. Zum Abgrenzen der veränderten Graduierung wurde die Terminologie der Schweregrade und der Ausdehnungsgrade abgeändert. Die in der vorliegenden Studie genutzte Terminologie und die Definitionen der einzelnen Grade werden in Tabelle 1, sowie den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

¹ [11] Halushka MK, Angelini A, Bartoloni G, et al. Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association For European Cardiovascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases - nomenclature and diagnostic criteria. Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol. 2016;25(3):247-257. doi:10.1016/j.carpath.2016.03.002

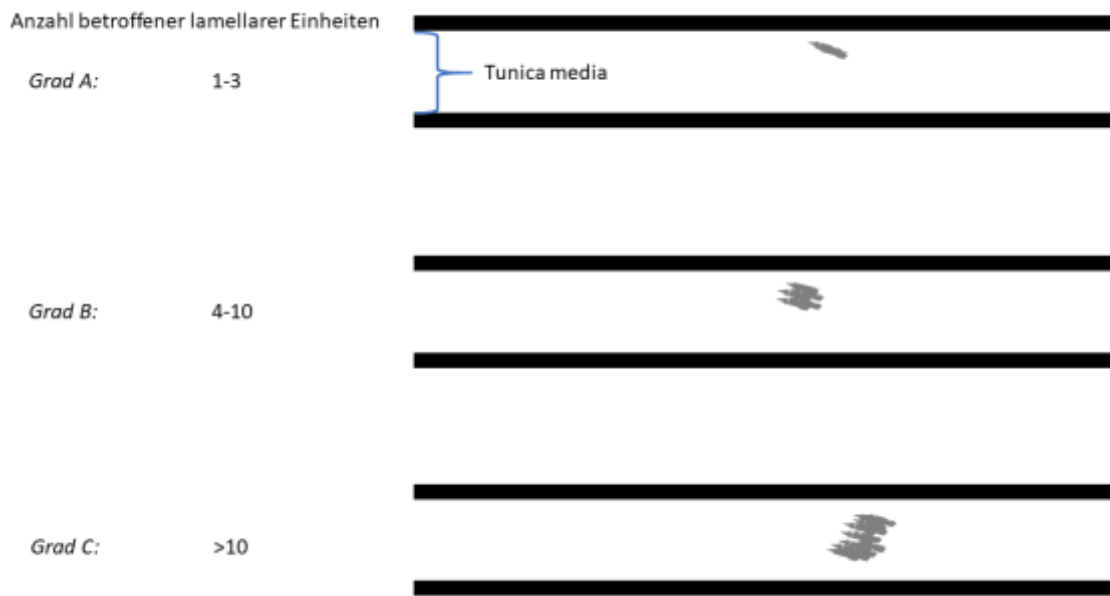


Abbildung 1 – Beurteilung des Schweregrades histomorphologischer Parameter. Die Graduierung des Schweregrades beruht auf der Anzahl der betroffenen lamellaren Einheiten [11]. Sie wurde von der Konsensus-Arbeit zur Aortenpathologie übernommen [11]. Weitere Erklärungen sind Tabelle 1 zu entnehmen. (Grafik erstellt nach dem Vorbild der Konsensus-Gruppe [11].)

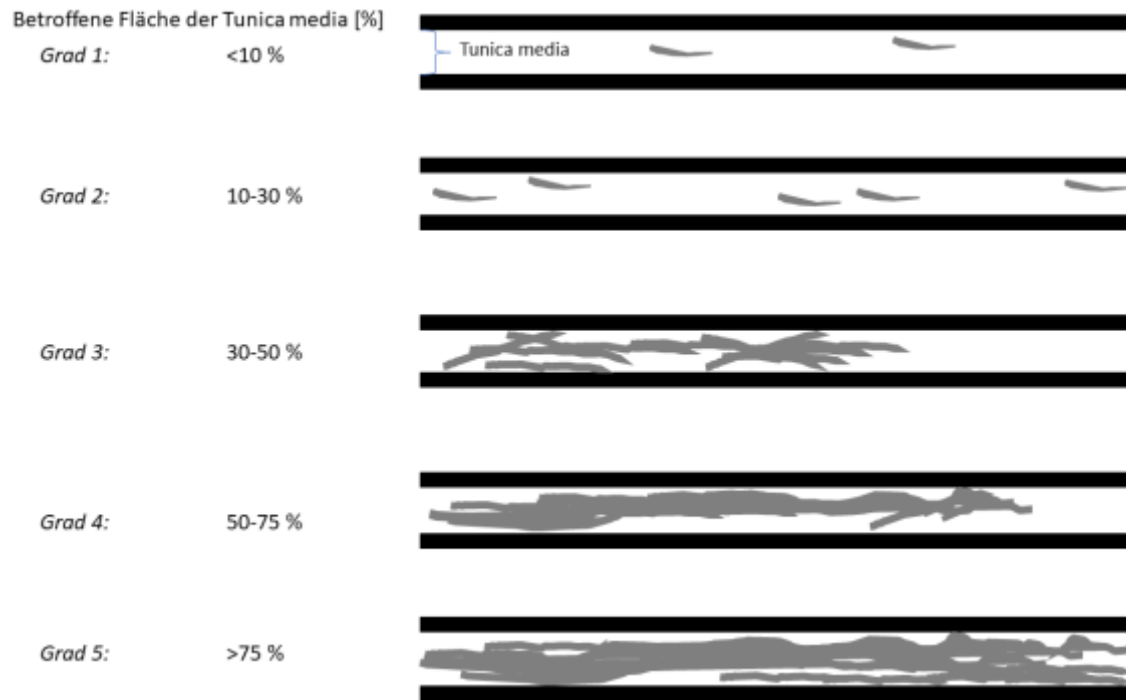


Abbildung 2 – Beurteilung der Ausdehnung histomorphologischer Parameter. Die Graduierung der Ausdehnung beruht auf der Fläche, welche von einer Pathologie betroffen ist [11]. Weitere Erklärungen sind Tabelle 1 zu entnehmen. (Grafik erstellt nach dem Vorbild der Konsensus-Gruppe [11].)

Grad	Beschreibung
Graduierung der Schwere	
A	Weniger als drei lamellare Einheiten sind betroffen.
B	3 bis 10 lamellare Einheiten sind betroffen.
C	Mehr als 10 lamellare Einheiten sind betroffen.
Graduierung der Ausdehnung	
1	Weniger als 10 % der untersuchten Fläche der Tunica media sind betroffen.
2	Zwischen 10 und 30 % der untersuchten Fläche der Tunica media sind betroffen.
3	Zwischen 30 und 50 % der untersuchten Fläche der Tunica media sind betroffen.
4	Zwischen 50 und 75 % der untersuchten Fläche der Tunica media sind betroffen.
5	Mehr als 75 Prozent der untersuchten Fläche der Tunica media sind betroffen.

Tabelle1 – Graduierung histomorphologischer Parameter. Die Graduierung der histomorphologischen Parameter erfolgte nach dem Vorbild der Konsensus-Arbeit zur Pathologie der Aorta [11]. Der sogenannte ausgedehnte Befall der Aorta [11] wurde in der vorliegenden Arbeit mit den Graden 3 bis 5 weiter differenziert.

3.4.5 Analyse der Immunhistochemie zum Nachweis der gespaltenen Caspase 3

Zur Auswertung von Zellen mit positivem Signal für gespaltene Caspase 3 wurde die Tunica media in ein sub-adventitielles, ein mitt-mediales und ein sub-intimales Drittel gegliedert. Die im Folgenden beschriebene Gesichtsfelder wurden nach einem Systematic Random Sampling Design [83] ausgewählt, um doppelte Erfassung zu vermeiden. Es erfolgte in 4 sub-intimalen, in 4 sub-adventitiellen und in 4 mitt-medialen Gesichtsfeldern eine Auszählung von Zellen mit Nachweis gespaltener Caspase 3 (400-fache Vergrößerung). Ein Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung maß 262 µm x 349

µm. So wurden bei zwölf untersuchten Gesichtsfeldern etwa 1,1 mm² untersucht. Die Summe, der für gespaltene Caspase 3 positiven Zellen aus den zwölf Gesichtsfeldern wurden durch 1,1 dividiert, um so die Anzahl der für Caspase 3 positiven Zellen pro mm² zu berechnen.

3.5 Statistik

Zur statistischen Analyse wurde das Programm SPSS (Version 24) der Firma IBM (Armonk, New York, Vereinigte Staaten von Amerika) genutzt. Eine statistische Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik am Universitätsklinikum des Saarlandes ist erfolgt. Für die statistische Testung wurde ein Signifikanzniveau α von 95 Prozent definiert. Entsprechend wurden p-Werte kleiner als 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

Die Verteilung stetiger Variablen wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests und nachfolgender Lilliefors Signifikanzkorrektur der Ergebnisse untersucht. Normalverteilte Variablen wurden durch Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung (Englisch: Standard deviation; Abkürzung: SD) beschrieben. Nicht-normalverteilte Variablen wurden mit Median und Spannweite (beziehungsweise Minimum und Maximum, falls deren Lage relevant schien) beschrieben. Nominal und ordinal skalierte Variablen wurden durch die Angabe absoluter und relativer Häufigkeiten beschrieben.

Der Mann Whitney-U-test wurde verwendet für dichotome Vergleiche (beispielsweise UAV vs. TAV oder dilatiert vs. nicht-dilatiert) von ordinal skalierte Variablen und stetigen Variablen. Für nicht-dichotome Vergleiche (beispielsweise Vergleich der vier Gruppen) ordinal skalierte Variablen oder stetiger Variablen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Zeigte dieser Hinweise auf statistisch signifikante Unterschiede innerhalb des Kollektivs erfolgte eine weitere paarweise Austestung. Hierfür wurde der post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Die p-Werte dieser Testung wurden nach Bonferroni adjustiert.

Im Falle fehlender Daten wurden relative Häufigkeiten in Bezug auf die Anzahl verbleibender Patienten berechnet. Für die jeweiligen statistischen Testungen wurden Individuen mit fehlenden und für den Test relevanten Werten ausgeschlossen.

3.5.1 Subanalyse junger Individuen

Nach der aktuellen Datenlage stellt das Alter einen relevanten Confounder für die durchgeführten Analysen dar [11], [84]. Entsprechend wurde eine Subanalyse junger Individuen durchgeführt. Für diese wurden das jüngste Individuum mit TAV und das älteste Individuum mit UAV identifiziert. Individuen außerhalb der so definierten Altersspanne wurden in dieser Subanalyse nicht erfasst. Zur Reduktion der Anzahl an Tests bei reduzierter Fallzahl, wurden alle erfassten Parameter nur im Vergleich der Klappenmorphologie ohne Berücksichtigung des Dilatationsstatus und im Vergleich dilatierter und nicht-dilatierter Aorten ohne Betrachtung der Klappenmorphologie statistisch analysiert. Zur orientierenden histologischen Charakterisierung der Dilatation wurde der Gruppenvergleich auf einen Vergleich dilatierter Aorten von Individuen mit TAV und UAV beschränkt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse klinischer Daten

Die klinischen Daten waren in allen Fällen verfügbar und sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Der Diameter des aortoventrikulären Übergangs ($p=0.037$) und das Alter ($p=0.027$) waren nicht-normalverteilt. Die Diameter der Valsalva-Sinus ($p=0.2$), des sinutubulären Übergangs ($p=0.051$) und der Aorta ascendens ($p=0.2$) folgten einer Normalverteilung. Im Gesamtkollektiv und in allen Gruppen zeigte sich ein deutliches Übergewicht des männlichen Geschlechts (Tabelle 2). Hinsichtlich des Geschlechts lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor ($p=0.525$). Individuen mit UAV waren signifikant jünger als Individuen mit TAV ($p<0.001$; Tabelle 2).

	UAV dilatiert (n=12)	UAV nicht- dilatiert (n=13)	TAV dilatiert (n=25)	TAV nicht- dilatiert (n=24)	Gesamt (n=74)
Männliches Geschlecht (Anzahl / % der Gruppe)	11 / 91,7	9 / 69,2	19 / 76	17 / 70,8	56 / 75,7
Alter bei Operation [Jahre] (Median / Spannweite)	39,5 / 35	30 / 38	60 / 38	60 / 50	51,5 / 57
Aortoventrikulärer Übergang [mm] (Median / Spannweite)	31 / 15	23 / 12	26 / 20	25 / 16	26 / 21
Valsalva-Sinus [mm] (Mittelwert / SD)	41 / 5	29 / 5	45 / 10	33 / 5	38 / 9
Sinutubulärer Übergang [mm] (Mittelwert / SD)	36 / 5	25 / 4	40 / 10	28 / 5	33 / 9
Aorta ascendens [mm] (Mittelwert / SD)	49 / 6	28 / 9	45 / 13	32 / 4	39 / 12

Tabelle 2 – Übersicht der klinischen Daten. Individuen mit UAV sind zum Zeitpunkt der Operation jünger als Individuen mit TAV. Abkürzungen: SD – Englisch: Standard deviation; Deutsch: Standardabweichung; TAV – Englisch: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspidale Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspidale Aortenklappe.

4.2 Auswertbarkeit der mikroskopischen Analysen

Eine Probe zeigte nur in einem kleinen Teil eine transversale Schnittebene. Entsprechend erfolgte bei dieser Probe keine Analyse der Eindringtiefe morphologisch abgrenzbarer VV, der MEMA und des SMC Kernverlustes. Die Analyse der immunhistochemischen Parameter war möglich. Für die Gesamtanalyse wurden entsprechend für diese Parameter 73 anstatt 74 Individuen eingeschlossen. In der Subanalyse junger Individuen wurden entsprechend für die betroffenen Parameter 45 statt 46 Individuen eingeschlossen. Die Auswertbarkeit wird in Tabelle 3 zusammengefasst:

Parameter	Gesamtanalyse	Subanalyse
Anschnittfläche	74	46
Eindringtiefe morphologisch abgrenzbarer VV	73	45
Okkulte VV im CD31-Nachweis	74	46
Okkulte VV im eNOS-Nachweis	74	46
eNOS-Positivität VV	74	46
eNOS-Positivität Tunica intima	74	46
Anzahl apoptotischer Zellen pro mm²	74	46
Ausdehnung SMC-Kernverlust	73	45
MEMA Subtyp	73	45
MEMA Ausdehnung	73	75
MEMA Schweregrad	73	45

Tabelle 3 – Auswertbarkeit nach durchgeführter statistischer Analyse. Aufgrund teilweise nicht-transversaler Schnittebene konnten in einer Probe keine histomorphologischen Parameter befundet werden. Abkürzungen: CD31 – Cluster of Differentiation 31; eNOS – endotheliale Stickoxid Synthase, MEMA – Mukoide extrazelluläre Matrixakkumulation; SMC – Englisch: Smooth muscle cell, Deutsch: Glatte Muskelzelle; VV – Vasa vasorum.

4.3 Ergebnisse der Morphometrie

Die durchschnittliche Fläche der untersuchten Proben war nicht normalverteilt ($p=0,01$). Für die gesamte Kohorte lag der Median der Fläche bei 21,4 mm² (Spannweite 57,9 mm²). Dabei maß die kleinste Probe dieser Studie 7,5 mm² (Gruppe TAV nicht-dilatiert). Die größte Probe maß 65,4 mm² (Gruppe TAV dilatiert). Die verschiedenen Gruppen waren vergleichbar hinsichtlich der Fläche ($p=0,162$). Tabelle 4 fasst die Ergebnisse der Flächenmessung zusammen.

Gruppe	Durchschnittliche Fläche der Probe [mm ²]	
	Median	Spannweite
UAV dilatiert	22,3	25,5
UAV nicht-dilatiert	20,2	17,5
TAV dilatiert	26,2	52,3
TAV nicht-dilatiert	21,2	32,6
Gesamt	21,4	57,9

Tabelle 4 – Durchschnittliche Anschnittfläche nach Gruppe. Es gibt keinen relevanten Unterschied hinsichtlich der untersuchten Fläche zwischen den einzelnen Gruppen. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspidale Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspide Aortenklappe.

4.4 Analyse der VV und der eNOS

4.4.1 Analyse der morphologisch abgrenzbaren VV

Das Vorkommen morphologisch abgrenzbarer VV in der Tunica media war der typische Befund für das Gesamtkollektiv (94,5 Prozent der gesamten Kohorte). Abbildung 3 fasst die Ergebnisse der Analyse der morphologisch abgrenzbaren VV zusammen. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für ein morphologisch abgrenzbares VV in der Tunica media.

Im Vergleich dilatierter und nicht-dilatierter Aorten ohne Betrachtung der Klappenmorphologie reichten die VV in dilatierten Aorten signifikant tiefer in die Tunica media ($p=0,035$). Im Vergleich der Klappenmorphologien, ohne Berücksichtigung des Dilatationsstatus zeigten Aorten von Individuen mit TAV signifikant tieferes Einwachsen morphologisch abgrenzbarer VV als Aorten von Individuen mit UAV ($p=0,03$). Im Vergleich der vier Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,013$; Post-hoc-Testung zeigte keinen signifikanten Unterschied in den paarweise Vergleichen: UAV dilatiert vs. UAV nicht-dilatiert: $p=1$; UAV dilatiert vs. TAV dilatiert: $p=0,135$; UAV dilatiert vs. TAV nicht-dilatiert: $p=1$; UAV nicht-dilatiert vs. TAV dilatiert: $p=0,098$; UAV nicht-dilatiert vs. TAV nicht-dilatiert: $p=1$; TAV dilatiert vs. TAV nicht-dilatiert: $p=0,082$). Allerdings zeigte sich im Vergleich von dilatierten und nicht-dilatierten Aorten von Individuen mit TAV eine Tendenz zum tieferen Einwachsen der morphologisch abgrenzbaren VV in den dilatierten Aorten von Individuen mit TAV ($p=0,098$). Weiter zeigten sich nur in nicht-dilatierten Aorten von Individuen mit TAV morphologisch abgrenzbare VV sub-intimal (1 Fall; 1,4 % des Gesamt-Kollektivs; 4,3 % der Gruppe). Ferner war diese Gruppe, die Einzige, in der keine morphologisch abgrenzbaren VV in der Tunica media identifiziert werden konnten (4 Fälle; 5,5 % der gesamten Kohorte, 17,4 % der Gruppe).

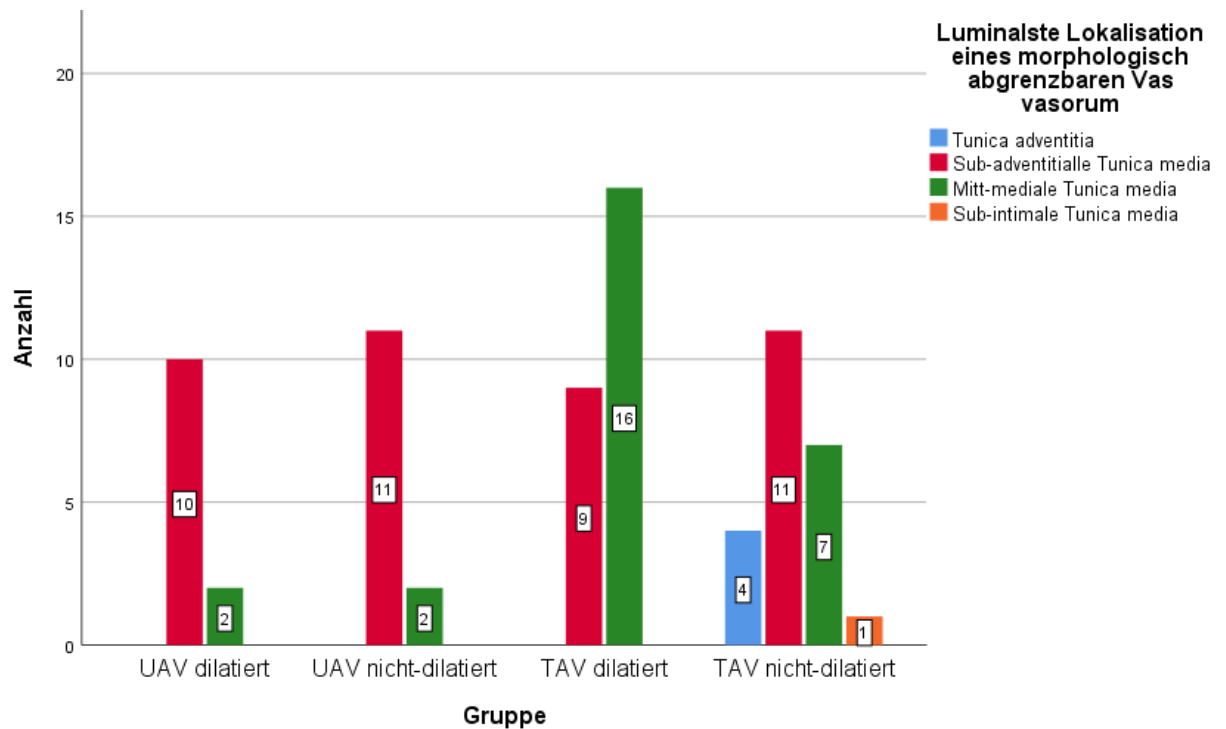


Abbildung 3 – Balkendiagramm zur Eindringtiefe morphologisch abgrenzbarer VV. Auf der Y-Achse aufgetragen ist die absolute Häufigkeit der verschiedenen Merkmalsausprägungen. Diese sind in Farben kodiert. Die Legende findet sich rechts im Bild. Die X-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen. Die weißen Kästchen zeigen die absolute Häufigkeit der verschiedenen Merkmalsausprägungen für die jeweilige Gruppe. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspidale Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspidale Aortenklappe.

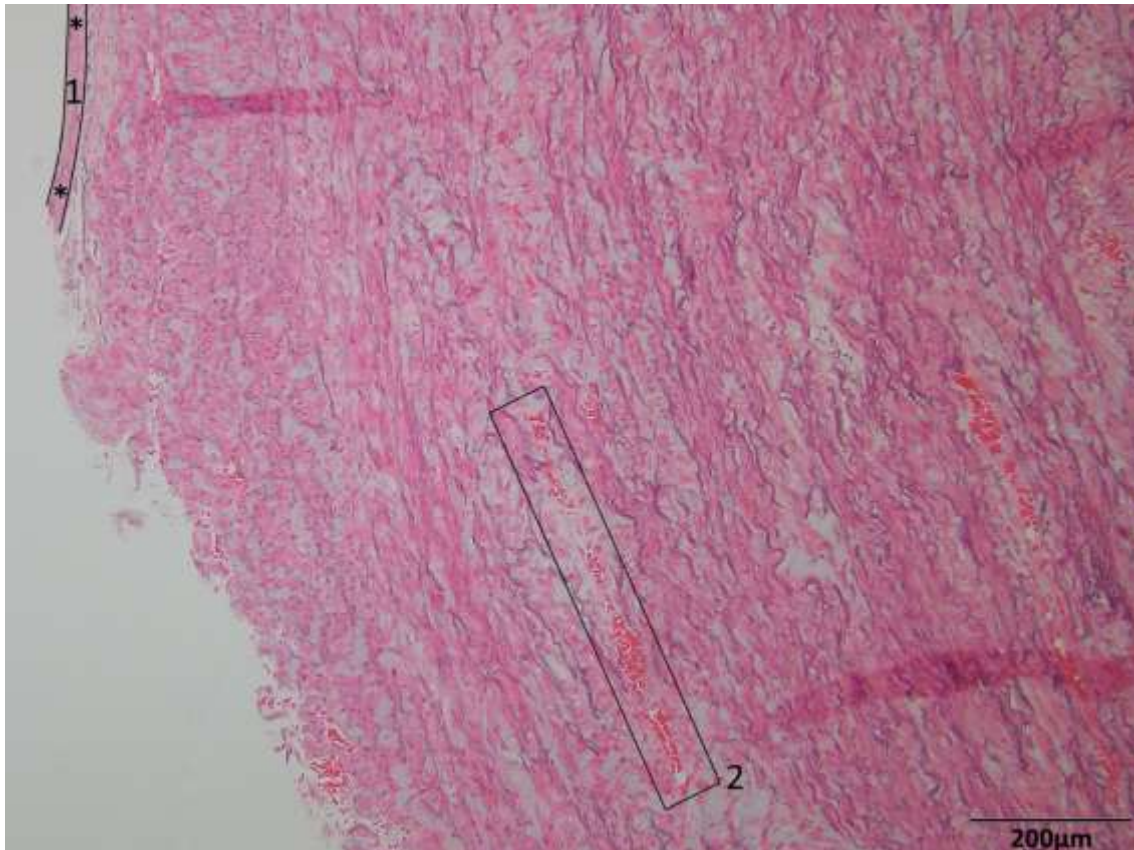


Abbildung 4 – Morphologisch abgrenzbares VV in der sub-intimalen Tunica media. Elastica-Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 100-facher Vergrößerung. Am linken Bildrand sieht man das Lumen der Aorta. Am rechten Bildrand ist die Tunica media in Richtung der Tunica adventitia dargestellt. Im oberen Bereich des Bildes ist ein Areal mit 1 und * markiert. Dieses Areal stellt die Tunica intima der Aorta dar. Im unteren Teil des Bildes ist als ein Artefakt der Prozessierung keine Tunica intima dargestellt. Das mit der 2 markierte Areal liegt im Bereich des sub-intimalen Drittels der Tunica media. Man sieht ein mit Erythrozyten gefülltes, morphologisch abgrenzbares VV.

4.4.2 Analyse der okkulten VV

Okkulte VV konnten in jeder Probe identifiziert werden. Ein Beispiel für ein okkultes VV zeigt Abbildung 5. Die Ergebnisse der Analyse werden in Tabelle 5 zusammengefasst.

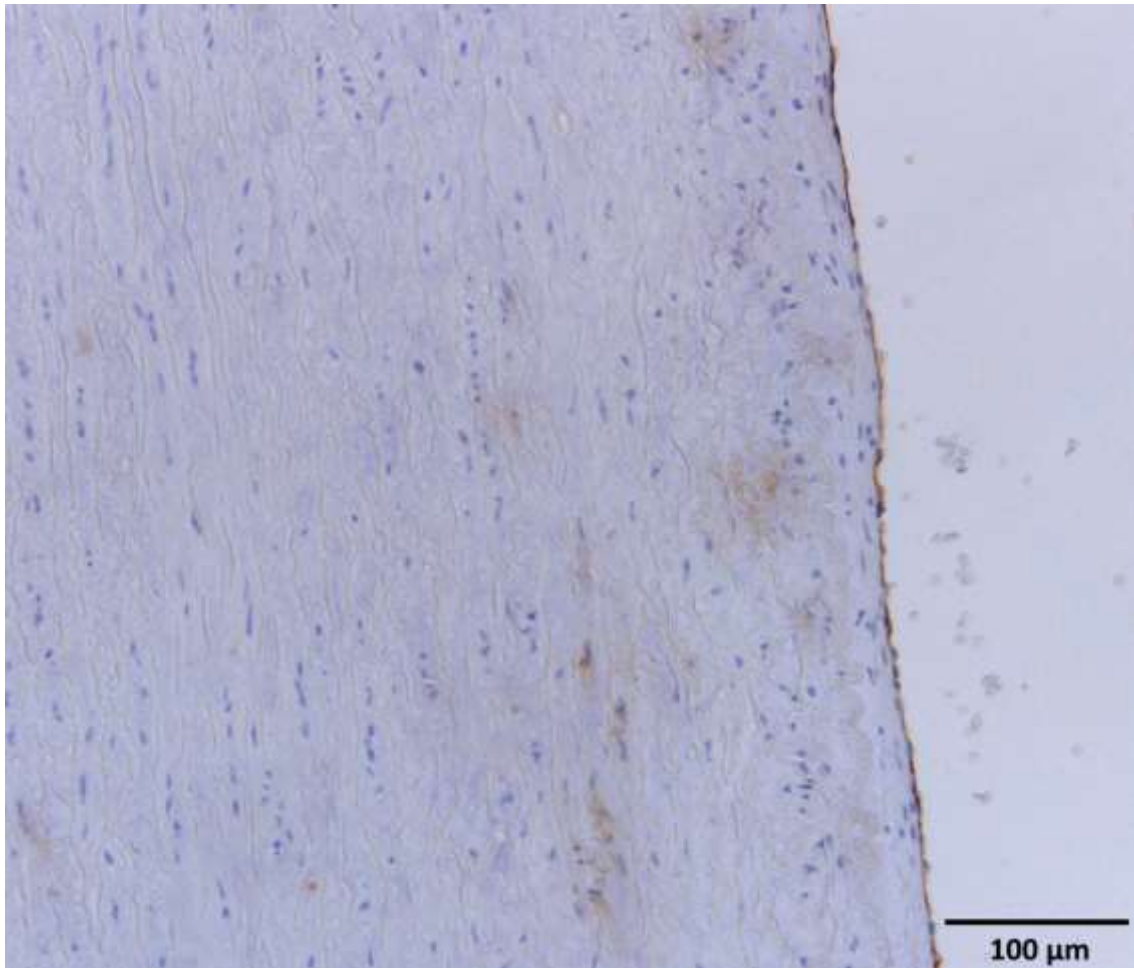


Abbildung 5 – Okkulte VV tief in der Tunica media. CD31-Immunhistochemie in 200-facher Vergrößerung. Am rechten Bildrand sieht man das Aortenlumen. Der linke Bildrand wird gebildet von der Tunica media in Richtung der Tunica adventitia. Der schmale braune Streifen im rechten Drittel des Bildes zeigt die Endothelschicht der Tunica intima. Die braunen fleckförmigen Signale im sub-intimalen Drittel der Tunica media stellen okkulte VV dar.

Unabhängig von Klappenmorphologie und Weite der Aorta ascendens konnten okkulte VV tief in der Tunica media identifiziert werden. Die gemessene Distanz der okkulten VV war nicht normalverteilt, sowohl für die Auswertung der CD31- ($p=0,025$), als auch der eNOS-Immunhistochemie ($p=0,018$). Für die gesamte Kohorte lag in der CD31-Immunhistochemie der mediane Abstand eines okkulten VV zum Lumen bei 123 μm (Spannweite 219 μm). Vergleichbare Werte konnten in der Auswertung der eNOS-Immunhistochemie erhoben werden (Median: 119 μm ; Spannweite: 278 μm).

Vergleicht man Aorten von Individuen mit UAV und TAV ohne Betrachtung der aortalen Dimension, lässt sich sowohl für eNOS ($p=0,443$), als auch für CD31 ($p=0,197$) kein relevanter Unterschied feststellen. Ohne Rücksicht auf die Klappenmorphologie zeigten sich auch dilatierte und nicht-dilatierte Aorten hinsichtlich okkulten VV in der CD31-

(p=0,46) und der eNOS-Immunhistochemie (p=0,925) vergleichbar. Auch der Gruppenvergleich zeigte keine relevanten Differenzen für beide Färbungen (eNOS p=0,898; CD31 p= 0,442).

Gruppe	Distanz zum Lumen-CD31 [μm]		Distanz zum Lumen-eNOS [μm]	
	Median	Spannweite	Median	Spannweite
UAV dilatiert	100	188	140	135.482
UAV nicht-dilatiert	126	108	125	81.026
TAV dilatiert	123	169	99	278.450
TAV nicht-dilatiert	129	219	115	222.030
Gesamt	123	219	119	278.450

Tabelle 5 – Analyse okkultes VV. Okkulte VV wurden in allen Gruppen beobachtet. Die Gruppen zeigten sich in beiden Analysen vergleichbar. Abkürzungen: CD31 – Cluster of Differentiation 31; eNOS – endotheliale Stickoxidsynthase; Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspidale Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspide Aortenklappe.

Im morphologischen Vergleich der beiden Färbungen zeigte sich, dass ein Großteil der eNOS-Signale durch okkulte VV bedingt ist. Nach Abschluss der Untersuchung des Studien-Kollektivs beruhen schätzungsweise etwa 75 Prozent der eNOS-Signale in der Tunica media auf okkulter VV. Nervenzellen, Entzündungszellen und SMC konnten als weitere Orte des eNOS-Vorkommens detektiert werden. Abbildung 6 zeigt beispielhaft eine eNOS-positive SMC.

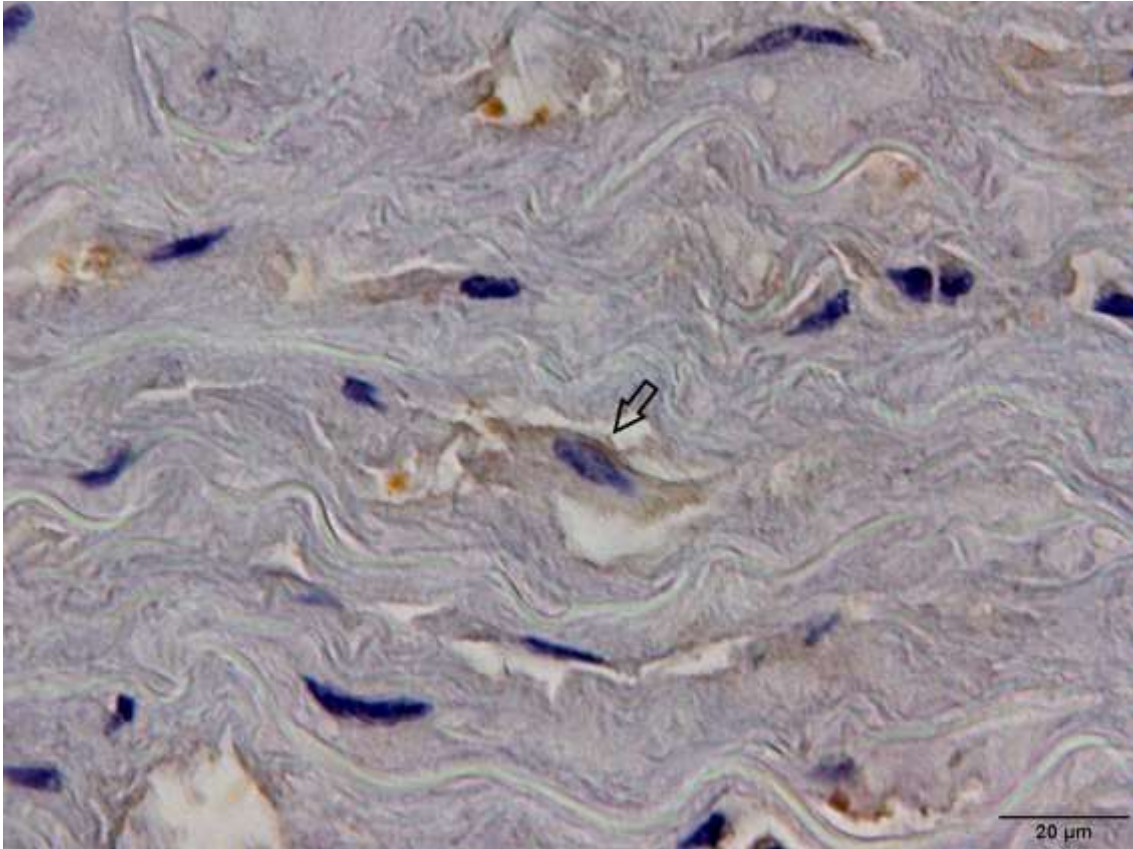


Abbildung 6 – eNOS-positive SMC. eNOS-Immunhistochemie in 800-facher Vergrößerung. Es handelt sich um eine Detailaufnahme der mitt-medialen Tunica media. Der obere Bildrand wird gebildet von der Tunica media in Richtung Tunica adventitia. Der untere Bildrand wird gebildet von der Tunica media in Richtung Tunica intima. Im Zentrum des Bildes ist eine spindelförmige Zelle dargestellt (Pfeil). Diese ist als Schnittartefakt aus der umliegenden extrazellulären Matrix herausgelöst. Diese Zelle zeigt einen prominenten Spindel-förmigen Kern. Der Zellkörper zeigt ebenfalls eine Spindelform. Morphologisch sind dies typische Befunde für eine SMC [7]. Im Zytoplasma dieser Zelle zeigen sich braune Ablagerungen. Entsprechend ist diese Zelle als eNOS-positive SMC einzustufen.

4.4.3 Analyse der eNOS-Positivität

Die Analyse der eNOS-Positivität erbrachte für die Tunica intima nicht-normalverteilte Resultate ($p=0,002$) und für die VV normalverteilte Resultate ($p=0.052$). Für die Tunica intima bot das gesamte Kollektiv im Median eine eNOS-Positivität von 70,5 Prozent (Spannweite 69 Prozent). Ein Beispiel für eNOS-positive Zellen in der Tunica intima zeigt Abbildung 7.

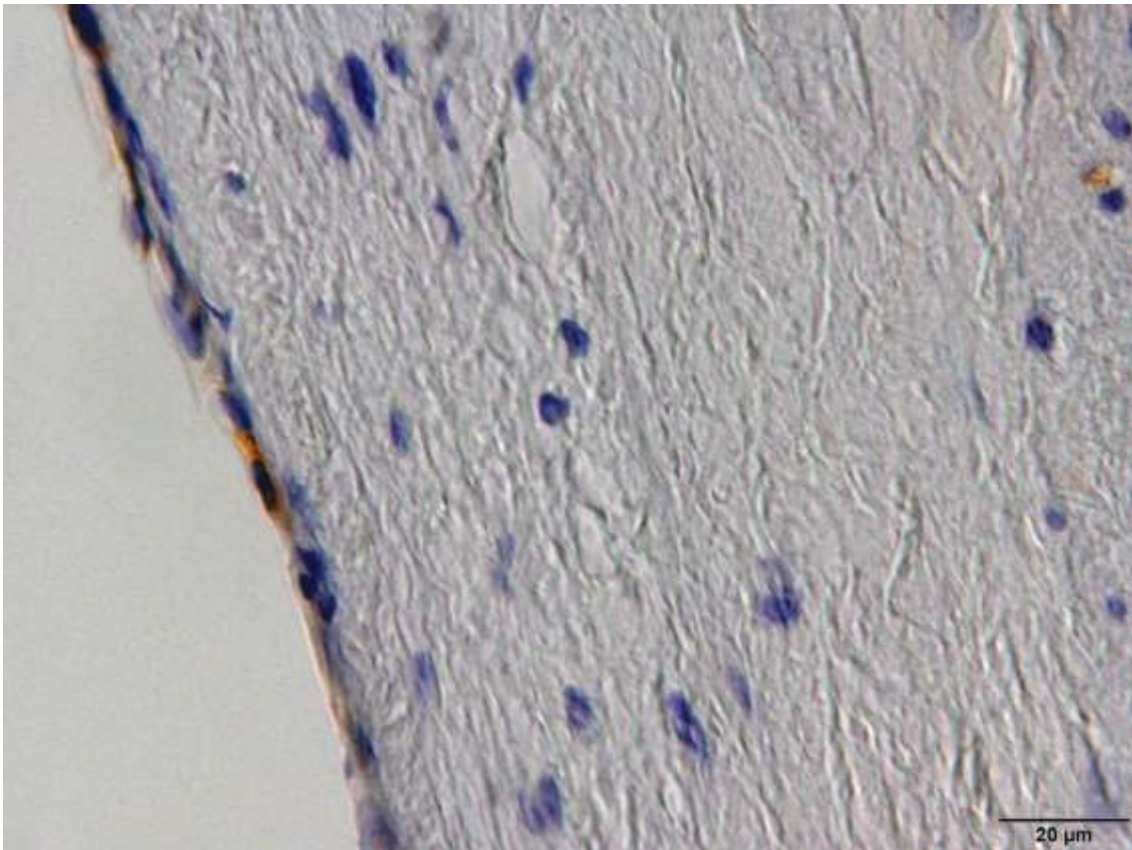


Abbildung 7 – eNOS-positive aortale Tunica intima. Das Bild zeigt Aortengewebe in der eNOS-Immunhistochemie mit der Hämalaun-Färbung nach Meyer (800-fache Vergrößerung). Der linke Bildrand wird gebildet vom Lumen der Aorta. Der rechte Bildrand wird von der Tunica media in Richtung der Tunica adventitia gebildet. Im linken Drittel des Bildes zeigt sich ein Streifen mit dicht aneinander gereihten Zellkernen, direkt am Lumen. Dieser Streifen ist die deutlich eNOS-positive Endothelschicht der Tunica intima.

Die eNOS-Positivität der VV lag für die gesamte Kohorte im Mittelwert bei 74,1 Prozent bei einer Standardabweichung von 19 Prozent. Ein eNOS-positives VV ist in Abbildung 8 gezeigt. Vergleich man dilatierte und nicht-dilatierte Aorten ohne Betrachtung der Aortenklappenmorphologie, so zeigten sich diese sowohl für die eNOS-Positivität der VV ($p=0,523$), als auch der Tunica intima ($p=0,203$) vergleichbar. Auch Aorten von Individuen mit UAV und TAV, ohne Berücksichtigung des Dilatationsstatus, zeigten sich vergleichbar für Tunica intima ($p=0,906$) und VV ($p=0,697$) hinsichtlich der eNOS-Positivität. Auch der Gruppenvergleich zeigte keine signifikanten Unterschiede in der eNOS-Positivität der Tunica intima ($p=0,203$) und der VV ($p=0,526$).

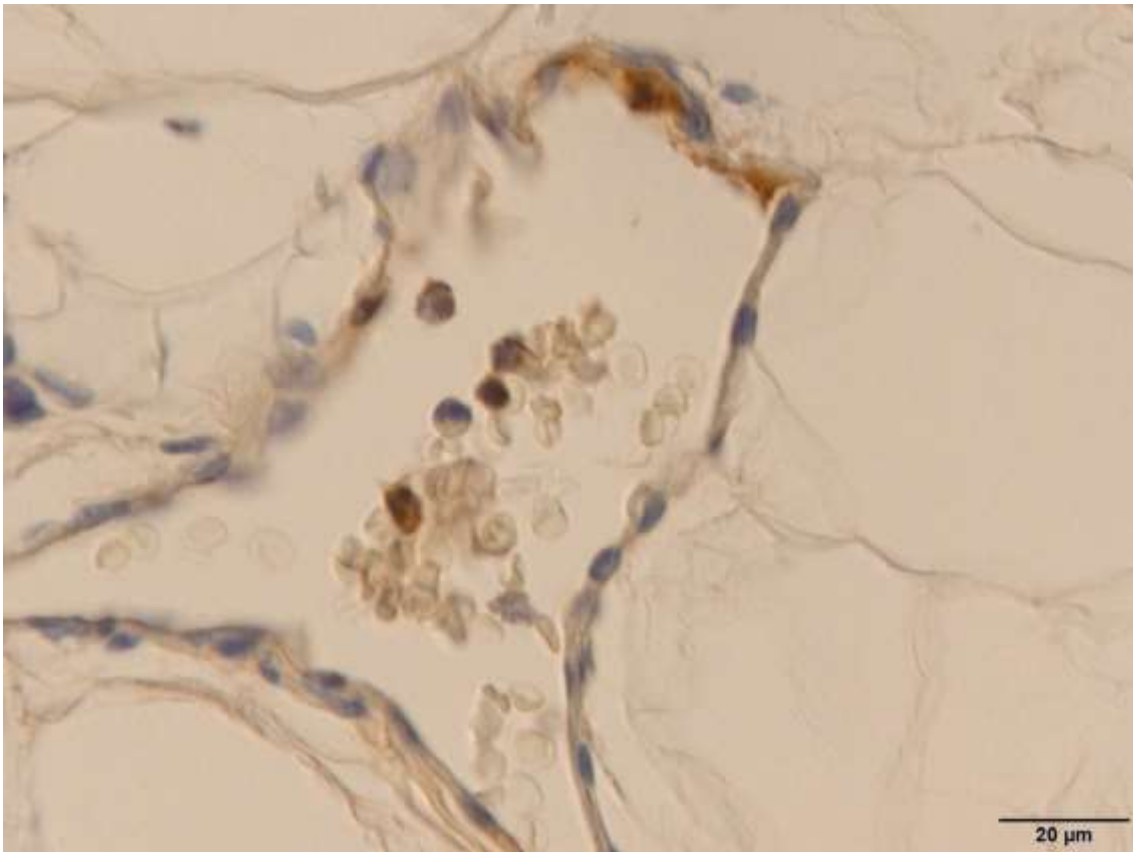


Abbildung 8 – eNOS-positives VV. eNOS-Immunhistochemie in 800-facher Vergrößerung. Dargestellt ist eine Detailaufnahme der Tunica adventitia. Im Zentrum des Bildes sieht man vier vereinzelte braune, das heißt eNOS-positive Zellen. Diese liegen im Lumen eines VV. Die Zellen, welche das Lumen des VV auskleiden, sind ebenfalls in weiten Teilen eNOS-positiv. Morphologisch handelt es sich bei diesen Zellen um Endothelzellen. Zell- und kernmorphologisch handelt es sich bei den vier positiven Zellen im Lumen des VV am ehesten um neutrophile Granulozyten.

4.5 Analyse der Immunhistochemie zum Nachweis der gespaltenen Caspase 3

Geschätzt zeigten etwa 75 Prozent der Zellen mit dem Nachweis gespaltenen Caspase 3 die typische Morphologie von SMCs. Die Anzahl apoptotischer Zellen war nicht normalverteilt ($p < 0,0001$). Eine weite Streuung im gesamten Kollektiv wurde beobachtet (Median 85 Zellen pro mm^2 ; Minimum 16 Zellen pro mm^2 ; Maximum 714 Zellen pro mm^2). Die Ergebnisse der Analyse werden in Tabelle 6 zusammengefasst. Zellen mit Nachweis gespaltenen Caspase 3 sind exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt.

Gruppe	Zellen mit Nachweis gespaltener Caspase 3 pro mm ²		
	Median	Maximum	Minimum
UAV dilatiert	257	714	24
UAV nicht-dilatiert	106	703	47
TAV dilatiert	78	383	16
TAV nicht-dilatiert	78	251	19
Gesamt	85	714	16

Tabelle 6 – Analyse von Zellen mit Nachweis gespaltener Caspase 3. Die Anzahl von Zellen mit positivem Signal für die gespaltene Caspase 3 zeigt eine starke Streuung. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspidale Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspidale Aortenklappe.

Im Vergleich UAV und TAV ohne Unterscheidung nach dem Dilatationsstatus zeigten Individuen mit UAV signifikant mehr apoptotische Zellen pro mm² ($p < 0,0001$). Im Gesamtvergleich dilatierter und nicht-dilatierter Aorten ohne Berücksichtigung der Klappenmorphologie bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,345$). Im Gruppenvergleich waren dilatiertere und nicht-dilatiertere Aorten von Individuen mit UAV vergleichbar ($p = 0,384$), wie auch dilatiertere und nicht-dilatiertere Aorten von Individuen mit TAV ($p = 1$). Signifikant mehr apoptotische Zellen hingegen zeigte die Gruppe dilatierter Aorten von Individuen mit UAV im Vergleich mit dilatiertere Aorten von Individuen mit TAV ($p = 0,001$) und im Vergleich mit nicht-dilatiertere Aorten von Individuen mit TAV ($p < 0,0001$).

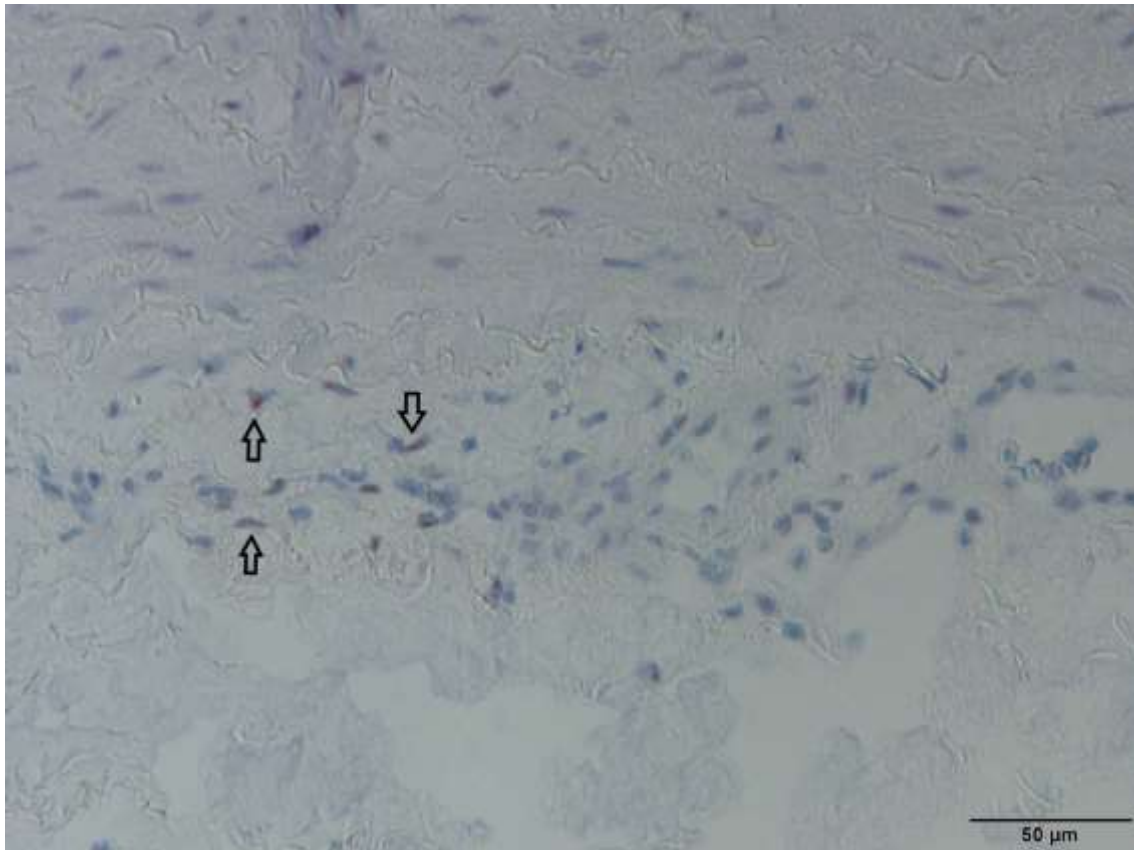


Abbildung 9 – Zellen mit Nachweis von gespalteener Caspase 3. Immunhistochemie zum Nachweis gespalteener Caspase 3 in 400-facher Vergrößerung. Der obere Bildrand zeigt die sub-adventitielle Tunica media und liegt in Richtung Lumen. Am unteren Bildrand sieht man das lockere Bindegewebe der Tunica adventitia. Im Bereich der Tunica media sub-adventitiell liegen einige braune Zellen (Pfeile), das heißt Zellen mit Nachweis der gespaltenen Caspase 3.

4.6 Analyse des SMC-Kernverlustes

Die Ergebnisse der Analyse des SMC-Kernverlustes werden in der Abbildung 10 zusammengefasst. Lediglich bei 5 Individuen (6,8 % der Kohorte) wurde kein SMC-Kernverlust beobachtet. Der am häufigsten beobachtete Ausdehnungsgrad war Grad 3 (18 Individuen; 24,7 Prozent des Kollektivs).

Lässt man die Aortenklappenmorphologie außer Betracht, ist in dilatierten Aorten mehr Fläche der Tunica media von einem SMC-Kernverlust betroffen als in nicht-dilatierten Aorten ($p=0,049$). Im Vergleich von UAV und TAV ohne Betrachtung der Aortenweite, zeigte sich kein relevanter Unterschied ($p=0,419$). Auch die vier Gruppen waren untereinander vergleichbar ($p=0,157$).

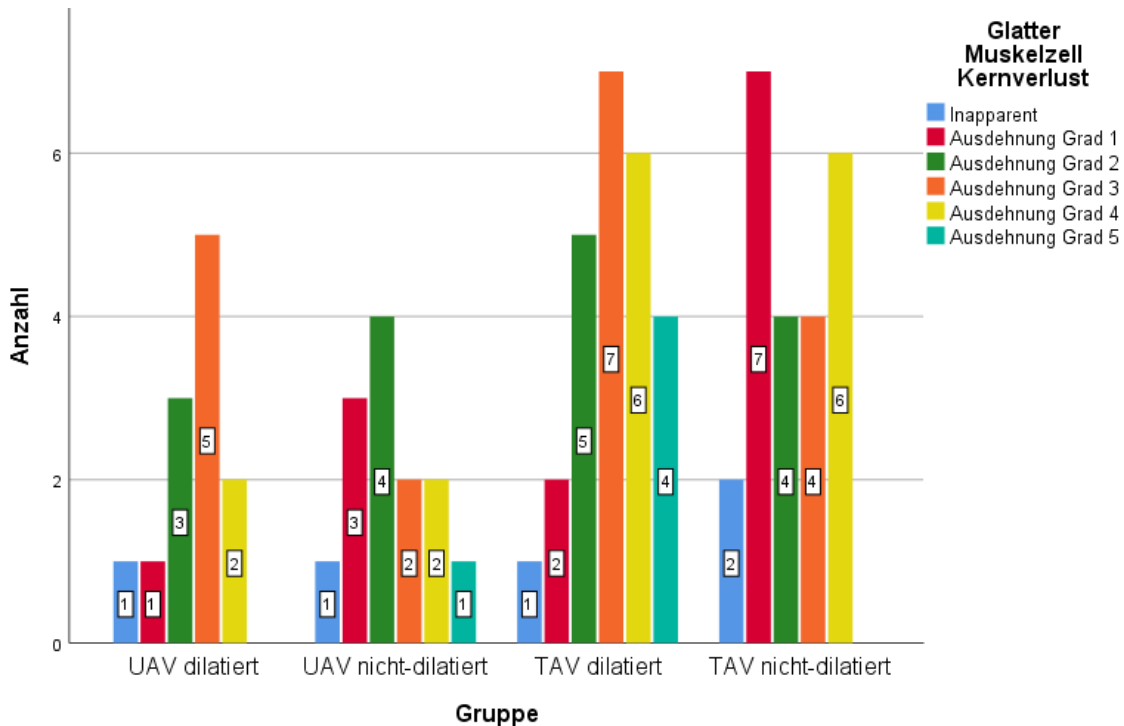


Abbildung 10 –Balkendiagramm zur Ausdehnung des SMC-Kernverlustes nach Gruppe.

Auf der Y-Achse wird die absolute Häufigkeit dargestellt. Die X-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen. Die verschiedenen Grade der Ausdehnung sind farblich kodiert. Die Legende findet sich rechts im Bild. Die weißen Kästchen in den einzelnen Balken geben die absolute Häufigkeit der jeweiligen Merkmalsausprägung in der jeweiligen Gruppe an. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspidale Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspidale Aortenklappe

4.7 Analyse der MEMA

MEMA wurde in allen Individuen beobachtet. Beispielhaft ist die MEMA in Abbildung 11 dargestellt.

Die Ergebnisse hinsichtlich der MEMA-Subtypen fasst Abbildung 12 zusammen. Der translamellare Subtyp war in 74 Prozent der Fälle (54 Individuen) präsent und damit häufiger als der intralamellare Subtyp. Dabei bestand kein Unterschied zwischen UAV und TAV ohne Berücksichtigung des Dilatationsstatus ($p=0,164$). Vergleicht man dilatierte und nicht-dilatierte Aorten ohne Betrachtung der Aortenklappenmorphologie, zeigten dilatierte Aorten signifikant mehr translamellare MEMA ($p=0,014$). Der Gruppenvergleich zeigte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der MEMA-Subtypen ($p=0,052$).

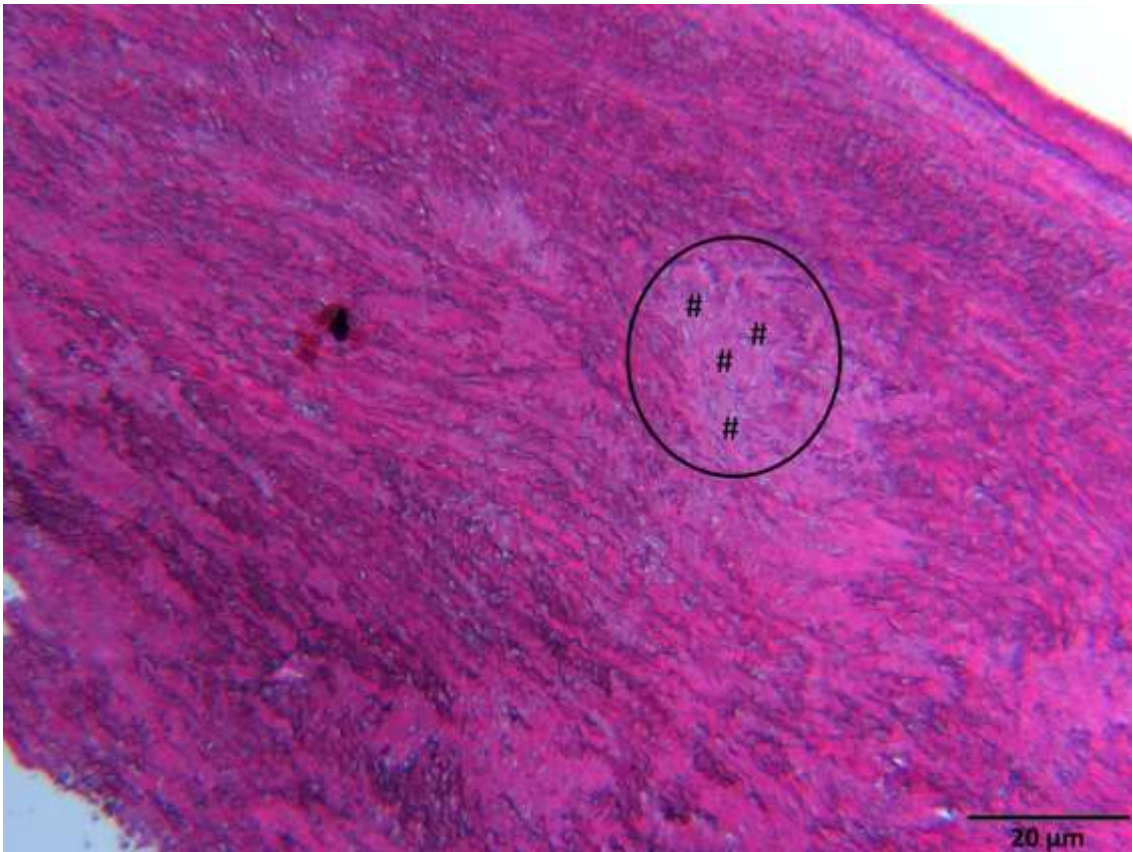


Abbildung 11 – Schwere und weit ausgedehnte MEMA. Elastica-Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 50-facher Vergrößerung. In der rechten oberen Ecke sieht man das Aortenlumen. Angrenzend sieht man die verdickte Tunica intima, die von dicken elastischen Fasern von der Tunica media abgegrenzt wird. In der Tunica media ist eine Fläche mit einem Kreis und # markiert. Diese zeigt exemplarisch eine hochgradige MEMA. Befunde dieser Art befallen weite Teile der Tunica media in dieser Probe. Es handelt sich dabei um eine translamellare MEMA, da die lamellaren Einheiten durch die Mukopolysaccharide zerstört wurden.

Abbildung 13 fasst die Ergebnisse zur Ausdehnung der MEMA zusammen. Der Ausdehnungsgrad 1 war der häufigste Befund. Dieser Grad lag insgesamt bei 53,4 Prozent des Gesamtkollektivs (39 Individuen) vor. Vergleicht man Aorten von Individuen mit TAV und UAV, ohne Betrachtung des Dilatationsstatus, zeigten Aorten von Individuen mit TAV eine weiter verbreitete MEMA ($p=0,011$). Ohne Betrachtung der Aortenklappenmorphologie, zeigten dilatierte Aorten ausgedehntere MEMA als nicht-dilatierte Aorten ($p=0,011$). Im Gruppenvergleich zeigten dilatierte Aorten von Individuen mit TAV signifikant weiter verbreitete MEMA als dilatierte Aorten von Individuen mit UAV ($p=0,043$). Dilatierte Aorten von Individuen mit TAV zeigten außerdem signifikant ausgedehntere MEMA, als nicht-dilatierte Aorten von Individuen mit UAV ($p=0,006$).

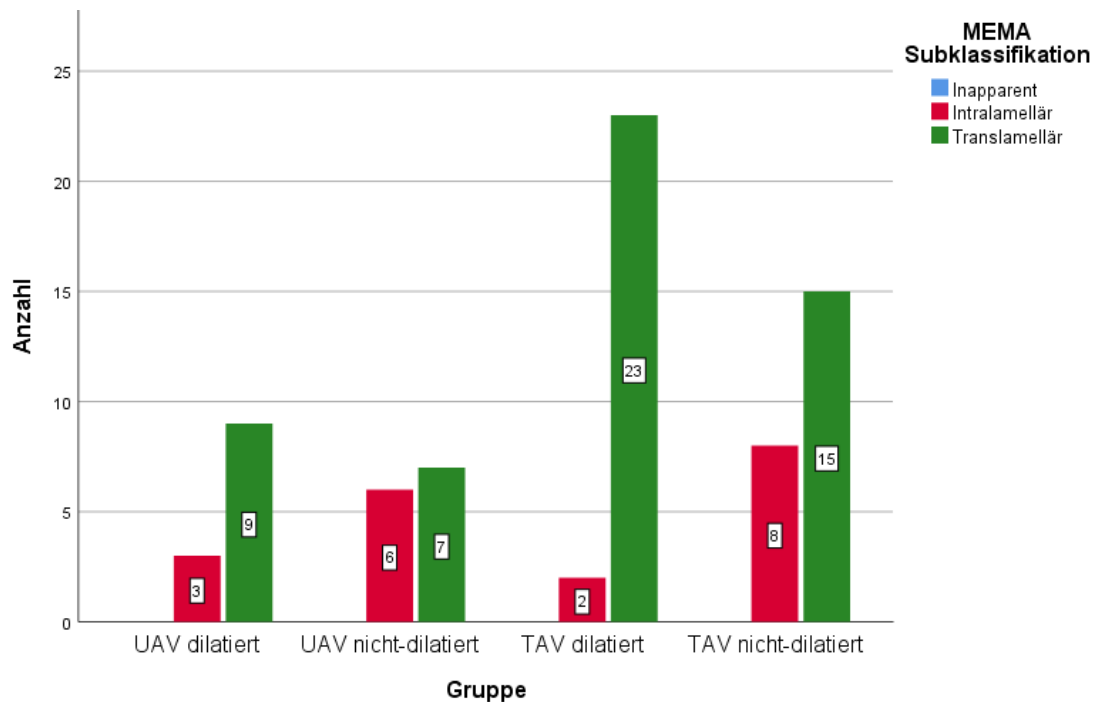


Abbildung 12 – Balkendiagramm zu den MEMA-Subtypen nach Gruppe. Auf der Y-Achse ist die absolute Häufigkeit aufgetragen. Die X-Achse stellt die verschiedenen Gruppen dar. Die verschiedenen Subtypen werden farblich kodiert. Die Legende findet sich rechts im Bild. Die weißen Kästchen in den Balken zeigen die absolute Häufigkeit der verschiedenen Merkmalsausprägungen pro Gruppe. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspidale Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspidale Aortenklappe.

Die Ergebnisse zum Schweregrad der MEMA sind in Abbildung 14 dargestellt. Betrachtet man den Schweregrad der MEMA, war Grad A der häufigste Befund. Dieser lag in 47,9 Prozent der Fälle (35 Individuen) vor. Im Vergleich UAV und TAV ohne Berücksichtigung des Dilatationsstatus zeigten Aorten von Individuen mit TAV signifikant schwerere MEMA ($p=0,003$). Im Vergleich dilatierter und nicht-dilatierter Aorten ohne Berücksichtigung der Klappenanlage zeigte sich schwerere MEMA in dilatierten Aorten ($p<0,0001$). Vergleicht man dilatierte Aorten von Individuen mit UAV und TAV, so sah man schwerere MEMA in den dilatierten Aorten der Individuen mit TAV ($p=0,005$). Dilatierte Aorten von Individuen mit TAV zeigten signifikant schwerere MEMA als nicht-dilatierte Aorten von Individuen mit UAV ($p<0,0001$) und als nicht-dilatierte Aorten von Individuen mit TAV ($p<0,0001$).

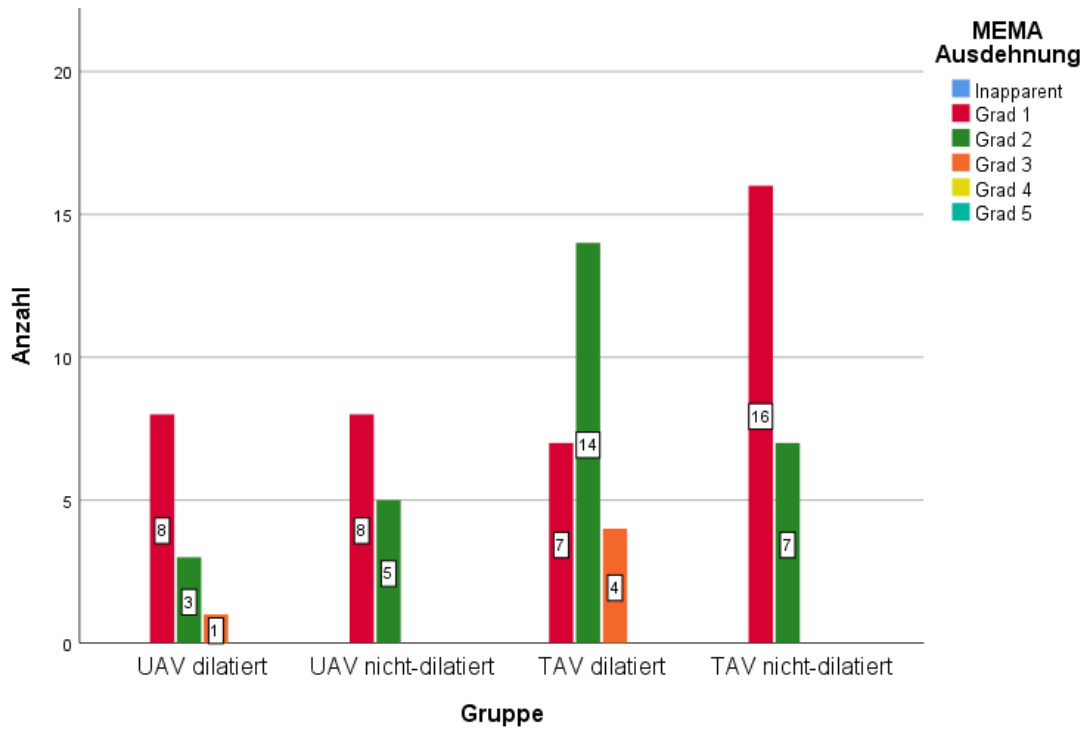


Abbildung 13 – Balkendiagramm zur MEMA-Ausdehnung nach Gruppen. Die absolute Häufigkeit wird auf der Y-Achse dargestellt. Die X-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen. Die verschiedenen Ausdehnungsgrade werden farblich kodiert. Die Legende findet sich rechts im Bild. Die weißen Kästen in den Balken zeigen die absolute Häufigkeit der jeweiligen Merkmalsausprägung pro Gruppe. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspide Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspide Aortenklappe.

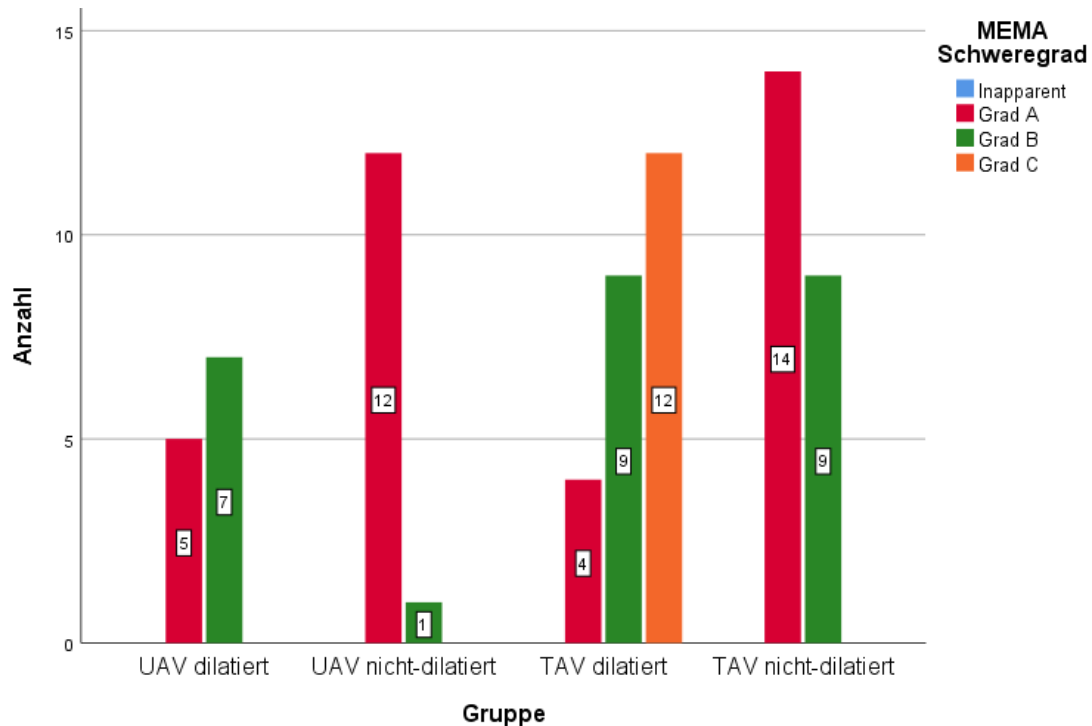


Abbildung 14 – Balkendiagramm zum MEMA-Schweregrad nach Gruppen. Auf der Y-Achse ist die absolute Häufigkeit aufgetragen. Die X-Achse stellt die verschiedenen Gruppen dar. Die unterschiedlichen Schweregrade werden farblich kodiert. Die Legende findet sich rechts im Bild. Die weißen Kästchen zeigen die absolute Häufigkeit der jeweiligen Merkmalsausprägung pro Gruppe. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspide Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspide Aortenklappe.

4.8 Subanalyse junger Individuen

Das jüngste Individuum mit TAV war 22 Jahre alt. Das älteste Individuum mit UAV war 61 Jahre alt. Entsprechend wurden für diese Analyse Individuen jünger als 22 und Individuen älter als 61 Jahre ausgeschlossen. Es verblieben 46 Individuen in der Analyse (UAV dilatiert n=12; UAV nicht-dilatiert n=8; TAV dilatiert n=14; TAV nicht-dilatiert n=12). Die klinischen Daten der Gruppen für diese Subanalyse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Auch in dieser Sub-Analyse zeigte sich ein Überwiegen des männlichen Geschlechts. Die Gruppen zeigten sich vergleichbar hinsichtlich der Geschlechterverteilung ($p=0,165$). Ein statistisch signifikanter Altersunterschied lag zwischen den Gruppen in dieser Subanalyse nicht vor ($p=0,106$). Alter ($p=0,2$) und alle aortalen Dimensionen (aortoventrikulärer Übergang $p=0,2$; Valsalva-Sinus $p=0,084$; sinutubulärer Übergang

p=0,2; Aorta ascendens p=0,2) zeigten sich normalverteilt. Auch die Fläche der Proben (p=0,178) und die durchschnittliche Distanz eines okkulten VV zum Lumen für CD31 (p=0,2) waren normalverteilt. Die eNOS-Positivität der Tunica intima (p=0,002), die eNOS-Positivität der VV (p=0,037), die durchschnittliche Distanz eines okkulten VV zum Lumen für eNOS (p=0,012) und die Anzahl apoptotischer Zellen pro mm² (p<0,0001) keine Normalverteilung.

	UAV dilatiert (n=12)	UAV nicht- dilatiert (n=8)	TAV dilatiert (n=14)	TAV nicht- dilatiert (n=12)	Gesamt (n=46)
Männliches Geschlecht	11 / 91.7	5 / 62.5	12 / 85.7	7 / 58.3	35 / 76.1
(Anzahl/ % der Gruppe)					
Alter [Jahre]	42 / 10.3	40 / 10.4	47 / 8.4	48 / 10.4	45 / 10.1
(Mittelwert / SD)					
Aortoventrikulärer Übergang [mm]	31 / 4	24 / 4	27 / 5	26 / 4	27 / 5
(Mittelwert / SD)					
Valsalva-Sinus [mm]	41 / 5	31 / 5	45 / 12	32 / 5	38 / 10
(Mittelwert / SD)					
Sinutubulärer Übergang [mm]	36 / 5	26 / 5	39 / 12	27 / 5	33 / 10
(Mittelwert / SD)					
Aorta ascendens [mm]	49 / 6	29 / 11	43 / 15	30 / 5	39 / 13
(Mittelwert / SD)					

Tabelle 7 – Klinische Daten zur Subanalyse junger Individuen. Durch den Ausschluss besonders junger und besonders alter Individuen wird eine Altersadjustierung erzielt. Abkürzungen: SD – Englisch: Standard deviation, Deutsch: Standardabweichung; Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspide Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspide Aortenklappe.

4.8.1 Subanalyse junger Individuen: Vergleich der Aorta bei UAV und TAV ohne Betrachtung des Dilatationsstatus

Im Vergleich von Aorten von Individuen mit UAV und TAV ohne Berücksichtigung der Aortenweite zeigten sich diese hinsichtlich der Eindringtiefe der morphologisch abgrenzbaren VV vergleichbar ($p=0,317$). Auch in der Analyse der eNOS-Positivität der Tunica intima ($p=0,945$) und der VV ($p=0,363$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Aorten von Individuen mit UAV und TAV. Weiter zeigten sich auch die okkulten VV in beiden Analysen für Aorten von Individuen mit UAV und TAV (eNOS-Analyse $p=0,398$; CD31-Analyse $p=0,373$) vergleichbar. Hinsichtlich der MEMA bestand für den Subtyp kein Unterschied zwischen Individuen mit UAV und TAV ($p=0,458$). Aber hinsichtlich der Ausdehnung und des Schweregrades zeigte die Aortenwand von Individuen mit TAV signifikant schwereren Befall (MEMA-Ausdehnung $p=0,038$; Abbildung 15; MEMA-Schweregrad $p=0,001$; Abbildung 16). Außerdem zeigten Individuen mit UAV signifikant mehr Zellen mit Nachweis gespaltener Caspase 3 ($p<0,0001$) im Vergleich zu Individuen mit TAV (Abbildung 17). Individuen mit UAV und TAV waren hinsichtlich des SMC-Kernverlustes vergleichbar ($p=0,633$).

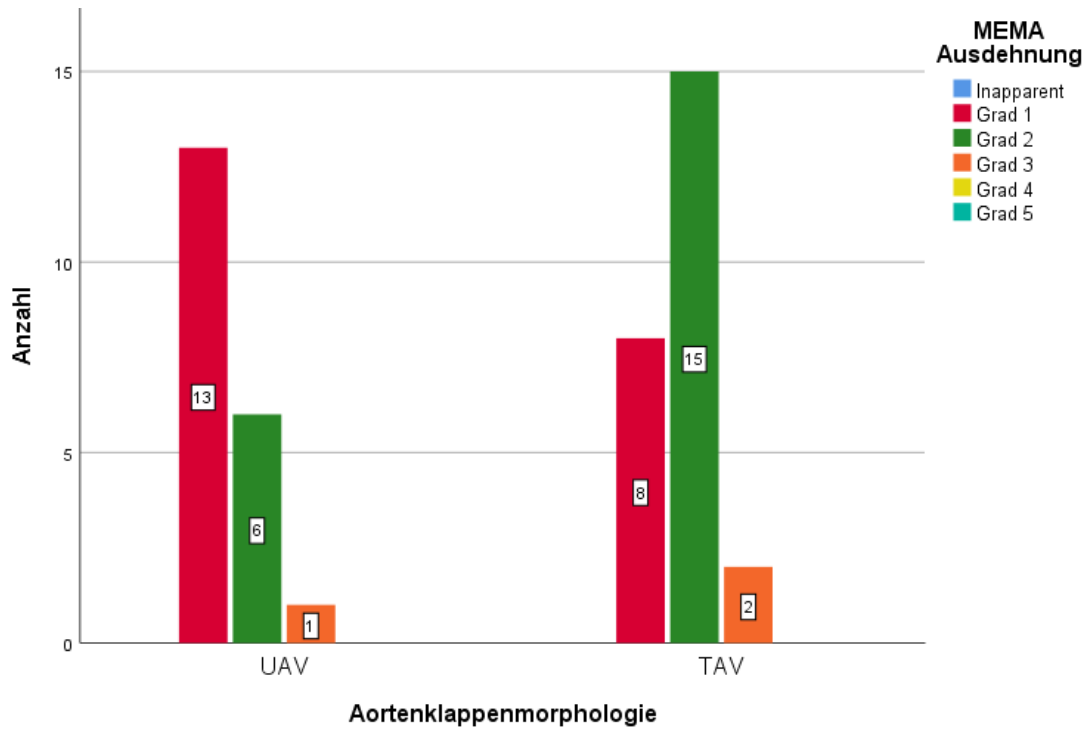


Abbildung 15 – Balkendiagramm zur MEMA-Ausdehnung nach Klappenmorphologie in der Subanalyse junger Individuen. Auf der Y-Achse ist die absolute Häufigkeit aufgetragen. Die X-Achse zeigt den Vergleich von Individuen mit UAV und TAV ohne Berücksichtigung des Dilatationsstatus. Die verschiedenen Grade der Ausdehnung sind farblich kodiert. Die Legende findet sich rechts im Bild. Die weißen Kästchen zeigen jeweils die absolute Häufigkeit einer Merkmalsausprägung pro Vergleichsgruppe. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspidale Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspide Aortenklappe.

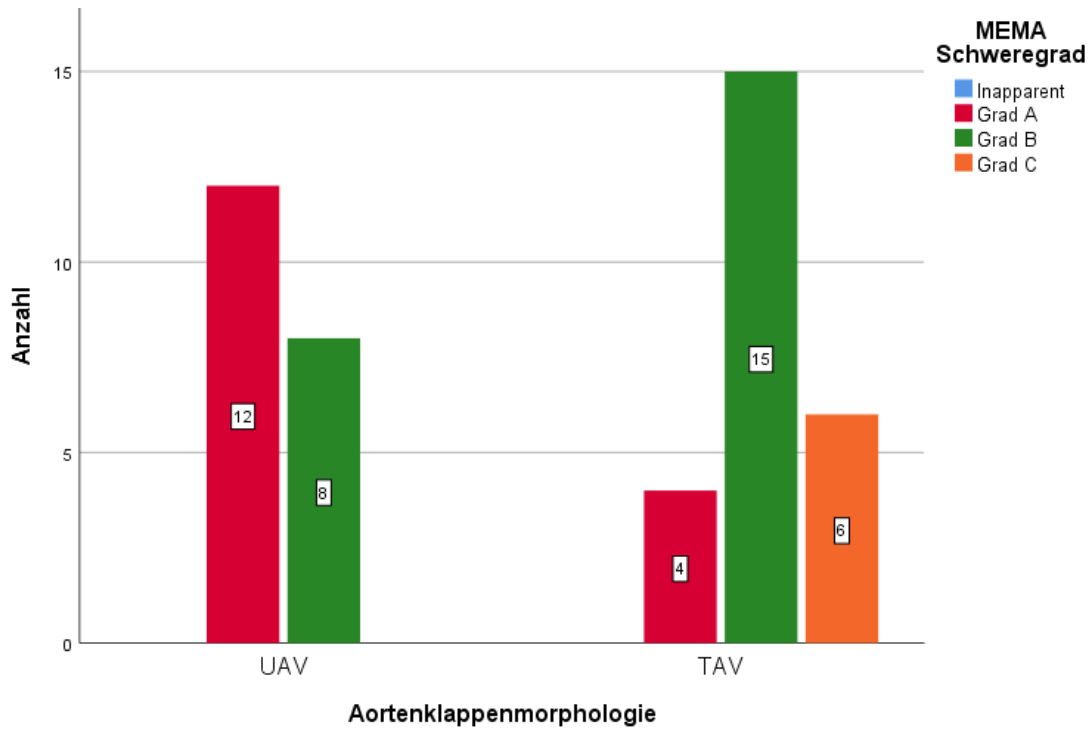


Abbildung 16 – Balkendiagramm zum MEMA-Schweregrad nach Klappenmorphologie in der Subanalyse junger Individuen. Während die Y-Achse die absolute Häufigkeit darstellt, zeigt die X-Achse den Vergleich von Individuen mit UAV und TAV, ohne dabei den Dilatationsstatus zu berücksichtigen. Die verschiedenen Schweregrade sind farblich kodiert. Die Legende findet sich rechts im Bild. Die weißen Kästchen zeigen die absolute Häufigkeit der jeweiligen Merkmalsausprägung pro Vergleichsgruppe. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspide Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspide Aortenklappe.

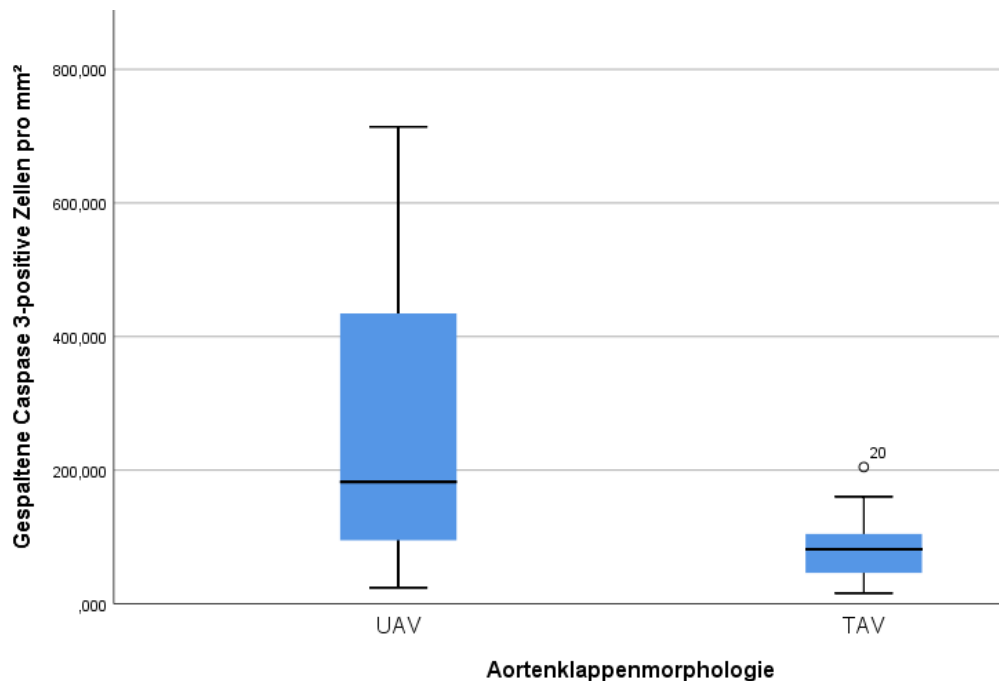


Abbildung 17 – Boxplot zur Anzahl apoptotischer Zellen pro mm² nach Aortenklappenmorphologie. Vor allem bei Individuen mit UAV wird eine starke Streuung der Anzahl von Zellen mit Nachweis gespaltener Caspase 3 beobachtet. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspide Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspide Aortenklappe.

4.8.2 Subanalyse junger Individuen: Vergleich dilatierter und nicht-dilatierter Aorten ohne Betrachtung der Klappenmorphologie

Hinsichtlich des luminalsten morphologisch abgrenzbaren VV gibt es in dieser Subanalyse junger Individuen keinen Unterschied zwischen dilatierten und nicht-dilatierten Aorten ($p=0,195$). Auch hinsichtlich der eNOS-Positivität der Tunica intima ($p=0,157$) und der VV ($p=0,478$) zeigten sich aneurysmatische und normale Aorten vergleichbar. Gleiches gilt für die Annäherung der okkulten VV an das Lumen der Aorta sowohl für den Nachweis mittels eNOS- ($p=0,899$) als auch CD31-Immunhistochemie ($p=0,982$). Auch die Anzahl apoptotischer Zellen pro mm² zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dilatierten und nicht-dilatierten Aorten ($p=0,098$). Hinsichtlich der MEMA zeigten sich keine Unterschiede der Subklassifikation ($p=0,371$) oder der Ausdehnung ($p=0,315$). Allerdings wiesen dilatierete Aorten signifikant schwerere MEMA ($p=0,011$) und einen signifikant weiter ausgedehnten SMC-Kernverlust ($p=0,045$) auf.

4.8.3 Subanalyse junger Individuen: Vergleich dilatierter Aorten bei UAV und TAV

Im Vergleich dilatierter Aorten von Individuen mit UAV und TAV konnte für keinen der erfassten Parameter ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 8).

Parameter	P-Wert
Eindringtiefe morphologisch abgrenzbarer VV	1
Okkulte VV – eNOS-Analyse	1
Okkulte VV – CD31-Analyse	1
eNOS-Positivität Tunica intima	1
eNOS-Positivität VV	1
Anzahl apoptotischer Zell	0,792
Ausdehnung SMC-Kernverlust	1
MEMA Subtyp	1
MEMA Ausdehnung	1
MEMA Schweregrad	0,107

Tabelle 8 –Vergleich dilatierter Aorten von Individuen mit UAV und TAV in der Subanalyse junger Individuen. Hinsichtlich der durchgeführten Analysen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Aorten von jungen Individuen mit UAV und dilatierter Aorta und jungen Individuen mit TAV und dilatierter Aorta. Abkürzungen: CD31 – Cluster of Differentiation 31; eNOS – endotheliale Stickoxid Synthase, MEMA – Mukoide extrazelluläre Matrixakkumulation; SMC – Englisch: Smooth muscle cell, Deutsch: Glatte Muskelzelle; VV – Vasa vasorum.

Lediglich für den Schweregrad der MEMA gab es eine schwache Tendenz für einen schwereren Befall dilatierter Aorten von Individuen mit TAV (Abbildung 18).

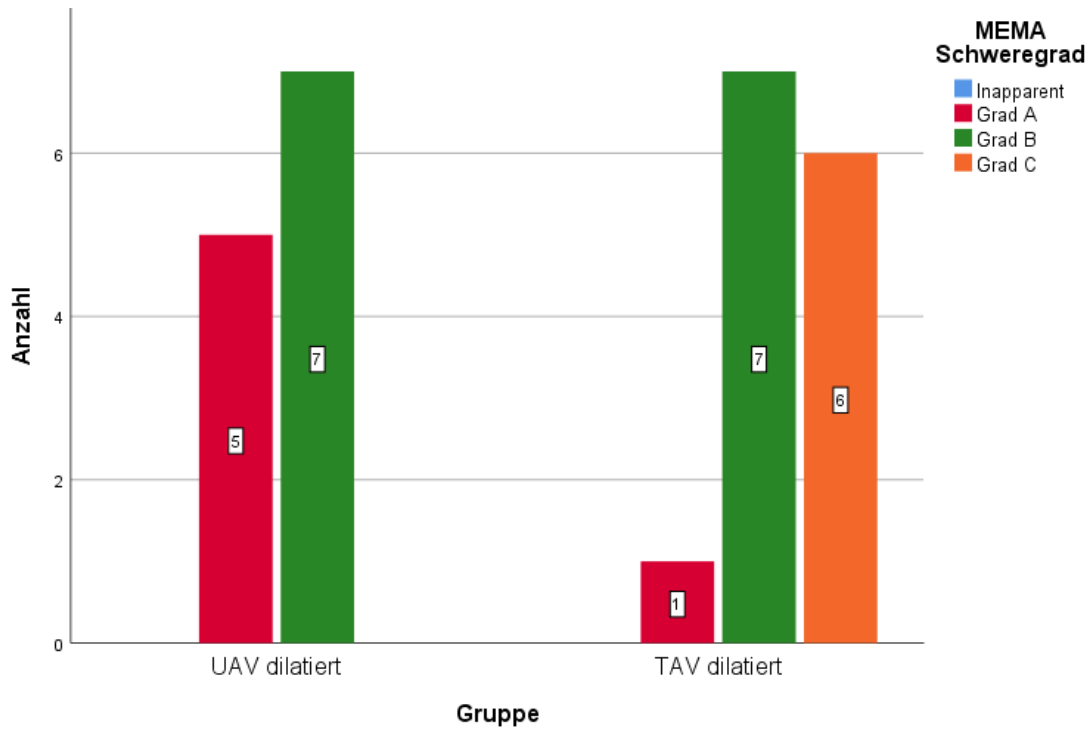


Abbildung 18 – Balkendiagramm zum MEMA-Schweregrad im Vergleich dilatierter Aorten von Individuen mit TAV und UAV in der Subanalyse junger Individuen. Die Y-Achse stellt die absolute Häufigkeit dar. Die X-Achse zeigt die beiden Vergleichsgruppen von Individuen mit dilatierter Aorta und UAV beziehungsweise dilatierter Aorta und TAV. Die verschiedenen Schweregrade werden farblich kodiert. Die Legende findet sich rechts im Bild. Die weißen Kästchen zeigen die absolute Häufigkeit der jeweiligen Merkmalsausprägung pro Gruppe. Abkürzungen: Tricuspid aortic valve, Deutsch: Trikuspide Aortenklappe; UAV – Englisch: Unicuspid aortic valve, Deutsch: Unikuspide Aortenklappe.

5 Diskussion

5.1 Hintergründe und Diskussion der Ergebnisse

Die Pathophysiologie der Aneurysmenbildung der thorakalen Aorta umfasst eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren [27]. Zu diesen zählen unter anderem inflammatorische [34] oder genetische Veränderungen der Aortenwand [27]. Wie sich diese verschiedenen Prozesse histomorphologisch darstellen wurde in zwei Konsensus-Arbeiten der entsprechenden Fachgesellschaften zusammengefasst [11], [34]. Nach einer Literaturrecherche wurden nach dem Vorbild dieser Konsensus-Arbeiten folgende Parameter in der vorliegenden Studie untersucht: VV, eNOS, Apoptose, SMC-Kernverlust und MEMA.

5.1.1 Vasa vasorum

Die Anatomie der VV wird in der Literatur sehr heterogen beschrieben [11], [85]–[87]. Die Konsensus-Arbeit betrachtet lediglich VV in der Tunica adventitia und dem sub-adventitiellen Drittel der Tunica media als physiologisch [11]. Andere Arbeiten wiesen VV in der gesamten Aortenwand nach [85]–[87].

Anatomisch kann man zwischen VV internum und VV externum unterscheiden [88]. Die VV externum sind die Gefäße, die über die Tunica adventitia in die Aortenwand einwachsen [88]. Diese entspringen für die Aorta ascendens aus den Koronararterien und dem Truncus brachiocephalicus [89]. Die aus diesen Arterien entspringenden VV werden auch als VV erster Ordnung bezeichnet [89]. Diese VV erster Ordnung geben VV zweiter Ordnung ab, die sich weiter in der Tunica adventitia und der Tunica media verzweigen [89]. Die VV internum entspringen direkt aus dem Gefäßlumen der Aorta [88], sie sind selten [85]. Der venöse Abfluss der VV entspringt im inneren Drittel der Tunica media [90]. Die arteriovenösen Anastomosen der VV sind ebenfalls im inneren Drittel der Tunica media lokalisiert [90].

Die Konsensus-Arbeit zur Aortenpathologie fokussiert auf die Standardisierung der histopathologischen Beurteilung der Aortenwand [11]. Entsprechend wurden für diese lediglich morphologische Parameter und keine besonderen Nachweisverfahren wie Mikroangiographien berücksichtigt [11]. Daher scheint die Konsensus-Arbeit auch nur

solche VV zu berücksichtigen, die in der vorliegenden Studie als morphologisch-abgrenzbare VV definiert wurden [11].

Wie auch bereits beschrieben, suggerieren unsere Daten, dass das Einwachsen der morphologisch abgrenzbaren VV einen Teil der Kompensationsmechanismen im Rahmen von Schädigungen der Gefäßwand darstellt. Dies wurde auch bereits durch andere Arbeiten gezeigt [89].

Kleinste Gefäße, welche die gesamte Aortenwand durchspannen, konnten bereits mit verschiedenen Methoden, wie beispielsweise der Mikroangiographie [90] oder Immunhistochemie [86], [87], nachgewiesen werden. Hinsichtlich dieser Vorbefunde lassen sich die von uns als okkulte VV definierten Gefäße am ehesten als Kapillaren der VV einstufen. Weitere und größere Arbeiten sind erforderlich um den pathologischen Stellenwert dieser kleinsten Gefäße zu erfassen. Die vorliegende Studie zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen dilatierten und nicht-dilatierten Aorten hinsichtlich der okkulten VV bestehen. Auch der Vergleich von Aorten von Individuen mit UAV und TAV zeigte keine Unterschiede hinsichtlich der okkulten VV.

Nicht nur in Blutgefäßen, sondern auch in Lymphgefäßen findet man Endothelzellen [7]. Entsprechend könnten die von uns als okkulte VV bezeichneten Gefäße auch lymphatische Gefäße darstellen. Zum lymphatischen Abfluss der Aortenwand liegen aktuell nur rudimentäre Daten vor [91], [92]. Einzelne Studien suggerieren einen Beteiligung des aortalen Lymphabflusses in der Pathogenese der Atherosklerose [93], [94]. In der vorliegenden Arbeit kann nicht näher spezifiziert werden um welche Art von Gefäß es sich bei den sogenannten okkulten VV genau handelt. Weitere Studien zur detaillierten Beschreibung der Mikrozirkulation der Aortenwand sind erforderlich.

5.1.2 Endotheliale Stickoxidsynthase

Viele Daten zur eNOS im Zusammenhang mit kongenitaler Fehlbildung der Aortenklappe stammen aus der Untersuchung von homogenisiertem Aortengewebe [56], [63], [74]. Entsprechend der Methodik konnten diese Arbeit das Ausmaß der Protein- [56], [74] oder mRNA-Expression [63], [74] quantifizieren. Durch die Nutzung von homogenisiertem Gewebe ist allerdings keine Aussage zur Lokalisation der eNOS innerhalb der Aortenwand möglich. In der vorliegenden Studie verhält es sich umgekehrt.

Die basierend auf der Immunhistochemie durchgeführten Analysen erlauben die Lokalisation der eNOS in der Aortenwand, aber keine Quantifizierung der Expression.

Sowohl die Tunica intima, als auch die VV beinhalten Endothelzellen [7]. Über das Endothel sind somit beides potentielle Lokalisationen der eNOS [95]. Die Tunica intima kleidet mit Ihrem Endothel das Aortenlumen aus [7]. Die VV hingegen stellen ein Netz dar, welches die Aortenwand komplett durchspannt [85]–[87], [90]. Es kann also angenommen werden, dass mehr Endothelzellen in den VV, als in der Tunica intima liegen. Um dies zu belegen sind weitere Studien erforderlich.

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass der relative Anteil eNOS-positiver Zellen in Tunica intima und VV vergleichbar ist. Somit könnte aus einem definiertem Stück Aortenwand absolut mehr eNOS aus den VV stammen als aus der Tunica intima der Aortenwand. Entsprechend ist unklar, ob in den bisherigen Untersuchungen die Ergebnisse der eNOS-Analysen [56], [63], [74] nicht letztendlich ein Epiphänomen der VV darstellten. Tiefergreifende Analysen sind erforderlich um dies abschließend zu klären. Außerdem ist nicht bekannt, wie sich pathologische Veränderungen der VV [96] auf die Verteilung der VV, beziehungsweise die eNOS-Expression und-Verteilung auswirken. Auch zur Klärung dieser Fragestellung sind weitere, tiefgreifendere Studien erforderlich.

Die eNOS ist nicht spezifisch für Endothel [66], [95], [97]. Das Enzym ließ sich neben SMCs [66] oder Zellen des Immunsystems [95] auch in Nerven [95], [97] nachweisen. Dies konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden.

Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass sympathische Nervenfasern parallel zu den VV bis zur Tunica intima in die Aortenwand vordringen [98]. Es wäre somit also denkbar, dass auch die Innervation der Aortenwand Einfluss auf die Ergebnisse der eNOS-Analysen nimmt. Es lässt sich annehmen, dass durch die vergleichende Analyse von CD31 als Endothelmarker [75] und eNOS der Einfluss des parallelen Verlaufs von Nervenfasern und VV [98] auf die Analyse der okkulten VV kontrolliert sein sollte. Studien, die den Zusammenhang zwischen Innervation und eNOS-Expression in der Aorta untersuchen liegen bislang nicht vor. Die in dieser Studie genutzte Methodik lässt hierzu keine Aussage zu. Weitere Studien werden benötigt um diesen Zusammenhang zu klären.

5.1.3 SMC-Kernverlust und Apoptose

Der SMC-Kernverlust gilt als typischer Befund im Zusammenhang mit der BAV [11], aber auch im Zusammenhang mit der altersassoziierten Degeneration der Aortenwand [11]. Beim SMC-Kernverlust handelt es sich um einen rein deskriptiven Parameter, der lediglich beschreibt, in welchem Areal sich keine Zellkerne der SMCs nachweisen lassen [11]. Die Ursache für diesen Zellverlust wird dabei nicht berücksichtigt [11]. Mehrere Ursachen wie beispielsweise Fibrose [11] oder Apoptose [68] sind möglich. Apoptose konnte beispielsweise im Zusammenhang mit der BAV nachgewiesen werden [68]. Dabei ist die Ursache der Apoptose ungeklärt [68].

Für den Zelluntergang in der Aortenwand spielt unter anderem die Mechanotransduktion eine Rolle [99]. So induziert beispielsweise der Verlust des Kontaktes der SMC zur extrazellulären Matrix eine Anoikis, eine Sonderform der Apoptose [99].

Zur Relevanz der Apoptose bei UAV liegen bisher kaum Daten vor. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten suggerieren auch für die Degeneration der Aorta in Assoziation mit einer UAV eine Relevanz der Apoptose. Die Aorten von Individuen mit UAV, mit und ohne Dilatation, wiesen in den verschiedenen Vergleichen mehr Apoptose auf als Aorten von Individuen mit TAV. Dieser Befund sollte aufgrund des signifikanten Altersunterschiedes und der geringen Fallzahl in der Subanalyse junger Individuen in größeren altersadjustierten Studien validiert werden. Da der SMC-Kernverlust ein typischer altersassoziiertes Befund ist, nimmt mit dem Alter die Anzahl der SMC in der Aortenwand ab [11]. Damit bildet die Zellzahl pro mm² einen potentiellen Confounder dieser Analyse. Auch dies unterstreicht die Notwendigkeit der Validierung der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse in größeren, altersadjustierten Studien.

5.1.4 Mukoide extrazelluläre Matrixakkumulation

Wie auch der SMC-Kernverlust, ist auch die MEMA ein anderer typischer Befund sowohl in Assoziation mit kongenitaler Fehlbildung der Aortenklappe [11], [47], [72], als auch altersassoziierten Degeneration der Aortenwand [11]. Die MEMA wurde in der Vergangenheit sowohl uneinheitlich benannt [11], als auch uneinheitlich definiert [59], [70]–[72]. Erst mit der Konsensus-Arbeit zur Aortenpathologie kam eine einheitliche Nomenklatur und Definition dieses Parameters [11].

Die Mukopolysaccharide, die die MEMA bilden sind ein physiologischer Bestandteil der Aortenwand [100]. Sie tragen zu den mechanischen, sogenannten viskoelastischen

Eigenschaften der Aortenwand bei [100]. Erst ein vermehrtes Aufkommen, macht Mukopolysaccharide zu einem pathologischen Befund [11]. Aufgrund Ihrer chemischen Eigenschaften können diese Moleküle elastische Fasern degenerieren [100]. Ab welcher Menge die Mukopolysaccharide einen destruktiven Einfluss entfalten ist nicht bekannt. Zusammenfassend stellt die MEMA somit nicht nur einen histomorphologischen Parameter dar [11], sondern trägt zusätzlich ein intrinsisches Potential der Destruktion der Aortenwand [100]. Somit sehen wir die MEMA als einen zentralen Parameter mit Hinblick auf die Aggressivität der Degeneration der Aortenwand. Diese These lässt sich durch histopathologische Befunde im Zusammenhang mit Bindegewebserkrankungen stützen. So beobachtet man beispielsweise beim Marfan-Syndrom exzessive translamellare MEMA [11]. Im Rahmen dieses Syndroms kommt es früh im Leben zur Dilatation der Aorta [29], [30]. Zusätzlich besteht ein ausgesprochen hohes Risiko für aortale Komplikationen, wie beispielsweise die Aortendissektion [29], [101].

Wie sich auch in den Leitlinien zu Erkrankungen der Körperschlagader niederschlägt [102], ist man lange von einem deutlich erhöhten Risiko für aortale Komplikationen im Zusammenhang mit der BAV ausgegangen [49], [102]. Diese Annahme stützte sich unter anderem auf alte Autopsie-Studien [49]. Das Risiko für Aortendissektionen bei Vorliegen einer BAV wurde als um das 9-fache erhöht beschrieben, im Vergleich zum Vorliegen einer TAV [49]. In der Zwischenzeit wurden unter Berücksichtigung epidemiologischer Einflussfaktoren [101] neuere Daten erhoben [103]–[105]. Diese zeigen, dass das Risiko für eine Aortendissektion im Zusammenhang mit der BAV deutlich geringer ist als bisher angenommen [103]–[105].

Basierend auf alten Autopsie-Studien gilt das Risiko für das Auftreten von Aortendissektionen bei UAV als um das 18-fache erhöht im Vergleich zu Individuen mit TAV [49]. Anders wie bei der BAV gibt es hier allerdings keine epidemiologischen Daten, um dies zu verifizieren oder zu falsifizieren. Dies ist unter anderem damit zu begründen, dass es sich um eine seltene kardiale Fehlbildung handelt [41], welche im echokardiographischen Screening nur schwer von der BAV abzugrenzen ist [41] und somit in Ihrer Inzidenz wahrscheinlich unterschätzt wird [42].

In der vorliegenden Arbeit zeigten Aneurysmen bei unikuspider Aortenklappenmorphologie keine Zeichen einer aggressiven Degeneration der Aortenwand im Sinne einer exzessiven translamellaren MEMA. Dies lässt sich einen Hinweis werten, dass die Veränderungen der Aortenwand im Zusammenhang mit der UAV, in Analogie zur BAV, nicht so aggressiv sind, wie bisher angenommen. Um dies mit ausreichender Sicherheit zu bestätigen, sind sowohl größere histopathologische Untersuchungen, als auch epidemiologische Studien zum natürlichen Verlauf von Individuen mit UAV und assoziierten Aneurysmen von Nöten.

5.2 Beantwortung der Fragestellung

5.2.1 Unterscheiden sich Aorten bei UAV und TAV hinsichtlich der VV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Analyse der morphologisch abgrenzbaren VV, dass Gefäße bei dilatierten Aorten tiefer in die Tunica media einwachsen, als bei nicht-dilatierten Aorten. Dies konnte auch in anderen Studien gezeigt werden [11], [32], [89]. Der Vergleich der Aortenwand von Individuen mit UAV und TAV zeigte, dass in Aorten von Individuen mit TAV ein tieferes Einwachsen großer VV in die Tunica media beobachtet wird. Dabei weist die Subanalyse junger Individuen auf einen relevanten Einfluss des Alterns auf das Einwachsen der VV hin. Dieser Befund steht im Kontrast zur Konsensus-Arbeit. In dieser gilt nur das Einwachsen von VV bis in das äußere Drittel der Tunica media als physiologischer Prozess im Rahmen der Alterung [11]. Folglich implizieren die Befunde der vorliegenden Arbeit neben dem Alter weitere Faktoren, die zum tieferen Einwachsen der VV bei Individuen mit TAV führen.

Die Analyse der okkulten VV in dieser Studie erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Versteht man die okkulten VV als Kapillaren der VV, so scheint unabhängig von Dilatation und Klappenmorphologie zumindest morphologisch eine intakte Mikrozirkulation zu bestehen. Weiterführende Analysen der VV in der Tunica media zu deren Perfusion sind erforderlich, da beispielsweise eine Hypoperfusion der VV der Tunica adventitia zur Degeneration der Aortenwand beitragen kann [33].

5.2.2 Unterscheidet sich die Verteilung der eNOS in Aorten von Individuen mit UAV und TAV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?

Die Beurteilung der Verteilung der eNOS in der Aortenwand beruht auf der Interpretation der eNOS-Positivität im Kontext der Daten zu den VV (siehe Kapitel 5.1.1 und 5.1.2). Hinsichtlich der eNOS-Positivität konnten keine Unterschiede zwischen den VV und der Tunica intima festgestellt werden. Entsprechend war wahrscheinlich ein Großteil der eNOS in den VV lokalisiert. Weitere Arbeiten sind erforderlich, um genauer zu determinieren, welche eNOS-Quelle in welchem Ausmaß zur eNOS-Expression in der Aortenwand beiträgt. Dies wird eine neue Grundlage und ein tieferes Verständnis für die

Interpretation der bestehenden Daten zur eNOS [56], [63], [64], [74] liefern. So könnte vielleicht auch die beobachtete Heterogenität der Daten zur eNOS [64] erklärt werden beziehungsweise verstanden werden.

5.2.3 Gibt es Unterschiede im Auftreten von Apoptose in der Aorta von Individuen mit UAV und TAV?

Individuen mit UAV zeigten in der vorliegenden Analyse signifikant mehr apoptotische Zellen pro mm² als Individuen mit TAV. Der Vergleich von dilatierten und nicht-dilatierter Aorten, sowie der Gruppen-Vergleich zeigte jeweils keinen signifikanten Unterschied. Ein wesentlicher Einflussfaktor dafür könnte die große Streuung dieses Parameters gewesen sein. In Anbetracht von Streuung und kleiner Kohorte in der vorliegenden Arbeit, sind größere Studien erforderlich um die Relevanz der Apoptose für die Degeneration der Aortenwand in Assoziation mit der UAV zu bestätigen. Außerdem sollten auch ergänzend andere Methoden wie beispielsweise das in situ end-labelling von DNA-Fragmenten [68] genutzt werden, um die Befunde zu bestätigen. Da das Gewebe unmittelbar nach der Entnahme in Formalin fixiert wurde, erscheinen post-mortem Artefakte als möglicher Confounder unwahrscheinlich.

5.2.4 Bestehen Unterschiede zwischen Aorten bei UAV und TAV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus hinsichtlich des SMC-Kernverlustes?

In der vorliegenden Untersuchung war der SMC-Kernverlust ein typischer Befund. Dabei zeigten dilatierte Aorten signifikant größere Flächen mit SMC-Kernverlust als nicht-dilatierte Aorten. Dies steht im Einklang mit der Konsensus-Arbeit der Fachgesellschaften zur Aortenpathologie [11]. Im Zusammenhang mit der Aortenklappenmorphologie konnte kein Unterschied hinsichtlich des SMC-Kernverlustes festgestellt werden zwischen Individuen mit TAV und UAV. Dies passt zu den bisher publizierten histopathologischen Daten zur Aorta ascendens bei Vorliegen einer UAV [47].

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Analyse suggerieren größere Relevanz des SMC-Kernverlustes in dilatierten Aorten, als in Aorten bei fehlgebildeter Aortenklappe. Möglicherweise beruht die Einstufung des SMC-Kernverlustes als typisch für die Degeneration der Aorta bei Fehlbildung der Aortenklappe darauf, dass sowohl für die BAV [72], als auch für die UAV [47] überwiegend dilatierte Aorten bei fehlgebildeter Aortenklappe untersucht wurden. Es erscheint also fraglich, dass dieser Parameter pathophysiologisch relevant ist in der Bildung von Aorta ascendens Aneurysmen bei UAV. Weitere Studien unter anderem zur Ursachenklärung des Zellverlustes sind von Nöten um die Relevanz dieses Befundes abschließend zu beurteilen.

5.2.5 Gibt es Unterschiede hinsichtlich der MEMA in der Aortenwand von Individuen mit UAV und TAV unter Berücksichtigung des Dilatationsstatus?

Wie auch in der Konsensus-Arbeit zur Aortenpathologie dargelegt [11], war in der vorliegenden Studie die MEMA ein typischer Befund in der Aorta ascendens. Die MEMA wurde in dieser Studie unabhängig vom Vorliegen einer Dilatation oder der Aortenklappenmorphologie beobachtet. Dabei zeigten aneurysmatische Aorten signifikant häufiger den translamellaren Subtyp, eine signifikant weiter ausgedehnte MEMA und einen signifikant schwereren Befall als nicht-dilatierten Aorten. Weiter konnte in Aorten von Individuen mit TAV eine weiter ausgedehnte und eine schwerere MEMA als in Aorten von Individuen mit UAV beobachtet werden. Auch Aneurysmen bei trikuspidaler und unikuspidaler Anlage der Aortenklappe zeigten signifikante Unterschiede. Beispielsweise beobachtete man weiter ausgedehnte und schwerere MEMA bei dilatierten Aorten von Individuen mit TAV im Vergleich zu dilatierten Aorten von Individuen mit UAV.

Zusammenfassend waren insbesondere Aneurysmen bei TAV von einer schwereren Degeneration betroffen. Es zeigten also nicht Aorten von Individuen mit UAV sondern solche von Individuen mit TAV, insbesondere junger Individuen mit TAV, eine schwerwiegende Degeneration der Aortenwand. Dies steht im Kontrast zu dem beschriebenen hohen Dissektionsrisiko bei Vorliegen einer UAV [49].

5.3 Methodendiskussion und Limitationen

5.3.1 Einfluss des Untersuchers auf die Untersuchung

Bei der Intra- und Inter-Observer-Variabilität handelt es sich um wichtige Einflussfaktoren auf die Befundung eines Gewebes [106]. Dabei spielt es keine Rolle, welches Gewebe untersucht wird [106], [107]. Durch eine supervidierte Etablierung und Validierung sowie eine Stichprobenkontrolle des Untersuchers erfolgte eine Kontrolle der Inter-Observer-Variabilität in der vorliegenden Arbeit. Zusätzlich diente die fortlaufende Supervision der Qualitätssicherung der dieser Studie zugrundeliegenden Daten.

5.3.2 Einfluss der Probengewinnung und des Gewebes auf die Untersuchung

Nicht nur die Beurteilung durch den Untersucher [106], [107], sondern auch das beurteilte Gewebe unterliegt Schwankungen [108]. Dabei sind die inter-individuelle und die intra-individuelle Varianz des Gewebes zu berücksichtigen [108]. Diese Varianzen können durch das Sampling des beurteilten Gewebes teilweise kontrolliert werden [108]. Dabei unterscheidet man verschiedene Ebenen des Samplings [108]. Alle Schritte des Samplings, bis einschließlich der Paraffinblöcke haben eine große Relevanz in der Kontrolle dieser Varianzen [108]. Die verschiedenen Sampling-Ebenen und deren Einfluss auf die Varianzen werden in Abbildung 19 veranschaulicht.

Aufgrund des chirurgisch-pathologischen Rahmens der vorliegenden Arbeit konnte auf den für die Varianz-Kontrolle relevanten Ebenen kein Sampling mit ausreichender Streuung erfolgen, da sowohl Lokalisation als auch Probengröße normiert beziehungsweise limitiert waren. Entsprechend wurden die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse von der inter- und intra-individuellen Varianz beeinflusst. Um den Einfluss dieser Varianzen zu minimieren wurden die Serienschnitte zufällig auf die verschiedenen Färbungen verteilt und die Gesichtsfelder in der Analyse der Immunhistochemien in einem sogenannten Systematic Random Sampling [83], [108] ausgewählt.



Abbildung 19 – Sampling-Ebenen und ihr Einfluss auf die Varianzen. Die Abbildung basiert auf den Ergebnissen stereologischer Analysen [108]. Dargestellt sind die verschiedenen Ebenen des Samplings. Ab der Ebene der Schnitte ist der Einfluss auf die Varianzen des Gewebes limitiert [108]. Abkürzungen: ROI – Englisch: Region of Interest; Deutsch: Für die Untersuchung interessante Region.

5.3.3 Einfluss der gewählten Methodik auf die Untersuchung

In der vorliegenden Studie ist die Fläche des untersuchten Gewebes von Relevanz. Zum einen wurde diese zur Normierung genutzt. Zum anderen spielte die von einem Befund betroffene Fläche zur Graduierung der histomorphologischen Parameter eine Rolle [11]. Entsprechend wurde die Anschnittfläche zur internen Kontrolle miterfasst. Entscheidend ist, dass alle vier Gruppen hinsichtlich der Anschnittfläche vergleichbar waren. Somit stellte die Anschnittfläche keinen Confounder der durchgeführten Analysen dar.

Durch den Einfluss der Fläche und die Maßgaben der Fachgesellschaften [11], [34], [109] lässt sich auch der Ausschluss der nur teilweise in transversal Ebene angeschnittenen Probe begründen. Durch den schiefen Anschnitt hätte in dieser Probe nur eine künstlich verkleinerte Fläche untersucht werden können. In die Analyse der gespaltenen Caspase 3 wurde die Probe dennoch eingeschlossen, da die Normierung hier über die Fläche der Gesichtsfelder erfolgte und eine ausreichende Anzahl an Gesichtsfeldern vorlag.

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden in dieser Studie immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dabei kamen zwei verschiedene Methoden der Immunhistochemie zur Anwendung (Abbildungen 20 und 21). In allen Immunhistochemien wurde das DAB als Chromogen verwendet. Dieses zeigte, in dem von uns untersuchten Gewebe, in der Etablierung den höchsten Kontrast zur

verwendeten Gegenfärbung im Vergleich zu anderen gängigen Chromogenen, wie beispielsweise dem 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) [80].

Eine andere Option zur spezifischen Darstellung eines Antigens wäre beispielsweise die Immunfluoreszenz gewesen [80]. Bei der Immunfluoreszenz ist die sogenannte Autofluoreszenz des Gewebes ein wichtiger Einflussfaktor auf die durchgeführten Analysen [80]. Das Aortengewebe besitzt eine nicht unerhebliche Autofluoreszenz [110]. Auch wenn es Techniken zur Suppression der Autofluoreszenz gibt [80], sind keine Daten zur Aortenwand verfügbar, ob diese Techniken eventuell selbst Artefakte schaffen. Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit die immunhistochemische Darstellung bevorzugt, da diese eine solche Suppression nicht benötigt.

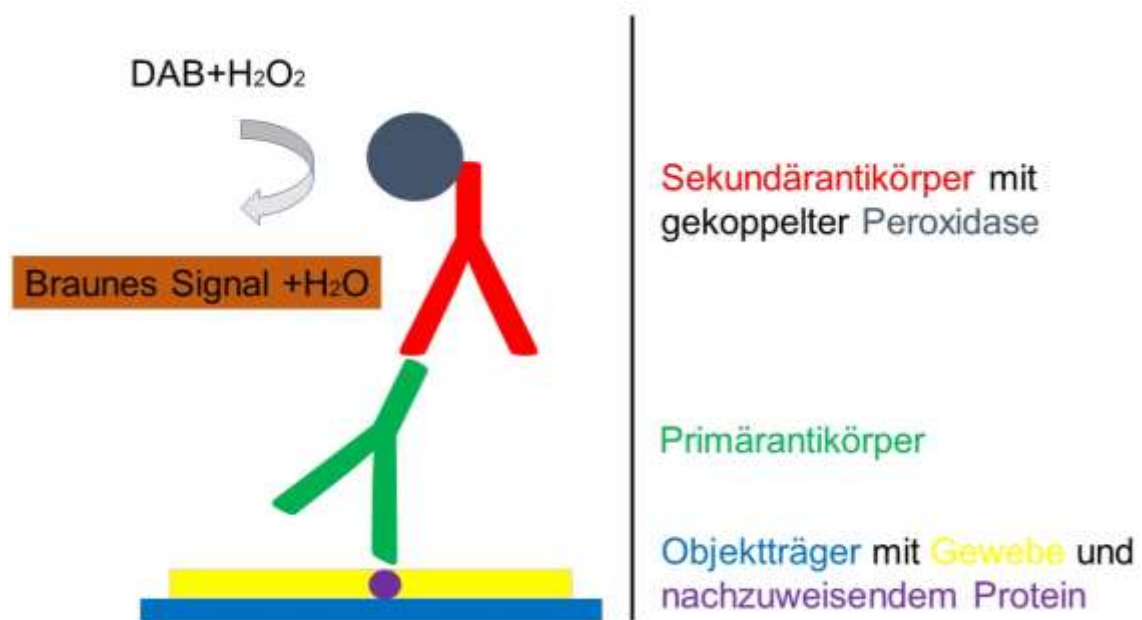


Abbildung 20 – Immunhistochemie mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Abbildung zeigt schematisch eine Immunhistochemie, bei der ein Sekundärantikörper verwendet wird mit gekoppelter Peroxidase. In der vorliegenden Studie wurde dieses Verfahren zum Nachweis von CD31 verwendet. Weitere Informationen zu dieser Technik sind Kapitel 3.3.3 zu entnehmen. Abkürzungen und chemische Formeln: CD31 – Cluster of Differentiation 31; DAB = 3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid; H₂O₂ = Wasserstoffperoxid; H₂O = Wasser.

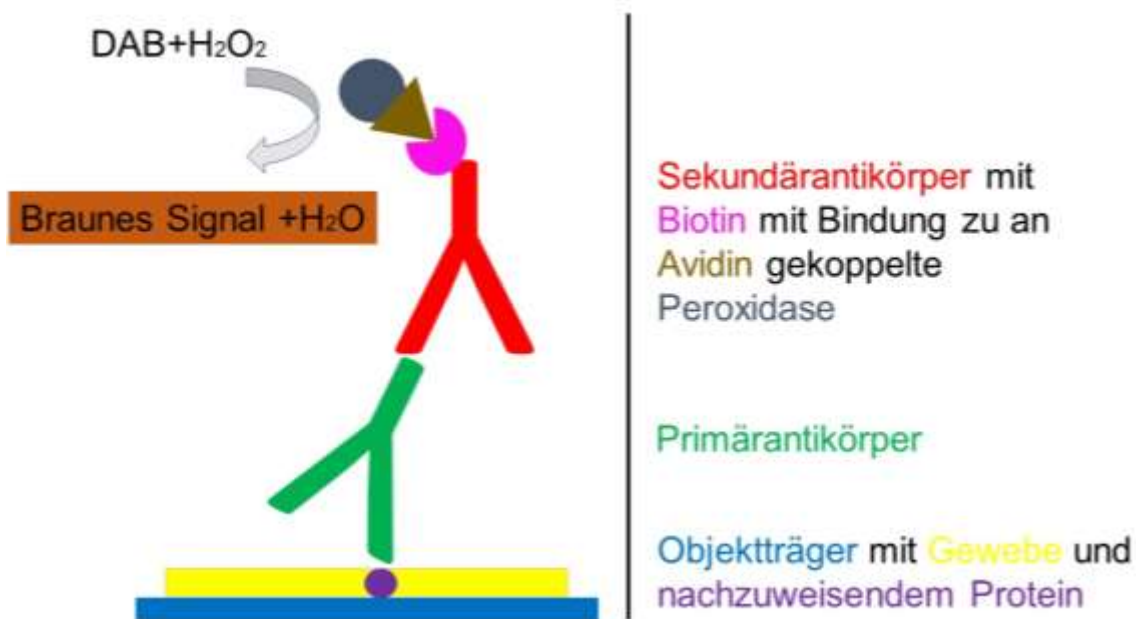


Abbildung 21 – Immunhistochemie in ABC-Technik. Die Abbildung zeigt die Funktionsweise der sogenannten ABC-Technik in der Immunhistochemie. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Studie zum Nachweis der gespaltenen Caspase 3 und der eNOS verwendet. Weitere Informationen zu dieser Technik sind Kapitel 3.3.3 zu entnehmen. Abkürzungen und Formeln: ABC – Englisch: Avidin-Biotin-Complex, Deutsch: Avidin-Biotin-Komplex; DAB = 3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid; eNOS – Englisch: Endothelial nitric oxide synthase, Deutsch: Endotheliale Stickoxidsynthase; H₂O₂ = Wasserstoffperoxid; H₂O = Wasser.

5.3.4 Einfluss der Statistik auf die Untersuchung

Das Gewebe der Aorta ascendens besitzt eine Komplexe dreidimensionale Architektur [10] und wird durch ein breites Spektrum verschiedenster Pathologien [11], [34] sowie der physiologischen Alterung [11], [84], [111] beeinflusst. Deshalb ist eine Vielzahl verschiedener Parameter von Nöten um die Aorta in Gänze adäquat zu beschreiben [11], [34]. Entsprechend gibt es ein breites Spektrum an Confoundern, Mediatoren und Moderatoren, die im Rahmen dieser Arbeit weder in Gänze erfasst noch kontrolliert werden können. Zusätzlich wäre entsprechend eine große Fallzahl für eine aussagekräftige statistische Auswertung von Nöten [112]. Allerdings ist die Fallzahl, der histologisch zu untersuchenden Individuen limitiert, da nicht beliebig viele Individuen an der Aorta ascendens, beziehungsweise der Aortenklappe operiert werden können. Außerdem stellt die UAV eine seltene Fehlbildung dar [36], [48]. Obwohl die vorliegende

Arbeit mit 74 untersuchten Gewebeproben eine im Vergleich zu anderen Studien [39], [59] große Kohorte untersucht, ist auch diese Arbeit aus statistischer Sicht trotzdem von limitierter Aussagekraft [112]. Entsprechend gibt es eine nicht unwesentliche Wahrscheinlichkeit in den statistischen Testungen einem Beta-Fehler zu unterliegen [112].

Weiteren Einfluss auf die statistische Testung hat das sogenannte multiple Test-Problem [112]. Um dessen Einfluss so gering wie möglich zu halten, wurde zum einen versucht die Anzahl an statistischen Tests so gering wie möglich zu halten und zum anderen wurden die p-Werte adjustiert.

Resultierend aus der limitierten statistischen Aussagekraft und multiplen Tests ist Vorsicht bei der Interpretation der p-Werte angebracht. Insgesamt hatten die Analysen einen explorativen Charakter und erlauben keine kasuistischen Schlussfolgerungen.

5.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Auch wenn es Parallelen zwischen UAV- und BAV-assoziiierter Degeneration gibt [11], handelt es sich bei der UAV-assoziierten Degeneration der Aortenwand um eine eigenständige Entität [113]. Weiterreichende Studien werden benötigt, um die genauen Unterschiede und die wirkliche klinische Bedeutung der Degeneration der Aorta ascendens bei Vorliegen einer UAV zu charakterisieren.

Interessanterweise zeigte diese Studie, dass die Degeneration der Aorta ascendens im Zusammenhang mit UAV weniger histologische Stigmata einer aggressiven Degeneration trägt als die TAV-assoziierten Veränderungen der Aortenwand. Weiter zeigten sich Hinweise, dass Apoptose ein möglicherweise relevanter Prozess im Zusammenhang mit Veränderungen der Aortenwand bei UAV darstellt. Ferner konnte bestätigt werden, dass VV tiefer in die Aorta reichen [86], [87] als weithin angenommen [11]. Außerdem zeigten sich histomorphologische Hinweise, dass der SMC-Kernverlust in der Degeneration bei Aneurysmen möglicherweise relevanter ist als bei den intrinsischen Veränderungen der Aortenwand in Assoziation mit einer UAV.

Somit gibt die vorliegende Studie histomorphologische Hinweise, dass die Degeneration der Aortenwand in Assoziation mit UAV, in Analogie zu neueren Daten bei der BAV, weniger aggressiv ist als ältere Studien suggerierten [49]. Zur Überprüfung dieser Befunde sind sowohl tiefergehende und größer angelegte histologische Studien, als

auch epidemiologische Studien notwendig. Angesichts detektierter Analogien zwischen BAV- und UAV-assoziiierter Degeneration der Aortenwand in histologischen Arbeiten [11], [47] scheinen auch vergleichbar epidemiologische Daten möglich. Letztendlich sollte das Ziel sein, auf einer besseren Datenlage basierend, eine fundierte Indikationsstellung für die präventive Chirurgie eines Aneurysmas in Assoziation mit UAV zu definieren. Interessanterweise demonstrierte die vorliegende Studie eine relevante Degeneration der Aorta ascendens bei, insbesondere jungen, Individuen mit TAV. Entsprechend sollten pathologische, klinische und epidemiologische Studien ein vermehrtes Augenmerk auf diese Subpopulation legen. So kann überprüft werden, ob es in dieser Subpopulation mit TAV gegebenenfalls eine besondere, bisher nicht ausreichend charakterisierte Form nicht-syndromaler Aortenaneurysmen gibt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] H. Gray, *The Classic Collector's Edition Grays's Anatomy*, 15. Aufl. New York: Galley Press, 1988.
- [2] M. Loukas, E. Bilinsky, S. Bilinsky, C. Blaak, R. S. Tubbs, und R. H. Anderson, „The anatomy of the aortic root“, *Clin. Anat. N. Y. N.*, Bd. 27, Nr. 5, S. 748–756, Juli 2014, doi: 10.1002/ca.22295.
- [3] J. P. Sutton, S. Y. Ho, und R. H. Anderson, „The forgotten interleaflet triangles: a review of the surgical anatomy of the aortic valve“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 59, Nr. 2, S. 419–427, Feb. 1995, doi: 10.1016/0003-4975(94)00893-c.
- [4] K. B. Campbell, E. A. Rhode, R. H. Cox, W. C. Hunter, und A. Noordergraaf, „Functional consequences of expanded aortic bulb: a model study“, *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Bd. 240, Nr. 3, S. R200–R210, März 1981, doi: 10.1152/ajpregu.1981.240.3.R200.
- [5] R. Anderson, „Clinical anatomy of the aortic root“, *Heart*, Bd. 84, Nr. 6, S. 670–673, Dez. 2000, doi: 10.1136/heart.84.6.670.
- [6] P. D. Stein, E. F. Blick, S. K. Shields, und F. Matta, „Sinus of Valsalva: a converging nozzle that contributes to stable flow in the coronary arteries“, *J. Anat.*, Bd. 225, Nr. 1, S. 94–97, Juli 2014, doi: 10.1111/joa.12192.
- [7] U. Welsch, *Welsch - Lehrbuch der Histologie*, 3. Aufl. München: Elsevier GmbH, 2010.
- [8] A. Emmott *u. a.*, „Biomechanics of the Ascending Thoracic Aorta: A Clinical Perspective on Engineering Data“, *Can. J. Cardiol.*, Bd. 32, Nr. 1, S. 35–47, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.cjca.2015.10.015.
- [9] H. Wolinsky und S. Glagov, „STRUCTURAL BASIS FOR THE STATIC MECHANICAL PROPERTIES OF THE AORTIC MEDIA“, *Circ. Res.*, Bd. 14, S. 400–413, Mai 1964, doi: 10.1161/01.res.14.5.400.
- [10] J. M. Clark und S. Glagov, „Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited“, *Arterioscler. Dallas Tex*, Bd. 5, Nr. 1, S. 19–34, Feb. 1985, doi: 10.1161/01.atv.5.1.19.
- [11] M. K. Halushka *u. a.*, „Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association For European Cardiovascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases - nomenclature and diagnostic criteria“, *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, Bd. 25, Nr. 3, S. 247–257, Juni 2016, doi: 10.1016/j.carpath.2016.03.002.

- [12] J. K. Williams und D. D. Heistad, „Structure and function of vasa vasorum“, *Trends Cardiovasc. Med.*, Bd. 6, Nr. 2, S. 53–57, Feb. 1996, doi: 10.1016/1050-1738(96)00008-4.
- [13] U.-N. Riede und M. Werner, Hrsg., *Allgemeine und Spezielle Pathologie*, 2. Aufl. Springer.
- [14] L. F. Hiratzka *u. a.*, „2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with Thoracic Aortic Disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine“, *Circulation*, Bd. 121, Nr. 13, S. e266-369, Apr. 2010, doi: 10.1161/CIR.0b013e3181d4739e.
- [15] M. H. Guo *u. a.*, „Association of Mortality and Acute Aortic Events With Ascending Aortic Aneurysm: A Systematic Review and Meta-analysis“, *JAMA Netw. Open*, Bd. 1, Nr. 4, S. e181281, 03 2018, doi: 10.1001/jamanetworkopen.2018.1281.
- [16] J. A. Elefteriades, A. Sang, G. Kuzmik, und M. Hornick, „Guilt by association: paradigm for detecting a silent killer (thoracic aortic aneurysm)“, *Open Heart*, Bd. 2, Nr. 1, S. e000169, 2015, doi: 10.1136/openhrt-2014-000169.
- [17] W. D. Clouse, J. W. Hallett, H. V. Schaff, M. M. Gayari, D. M. Ilstrup, und L. J. Melton, „Improved prognosis of thoracic aortic aneurysms: a population-based study“, *JAMA*, Bd. 280, Nr. 22, S. 1926–1929, Dez. 1998, doi: 10.1001/jama.280.22.1926.
- [18] I. Akin, S. Kische, T. C. Rehders, C. A. Nienaber, M. Rauchhaus, und H. Ince, „Endovascular repair of thoracic aortic aneurysm“, *Arch. Med. Sci. AMS*, Bd. 6, Nr. 5, S. 646–652, Okt. 2010, doi: 10.5114/aoms.2010.17075.
- [19] E. Saliba und Y. Sia, „The ascending aortic aneurysm: When to intervene?“, *Int. J. Cardiol. Heart Vasc.*, Bd. 6, S. 91–100, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.ijcha.2015.01.009.
- [20] R. R. Davies *u. a.*, „Yearly rupture or dissection rates for thoracic aortic aneurysms: simple prediction based on size“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 73, Nr. 1, S. 17–27; discussion 27-28, Jan. 2002, doi: 10.1016/s0003-4975(01)03236-2.
- [21] S. A. LeMaire und L. Russell, „Epidemiology of thoracic aortic dissection“, *Nat. Rev. Cardiol.*, Bd. 8, Nr. 2, S. 103–113, Feb. 2011, doi: 10.1038/nrcardio.2010.187.

- [22] D. Lavall, H.-J. Schäfers, M. Böhm, und U. Laufs, „Aneurysms of the ascending aorta“, *Dtsch. Arzteblatt Int.*, Bd. 109, Nr. 13, S. 227–233, März 2012, doi: 10.3238/arztebl.2012.0227.
- [23] K. Kawahito, H. Adachi, A. Yamaguchi, und T. Ino, „Preoperative risk factors for hospital mortality in acute type A aortic dissection“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 71, Nr. 4, S. 1239–1243, Apr. 2001, doi: 10.1016/s0003-4975(00)02654-0.
- [24] P. G. Hagan *u. a.*, „The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease“, *JAMA*, Bd. 283, Nr. 7, S. 897–903, Feb. 2000, doi: 10.1001/jama.283.7.897.
- [25] P. Godon, E. Bonnefoy, G. Desjeux, und P. Touboul, „Early risk factors in acute type A aortic dissection: is there a predictor of preoperative mortality?“, *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*, Bd. 42, Nr. 5, S. 647–650, Okt. 2001.
- [26] K. J. Zehr, A. Mathur, T. A. Orszulak, C. J. Mullany, und H. V. Schaff, „Surgical treatment of ascending aortic aneurysms in patients with giant cell aortitis“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 79, Nr. 5, S. 1512–1517, Mai 2005, doi: 10.1016/j.athoracsur.2004.10.039.
- [27] I. El-Hamamsy und M. H. Yacoub, „Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms“, *Nat. Rev. Cardiol.*, Bd. 6, Nr. 12, S. 771–786, Dez. 2009, doi: 10.1038/nrcardio.2009.191.
- [28] V. L. Gott, „Antoine Marfan and his syndrome: one hundred years later“, *Md. Med. J. Baltim. Md 1985*, Bd. 47, Nr. 5, S. 247–252, Nov. 1998.
- [29] D. M. Milewicz, H. C. Dietz, und D. C. Miller, „Treatment of aortic disease in patients with Marfan syndrome“, *Circulation*, Bd. 111, Nr. 11, S. e150-157, März 2005, doi: 10.1161/01.CIR.0000155243.70456.F4.
- [30] E. H. Aburawi und J. O’Sullivan, „Relation of aortic root dilatation and age in Marfan’s syndrome“, *Eur. Heart J.*, Bd. 28, Nr. 3, S. 376–379, Feb. 2007, doi: 10.1093/eurheartj/ehl457.
- [31] G. Albornoz *u. a.*, „Familial thoracic aortic aneurysms and dissections--incidence, modes of inheritance, and phenotypic patterns“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 82, Nr. 4, S. 1400–1405, Okt. 2006, doi: 10.1016/j.athoracsur.2006.04.098.
- [32] N. G. Baikoussis *u. a.*, „The implication of vasa vasorum in surgical diseases of the aorta“, *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.*, Bd. 40, Nr. 2, S. 412–417, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.ejcts.2010.11.045.
- [33] H. Tanaka *u. a.*, „Hypoperfusion of the Adventitial Vasa Vasorum Develops an Abdominal Aortic Aneurysm“, *PLoS One*, Bd. 10, Nr. 8, S. e0134386, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0134386.

- [34] J. R. Stone *u. a.*, „Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association for European Cardiovascular Pathology: I. Inflammatory diseases“, *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, Bd. 24, Nr. 5, S. 267–278, Okt. 2015, doi: 10.1016/j.carpath.2015.05.001.
- [35] A. C. Braverman, H. Güven, M. A. Beardslee, M. Makan, A. M. Kates, und M. R. Moon, „The bicuspid aortic valve“, *Curr. Probl. Cardiol.*, Bd. 30, Nr. 9, S. 470–522, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.cpcardiol.2005.06.002.
- [36] F. Mookadam *u. a.*, „Unicuspid aortic valve in adults: a systematic review“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 19, Nr. 1, S. 79–85, Jan. 2010.
- [37] H.-H. Sievers und C. Schmidtke, „A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 133, Nr. 5, S. 1226–1233, Mai 2007, doi: 10.1016/j.jtcvs.2007.01.039.
- [38] H.-J. Schäfers *u. a.*, „Bicuspidization of the unicuspid aortic valve: a new reconstructive approach“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 85, Nr. 6, S. 2012–2018, Juni 2008, doi: 10.1016/j.athoracsur.2008.02.081.
- [39] M. E. Fealey, W. D. Edwards, D. V. Miller, und J. J. Maleszewski, „Unicommissural aortic valves: gross, histological, and immunohistochemical analysis of 52 cases (1978-2008)“, *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, Bd. 21, Nr. 4, S. 324–333, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.carpath.2011.11.004.
- [40] W. C. Roberts und J. M. Ko, „Clinical and morphologic features of the congenitally unicuspid aocommissural stenotic and regurgitant aortic valve“, *Cardiology*, Bd. 108, Nr. 2, S. 79–81, 2007, doi: 10.1159/000095912.
- [41] G. M. Novaro, M. Mishra, und B. P. Griffin, „Incidence and echocardiographic features of congenital unicuspid aortic valve in an adult population“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 12, Nr. 6, S. 674–678, Nov. 2003.
- [42] R. F. Ayad, P. A. Grayburn, J. M. Ko, G. Filardo, und W. C. Roberts, „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.*, Bd. 108, Nr. 11, S. 1589–1599, Dez. 2011, doi: 10.1016/j.amjcard.2011.09.006.
- [43] W. C. Roberts und J. M. Ko, „Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation“, *Circulation*, Bd. 111, Nr. 7, S. 920–925, Feb. 2005, doi: 10.1161/01.CIR.0000155623.48408.C5.
- [44] A. K. Agnihotri, S. C. Desai, Y.-Q. Lai, M. G. Fitzsimons, A. D. Hilgenberg, und G. J. Vlahakes, „Two distinct clinical presentations in adult unicuspid aortic valve“, *J.*

- Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 131, Nr. 5, S. 1169–1170, Mai 2006, doi: 10.1016/j.jtcvs.2005.11.040.
- [45] B. M. Schaefer *u. a.*, „The bicuspid aortic valve: an integrated phenotypic classification of leaflet morphology and aortic root shape“, *Heart Br. Card. Soc.*, Bd. 94, Nr. 12, S. 1634–1638, Dez. 2008, doi: 10.1136/hrt.2007.132092.
- [46] H.-J. Schäfers, T. Kunihara, P. Fries, B. Brittner, und D. Aicher, „Valve-preserving root replacement in bicuspid aortic valves“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 140, Nr. 6 Suppl, S. S36-40; discussion S45-51, Dez. 2010, doi: 10.1016/j.jtcvs.2010.07.057.
- [47] J. Butany, P. Vaideeswar, V. Dixit, V. Lad, A. Vegas, und T. E. David, „Ascending aortic aneurysms in unicommissural aortic valve disease“, *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, Bd. 18, Nr. 1, S. 11–18, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.carpath.2007.12.004.
- [48] F. Mookadam, V. R. Thota, A. M. G. Lopez, U. R. Emani, und A. J. Tajik, „Unicuspid aortic valve in children: a systematic review spanning four decades“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 19, Nr. 6, S. 678–683, Nov. 2010.
- [49] E. W. Larson und W. D. Edwards, „Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases“, *Am. J. Cardiol.*, Bd. 53, Nr. 6, S. 849–855, März 1984, doi: 10.1016/0002-9149(84)90418-1.
- [50] S. Verma und S. C. Siu, „Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 370, Nr. 20, S. 1920–1929, Mai 2014, doi: 10.1056/NEJMra1207059.
- [51] T. Liu *u. a.*, „Bicuspid Aortic Valve: An Update in Morphology, Genetics, Biomarker, Complications, Imaging Diagnosis and Treatment“, *Front. Physiol.*, Bd. 9, S. 1921, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01921.
- [52] C. H. Yap, N. Saikrishnan, G. Tamilselvan, N. Vasilyev, und A. P. Yoganathan, „The congenital bicuspid aortic valve can experience high-frequency unsteady shear stresses on its leaflet surface“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Bd. 303, Nr. 6, S. H721-731, Sep. 2012, doi: 10.1152/ajpheart.00829.2011.
- [53] P. Entezari *u. a.*, „From unicuspid to quadricuspid: influence of aortic valve morphology on aortic three-dimensional hemodynamics“, *J. Magn. Reson. Imaging JMRI*, Bd. 40, Nr. 6, S. 1342–1346, Dez. 2014, doi: 10.1002/jmri.24498.
- [54] A. J. Barker *u. a.*, „Bicuspid aortic valve is associated with altered wall shear stress in the ascending aorta“, *Circ. Cardiovasc. Imaging*, Bd. 5, Nr. 4, S. 457–466, Juli 2012, doi: 10.1161/CIRCIMAGING.112.973370.
- [55] T. M. Tadros, M. D. Klein, und O. M. Shapira, „Ascending aortic dilatation associated with bicuspid aortic valve: pathophysiology, molecular biology, and

- clinical implications“, *Circulation*, Bd. 119, Nr. 6, S. 880–890, Feb. 2009, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.795401.
- [56] D. Aicher, C. Urbich, A. Zeiher, S. Dimmeler, und H.-J. Schäfers, „Endothelial nitric oxide synthase in bicuspid aortic valve disease“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 83, Nr. 4, S. 1290–1294, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.athoracsur.2006.11.086.
- [57] C. F. Russo *u. a.*, „Aortic complications after bicuspid aortic valve replacement: long-term results“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 74, Nr. 5, S. S1773-1776; discussion S1792-1799, Nov. 2002, doi: 10.1016/s0003-4975(02)04261-3.
- [58] H. Yasuda *u. a.*, „Failure to prevent progressive dilation of ascending aorta by aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valve: comparison with tricuspid aortic valve“, *Circulation*, Bd. 108 Suppl 1, S. II291-294, Sep. 2003, doi: 10.1161/01.cir.0000087449.03964.fb.
- [59] M. de Sa, Y. Moshkovitz, J. Butany, und T. E. David, „Histologic abnormalities of the ascending aorta and pulmonary trunk in patients with bicuspid aortic valve disease: clinical relevance to the ross procedure“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 118, Nr. 4, S. 588–594, Okt. 1999, doi: 10.1016/S0022-5223(99)70002-4.
- [60] S. K. Prakash *u. a.*, „A roadmap to investigate the genetic basis of bicuspid aortic valve and its complications: insights from the International BAVCon (Bicuspid Aortic Valve Consortium)“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 64, Nr. 8, S. 832–839, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.jacc.2014.04.073.
- [61] B. Giusti, E. Sticchi, R. De Cario, A. Magi, S. Nistri, und G. Pepe, „Genetic Bases of Bicuspid Aortic Valve: The Contribution of Traditional and High-Throughput Sequencing Approaches on Research and Diagnosis“, *Front. Physiol.*, Bd. 8, S. 612, 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00612.
- [62] S. A. Mohamed *u. a.*, „Locally different endothelial nitric oxide synthase protein levels in ascending aortic aneurysms of bicuspid and tricuspid aortic valve“, *Cardiol. Res. Pract.*, Bd. 2012, S. 165957, 2012, doi: 10.1155/2012/165957.
- [63] D. Henn *u. a.*, „GATA5 and endothelial nitric oxide synthase expression in the ascending aorta is related to aortic size and valve morphology“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 97, Nr. 6, S. 2019–2025, Juni 2014, doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.02.050.
- [64] A. Forte und A. Della Corte, „Editorial: The Pathogenetic Mechanisms at the Basis of Aortopathy Associated with Bicuspid Aortic Valve: Insights from ‚Omics‘, Models of Disease and Emergent Technologies“, *Front. Physiol.*, Bd. 8, S. 1002, 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.01002.

- [65] C. D. Searles, „Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression“, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, Bd. 291, Nr. 5, S. C803-816, Nov. 2006, doi: 10.1152/ajpcell.00457.2005.
- [66] I. B. Buchwalow u. a., „Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase“, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, Bd. 16, Nr. 6, S. 500–508, Apr. 2002, doi: 10.1096/fj.01-0842com.
- [67] A. M. Gown und M. C. Willingham, „Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3“, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, Bd. 50, Nr. 4, S. 449–454, Apr. 2002, doi: 10.1177/002215540205000401.
- [68] F.-X. Schmid, K. Bielenberg, A. Schneider, A. Haussler, A. Keyser, und D. Birnbaum, „Ascending aortic aneurysm associated with bicuspid and tricuspid aortic valve: involvement and clinical relevance of smooth muscle cell apoptosis and expression of cell death-initiating proteins“, *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.*, Bd. 23, Nr. 4, S. 537–543, Apr. 2003, doi: 10.1016/s1010-7940(02)00833-3.
- [69] J. Z. Goldfinger, J. L. Halperin, M. L. Marin, A. S. Stewart, K. A. Eagle, und V. Fuster, „Thoracic aortic aneurysm and dissection“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 64, Nr. 16, S. 1725–1739, Okt. 2014, doi: 10.1016/j.jacc.2014.08.025.
- [70] T. J. Schlatmann und A. E. Becker, „Histologic changes in the normal aging aorta: implications for dissecting aortic aneurysm“, *Am. J. Cardiol.*, Bd. 39, Nr. 1, S. 13–20, Jan. 1977, doi: 10.1016/s0002-9149(77)80004-0.
- [71] T. Klima u. a., „The morphology of ascending aortic aneurysms“, *Hum. Pathol.*, Bd. 14, Nr. 9, S. 810–817, Sep. 1983, doi: 10.1016/s0046-8177(83)80303-7.
- [72] J. F. Matthias Bechtel, F. Noack, F. Sayk, A. W. Erasmi, C. Bartels, und H.-H. Sievers, „Histopathological grading of ascending aortic aneurysm: comparison of patients with bicuspid versus tricuspid aortic valve“, *J. Heart Valve Dis.*, Bd. 12, Nr. 1, S. 54–59; discussion 59-61, Jan. 2003.
- [73] D. Henn u. a., „Identification of reference genes for quantitative RT-PCR in ascending aortic aneurysms“, *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 1, S. e54132, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0054132.
- [74] S. Gauer u. a., „Dysregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Does Not Depend on Hemodynamic Alterations in Bicuspid Aortic Valve Aortopathy“, *J. Am. Heart Assoc.*, Bd. 9, Nr. 18, S. e016471, Sep. 2020, doi: 10.1161/JAHA.120.016471.
- [75] M. P. Pusztaszeri, W. Seelentag, und F. T. Bosman, „Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1

- in normal human tissues“, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, Bd. 54, Nr. 4, S. 385–395, Apr. 2006, doi: 10.1369/jhc.4A6514.2005.
- [76] R. W. Boyce, K.-A. Dorph-Petersen, L. Lyck, und H. J. G. Gundersen, „Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number“, *Toxicol. Pathol.*, Bd. 38, Nr. 7, S. 1011–1025, Dez. 2010, doi: 10.1177/0192623310385140.
- [77] B. Romeis, *Mikroskopische Technik*, 17. Aufl. Urban und Schwarzenberg, 1989.
- [78] R. Thavarajah, V. K. Mudimbaimannar, J. Elizabeth, U. K. Rao, und K. Ranganathan, „Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation“, *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP*, Bd. 16, Nr. 3, S. 400–405, Sep. 2012, doi: 10.4103/0973-029X.102496.
- [79] W. M. Huang, S. J. Gibson, P. Facer, J. Gu, und J. M. Polak, „Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating“, *Histochemistry*, Bd. 77, Nr. 2, S. 275–279, 1983, doi: 10.1007/BF00506570.
- [80] M. Mulisch und U. Welsch, Hrsg., *Romeis - Mikroskopische Technik*, 19. Aufl. Springer.
- [81] M. Møller, O. V. Glistrup, und W. Olsen, „Contrast enhancement of the brownish horseradish peroxidase-activated 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride reaction product in black and white photomicrography by the use of interference filters“, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, Bd. 32, Nr. 1, S. 37–42, Jan. 1984, doi: 10.1177/32.1.6690599.
- [82] H. Vogel und C. S. Marvel, „Polybenzimidazoles, new thermally stable polymers“, *J. Polym. Sci.*, Bd. 50, Nr. 154, S. 511–539, 1961, doi: <https://doi.org/10.1002/pol.1961.1205015419>.
- [83] E. R. Weibel, *Stereological methods - Vol.1 Practical Methods for Biological Morphometry*, 1. Aufl., Bd. 1. Academic Press, 1979.
- [84] B. A. Monk und S. J. George, „The Effect of Ageing on Vascular Smooth Muscle Cell Behaviour--A Mini-Review“, *Gerontology*, Bd. 61, Nr. 5, S. 416–426, 2015, doi: 10.1159/000368576.
- [85] A. de Sousa und L. Alvares, „Microangiographic study of the vasa vasorum of the thoracic aorta“, *Radiology*, Bd. 75, S. 91–97, Juli 1960, doi: 10.1148/75.1.91.
- [86] Z. Tonar, P. Tomášek, P. Loskot, J. Janáček, M. Králíčková, und K. Witter, „Vasa vasorum in the tunica media and tunica adventitia of the porcine aorta“, *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.*, Bd. 205, S. 22–36, Mai 2016, doi: 10.1016/j.aanat.2016.01.008.

- [87] J. M. Federspiel, T. Tschernig, M. W. Laschke, S. Wagenpfeil, P. Schnabel, und H.-J. Schäfers, „The vasa vasorum reach deep into the human thoracic aorta“, *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.*, Bd. 225, S. 54–56, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.aanat.2019.06.001.
- [88] E. L. Ritman und A. Lerman, „The dynamic vasa vasorum“, *Cardiovasc. Res.*, Bd. 75, Nr. 4, S. 649–658, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2007.06.020.
- [89] M. J. Mulligan-Kehoe, „The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Bd. 298, Nr. 2, S. H295-305, Feb. 2010, doi: 10.1152/ajpheart.00884.2009.
- [90] J. A. Clarke, „An X-Ray microscopic study of the vasa vasorum of the normal human ascending aorta“, *Br. Heart J.*, Bd. 27, S. 99–104, Jan. 1965, doi: 10.1136/hrt.27.1.99.
- [91] G. Sacchi, E. Weber, und L. Comparini, „Histological framework of lymphatic vasa vasorum of major arteries: an experimental study“, *Lymphology*, Bd. 23, Nr. 3, S. 135–139, Sep. 1990.
- [92] F. C. Lee, „On the lymphatic vessels in the wall of the thoracic aorta of the cat“, *Anat. Rec.*, Bd. 23, Nr. 6, S. 342–350, 1922, doi: <https://doi.org/10.1002/ar.1090230605>.
- [93] H. Jellinek, B. Veress, A. Bálint, und Z. Nagy, „Lymph vessels of rat aorta and their changes in experimental atherosclerosis: an electron microscopic study“, *Exp. Mol. Pathol.*, Bd. 13, Nr. 3, S. 370–376, Dez. 1970, doi: 10.1016/0014-4800(70)90098-5.
- [94] A. Milasan, J. Ledoux, und C. Martel, „Lymphatic network in atherosclerosis: the underestimated path“, *Future Sci. OA*, Bd. 1, Nr. 4, S. FSO61, Nov. 2015, doi: 10.4155/fso.15.61.
- [95] U. Förstermann und H. Kleinert, „Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms“, *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, Bd. 352, Nr. 4, S. 351–364, Okt. 1995, doi: 10.1007/BF00172772.
- [96] K. Sorger, „[On changes of the vasa vasorum in medionecrosis aortae]“, *Virchows Arch. A Pathol. Pathol. Anat.*, Bd. 345, Nr. 2, S. 107–120, 1968, doi: 10.1007/BF00548645.
- [97] B. Seidel, A. Stanarius, und G. Wolf, „Differential expression of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in blood vessels of the rat brain“, *Neurosci. Lett.*, Bd. 239, Nr. 2–3, S. 109–112, Dez. 1997, doi: 10.1016/s0304-3940(97)00912-9.
- [98] E. W. Kienecker und H. Knoche, „Sympathetic innervation of the pulmonary artery, ascending aorta, and coronar glomera of the rabbit. A fluorescence microscopic

- study“, *Cell Tissue Res.*, Bd. 188, Nr. 2, S. 329–333, Apr. 1978, doi: 10.1007/BF00222641.
- [99] J. D. Humphrey, M. A. Schwartz, G. Tellides, und D. M. Milewicz, „Role of mechanotransduction in vascular biology: focus on thoracic aortic aneurysms and dissections“, *Circ. Res.*, Bd. 116, Nr. 8, S. 1448–1461, Apr. 2015, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.304936.
- [100] J. D. Humphrey, „Possible mechanical roles of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection and associations with dysregulated transforming growth factor- β “, *J. Vasc. Res.*, Bd. 50, Nr. 1, S. 1–10, 2013, doi: 10.1159/000342436.
- [101] M. H. Kwon und T. M. Sundt, „Bicuspid Aortic Valvulopathy and Associated Aortopathy: a Review of Contemporary Studies Relevant to Clinical Decision-Making“, *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.*, Bd. 19, Nr. 9, S. 68, Sep. 2017, doi: 10.1007/s11936-017-0569-8.
- [102] R. Erbel *u. a.*, „2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC)“, *Eur. Heart J.*, Bd. 35, Nr. 41, S. 2873–2926, Nov. 2014, doi: 10.1093/eurheartj/ehu281.
- [103] H. I. Michelena *u. a.*, „Natural history of asymptomatic patients with normally functioning or minimally dysfunctional bicuspid aortic valve in the community“, *Circulation*, Bd. 117, Nr. 21, S. 2776–2784, Mai 2008, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.740878.
- [104] H. I. Michelena *u. a.*, „Incidence of aortic complications in patients with bicuspid aortic valves“, *JAMA*, Bd. 306, Nr. 10, S. 1104–1112, Sep. 2011, doi: 10.1001/jama.2011.1286.
- [105] H. I. Michelena *u. a.*, „Bicuspid aortic valve: identifying knowledge gaps and rising to the challenge from the International Bicuspid Aortic Valve Consortium (BAVCon)“, *Circulation*, Bd. 129, Nr. 25, S. 2691–2704, Juni 2014, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007851.
- [106] W. E. Hellings *u. a.*, „Intraobserver and interobserver variability and spatial differences in histologic examination of carotid endarterectomy specimens“, *J. Vasc. Surg.*, Bd. 46, Nr. 6, S. 1147–1154, Dez. 2007, doi: 10.1016/j.jvs.2007.08.018.
- [107] A. N. Scholten, V. T. H. B. M. Smit, H. Beerman, W. L. J. van Putten, und C. L. Creutzberg, „Prognostic significance and interobserver variability of histologic grading systems for endometrial carcinoma“, *Cancer*, Bd. 100, Nr. 4, S. 764–772, Feb. 2004, doi: 10.1002/cncr.20040.

- [108] H. J. Gundersen und R. Osterby, „Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or ‚do more less well!‘“, *J. Microsc.*, Bd. 121, Nr. Pt 1, S. 65–73, Jan. 1981, doi: 10.1111/j.1365-2818.1981.tb01199.x.
- [109] J. R. Stone *u. a.*, „Recommendations for processing cardiovascular surgical pathology specimens: a consensus statement from the Standards and Definitions Committee of the Society for Cardiovascular Pathology and the Association for European Cardiovascular Pathology“, *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, Bd. 21, Nr. 1, S. 2–16, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.carpath.2011.01.001.
- [110] A. A. Kuznetsova und A. E. Pushkareva, „Monte Carlo simulation of aorta autofluorescence“, *Opt. Spectrosc.*, Bd. 121, Nr. 2, S. 304–309, Aug. 2016, doi: 10.1134/S0030400X16080117.
- [111] W. E. Wellman und J. E. Edwards, „Thickness of the media of the thoracic aorta in relation to age“, *Arch. Pathol.*, Bd. 50, Nr. 2, S. 183–188, Aug. 1950.
- [112] M. Bland, *An Introduction to Medical Statistics*, 4. Aufl. Oxford University Press, 2015.
- [113] P.-E. Noly, L. Basmadjian, I. Bouhout, V. H. Viet Le, N. Poirier, und I. El-Hamamsy, „New Insights Into Unicuspid Aortic Valve Disease in Adults: Not Just a Subtype of Bicuspid Aortic Valves“, *Can. J. Cardiol.*, Bd. 32, Nr. 1, S. 110–116, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.cjca.2015.10.028.

7 Publikationen und Dank

7.1 Publikationen

Federspiel JM, Tschernig T, Laschke MW, Wagenpfeil S, Schnabel P, Schäfers HJ. The vasa vasorum reach deep into the human thoracic aorta. *Ann Anat.* 2019 Sep;225:54-56.

Federspiel JM, Das De S, Lilley S, Smith B, Danton M, McLean A, MacArthur K, Peng E. Superior Vena Cava Inflow Following Repair for Anomalous Right Pulmonary Venous Drainage in Children. *Pediatr Cardiol.* 2019 Aug;40(6):1275-1283.

Gauer S, Balint B, Kollmann C, Federspiel JM, Henn D, Bandner-Risch D, Schmied W, Schäfers HJ. Dysregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Does Not Depend on Hemodynamic Alterations in Bicuspid Aortic Valve Aortopathy. *J Am Heart Assoc.* 2020 Sep 15;9(18)

7.2 Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H-J. Schäfers. Ihm verdanke ich jahrelange Motivation, Lehre und Unterstützung und fortwährenden Fortschritt – fachlich wie menschlich. Ohne seine unermüdliche Arbeit und sein Engagement für Forschung, Lehre und die Klinik wäre die Durchführung dieser Studie nicht möglich gewesen. Durch Ihn durfte ich die Begeisterung für angeborene Fehlbildungen des Herzens lernen, die mich erfolgreich durch mein Studium und die bisherige gemeinsame Forschung getragen hat.

Herr Univ.-Prof. Dr. med. P. A. Schnabel gilt Dank für seine Unterstützung in der Konzeption der Arbeit, der Entwicklung und der Etablierung der Methodik. Seine Ausbildung und sein Wissen bildeten das methodische Rückgrat der vorliegenden Arbeit. Insbesondere bin ich Ihm und seiner Ehefrau für sein Engagement auch nach seiner Emeritierung zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. med. T. Tschernig gilt Dank für die methodische Beratung und die Hilfe bei der Qualitätssicherung der Auswertung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. R-M. Bohle, Herrn Univ.-Prof. em. Dr. med. R. Bock und Frau Prof. Dr. rer. nat. C. Meier gilt Dank für Ihre Hilfe bei der Validierung der durchgeführten Färbungen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. univ. (H) F. Ramsthaler und dem Team des Instituts für Rechtsmedizin möchte ich für die zuverlässige Unterstützung von Forschungsprojekten neben der eigentlichen Doktorarbeit danken.

Dem Team des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Information (Leitung Univ.-Prof. Dr. Stefan Wagenpfeil), insbesondere Herrn M. Sc Jakob Schöpe gebührt Dank für die statistische Beratung.

Frau E. Stenzhorn-Niemann gebührt Dank für die Hilfe bei der Archivierung und Verwahrung der Proben.

Frau Tanja Schwab gilt Dank für jahrelange Unterstützung, methodische Beratung, die Etablierung und Durchführung der Färbungen und Immunhistochemien und der Entwicklung

, der im Anhang angefügten Färbeprotokolle.

Frau C. Kollmann, Frau L. Stögbauer und Frau D. Bander-Risch gilt Dank für die Einarbeitung in die Laborarbeit.

Dem Team des Instituts für experimentelle Chirurgie und insbesondere Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. W. Laschke, Herrn Dr. rer. nat. M. Sc. T. Später und Frau J. Becker gilt Dank für die Erlaubnis der Nutzung der Laborräume, die methodische Beratung und Hilfe bei der Prozessierung des Gewebes.

Den Kolleginnen und Kollegen aus der Anästhesie gilt Dank für die Unterstützung bei der Datenerhebung durch die Durchführung der Vermessung der Aortenwurzel und der Aorta ascendens in der intraoperativen transösophagealen Echokardiographie.

Dank gilt auch den Kolleginnen und Kollegen in der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie. Sie unterstützen ebenfalls die Gewinnung klinischer Daten und die Akquise von Patienten für diese Studie.

Dem OP-Pflegepersonal möchte ich für die freundliche und zuverlässige Unterstützung beim Sammeln der intraoperativ gewonnen Proben danken.

Herrn F. Theisohn gilt Dank für die Unterstützung der Datenakquise aus den digitalen Systemen der Klinik.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Oberringer gilt Dank für die freundliche und kompetente Beratung hinsichtlich der Formatierung und der Formalien der Promotion und über Jahre immer wiederkehrende erfrischende Diskussionen.

Weiterer Dank gebührt Frau PhD B. Balint für die Unterstützung beim Schreiben der englischsprachigen Manuskripte für die Publikationen.

Außerdem gebührt dem Team des Schlachthofes der Emil Färber GmbH & Co. KG in Zweibrücken Dank für das Bereitstellen der Aorten der Schweine.

Dank gilt auch dem Team der Caritas-Klinik St. Elisabeth in Saarbrücken. Besonders durch Herrn Prof. Dr. med. R. Metzger und Herrn Dr. med. G. Becker durfte ich Begeisterung für unsere Arbeit, bereits vor dem Studium lernen.

Dank gilt auch meinen Freunden, meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die mich im gesamten Medizinstudium und der gesamten Dauer der Studie unterstützt haben und dies erst ermöglichen haben.

8 Lebenslauf

-Appendix-

I. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Xylol	10 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min
100% Ethanol	5 min
100% Ethanol	5 min
90% Ethanol	5 min
80% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	5 min
Aqua dest.	5 min
Hämatoxylin nach Mayer	5 min
Aqua dest.	spülen
Salzsäure-Alkohol	differenzieren
Leitungswasser	10 min
Eosin	1 min
Aqua dest.	kurz spülen
70% Ethanol	2 – 3x dippen
80% Ethanol	2 – 3x dippen
90% Ethanol	2 – 3x dippen
100% Ethanol	2 min
100% Ethanol	2 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min

II. Alcian-blau-Färbung

Xylol	10 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min
100% Ethanol	5 min
100% Ethanol	5 min
90% Ethanol	5 min
80% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
Aqua dest.	5 min
Aqua dest.	5 min
3% Essigsäure	5 min
Alcian-blau-Lösung	45 min
Aqua dest.	1 min
Hämatoxylin nach Mayer	10 min
Aqua dest.	spülen
Salzsäure-Alkohol	differenzieren
Leitungswasser	10 min
Eosin	3 min
Aqua dest.	spülen
70% Ethanol	2 – 3x dippen
80% Ethanol	2 – 3x dippen
90% Ethanol	2 – 3x dippen
100% Ethanol	3 min
100% Ethanol	3 min
Xylol	3 min
Xylol	3 min
Xylol	3 min

III. Elastica-Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Xylol	10 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min
100% Ethanol	5 min
100% Ethanol	5 min
90% Ethanol	5 min
80% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
Aqua dest.	5 min
Aqua dest.	5 min
Resorcin-Fuchsin-Lösung	30 min
0,5% Salzsäure – Alkohol (70%)	differenzieren
70% Ethanol	spülen
Aqua dest.	spülen
Hämatoxylin nach Mayer	10 min
Leitungswasser	10 min
Eosin	3 min
Aqua dest.	spülen
70% Ethanol	2 – 3x dippen
80% Ethanol	2 – 3x dippen
90% Ethanol	2 – 3x dippen
100% Ethanol	3 min
100% Ethanol	3 min
Xylol	3 min
Xylol	3 min
Xylol	3 min

IV. Toluidin-Färbung

Toluidin-blau der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland; #0300.2)

Ansatz der Färbelösung: 2,5 g Toluidin in 250 ml Aqua dest. lösen (= 1% Lösung)

Entparaffinierung:

- 3x 10 min reines Xylol
- 2x 5 min 100% Ethanol
- 1x 5 min 90% Ethanol
- 1x 5 min 80% Ethanol
- 1x 5 min 70% Ethanol
- 2x 5 min Aqua dest.

20 min in der 1 % Toluidin-blau-Lösung inkubieren

In Aqua dest spülen

70% Ethanol	2 – 3 x dippen
80% Ethanol	2 – 3x dippen
90% Ethanol	2 – 3 x dippen
100% Ethanol	2 x 2 min
reines Xylol	3 x 5 min

V. Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung

Färbekit #12061 Firma Morphisto (Frankfurt am Main, Deutschland)

Lösungsansätze:

3% Essigsäure 7,5 ml Essigsäure in 250 ml Aqua dest.

1% Essigsäure 5 ml Essigsäure in 500 ml Aqua dest.

Verhöf-Gebrauchslösung: Stammlösung A + Stammlösung B + Stammlösung C (im Verhältnis 3:2:1)

Pro Objektträger werden 500 µl pipettiert

Entparaffinierung: 3x 10 min reines Xylol
2x 5 min 100% Isopropanol
1x 5 min 90% Isopropanol
1x 5 min 80% Isopropanol
1x 5 min 70% Isopropanol
2x 2 min Aqua dest.

3% Essigsäure	30 s
1% Alcian-blau	30 min
Leitungswasser	2 min
Verhöf Gebrauchslösung	8 min
1% Eisen (III) Chlorid	1 min
Leitungswasser	10 min
Brilliant-Crocein-Säurefuchsinlösung	3 min
1% Essigsäure	30 s
2% Phosphorwolframsäure	15 min
1% Essigsäure	30 s
99% Ethanol	3 min
99% Ethanol	15 min
Safron du Gatinais	15 min
99% Ethanol	2 min
99% Ethanol	2 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min
Modifizierung:	
Verhöf Gebrauchslösung	10 min
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Lösung	3 min

VI. CD31-Immunhistochemie

Primärantikörper: anti CD 31, anti Rabbit, # ab 76533, Firma Abcam
(Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Sekundärantikörper: Goat-anti-Rabbit (Peroxidase), #111035144, Jackson, -
20°C gelagert

Entparaffinierung: 3x 10 min reines Xylol
2x 5 min 100% Ethanol
1x 5 min 90% Ethanol
1x 5 min 80% Ethanol
1x 5 min 70% Ethanol
2x 5 min Aqua dest.

Hitzedemaskierung mit Citraconpuffer pH7,4 über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C

1x 5 min Aqua dest.

1x 5 min PBS

10 min 3% H_2O_2 in Methanol (blockieren) (280 ml Methanol + 20 ml H_2O_2)

1 x 5min PBS

Mindestens 30 min Normal Goat Serum (NGS, 3 %) (970 μ l PBS + 30 μ l NGS) in der feuchten Kammer inkubieren (blockieren)

15 min Avidin Blockierung

1x 5 min PBS

15 min Biotin Blockierung

1x 5 min PBS

Ansatz Primärantikörper [1:100]

ca. 80 μ l / Schnitt, mit Deckglas abdecken, über Nacht bei 4°C inkubieren

2x 5 min PBS

Sekundärantikörper [1:100] 1000 μ l PBS + 10 μ l Antikörper

1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubieren

2x 5 min PBS

DAB ansetzen

3 min in der feuchten Kammer inkubieren

1x 5 min Aqua dest.

Schnitte in Hämalaun nach Meyer gegenfärben (3 – 5x dippen)

In Aqua dest. spülen

8 min in Leitungswasser bläuen
1x 5 min Aqua dest
Entwässern 1 x 5 min 70%, 80%, 90% Ethanol
2 x 5 min 100% Ethanol
3 x 10 min reines Xylol

VII. eNOS-Immunhistochemie

Primärantikörper: anti-eNOS, anti-Mouse, # 58880S, Firma CellSystems (Troisdorf, Deutschland)

Sekundärantikörper: Goat-anti-Mouse (Biotin), Biotin-XX gam, #B2763, Firma life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika)

Entparaffinierung: 3x 10 min reines Xylol
2x 5 min 100% Ethanol
1x 5 min 90% Ethanol
1x 5 min 80% Ethanol
1x 5 min 70% Ethanol
2x 5 min Aqua dest.

Hitzedemaskierung mit Citraconpuffer pH7,4 über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C

1 x 5min Aqua dest.

1 x 5min PBS

10min 3% H_2O_2 in Methanol (blockieren) (280ml Methanol + 20ml H_2O_2)

1 x 5min PBS

Mindestens 30 min NGS (3%) (970 μ l PBS + 30 μ l NGS) in der feuchten Kammer inkubieren (blockieren)

15 min Avidin Blockierung

1 x 5 min PBS

15 min Biotin Blockierung

1 x 5 min PBS

Ansatz Primärantikörper [1:50]

ca. 80 μ l / Schnitt, mit Deckglas abdecken, über Nacht bei 4°C inkubieren

2x 5 min PBS

Sekundärantikörper [1:100] 1000µl PBS + 10µl Antikörper
1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubieren
2x 5 min PBS
15 min Streptavidin-Peroxidase (fertig angesetzt) in der feuchten Kammer inkubieren
2x 5 min PBS
DAB ansetzen
3 min in der feuchten Kammer inkubieren
1x 5 min Aqua dest.
Schnitte in Hämalaun nach Meyer gegenfärben (3 – 5 x dippen)
in Aqua dest. spülen
8 min in Leitungswasser bläuen
1x 5 min Aqua dest
Entwässern: 1x 5 min 70%, 80%, 90% Ethanol
2x 5 min 100% Ethanol
3x 10 min reines Xylol

VIII. Immunhistochemie zum Nachweis gespaltener Caspase 3

Primärantikörper: anti-cleaved Caspase-3, anti-Rabbit, # 9661, Firma Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika)

Sekundärantikörper: Goat-anti-Rabbit (Biotin), fertig angesetzt

Entparaffinierung: 3x 10 min reines Xylol
2x 5 min 100% Ethanol
1x 5 min 90% Ethanol
1x 5 min 80% Ethanol
1x 5 min 70% Ethanol
2x 5 min Aqua dest.

Hitzedemaskierung mit Citratpuffer pH6,0 bei 90°C im Wasserbad 1h

1 x 5min Aqua dest.

1 x 5min PBS

10min 3%H₂O₂ in Methanol (blockieren) (280ml Methanol + 20ml H₂O₂)

1 x 5min PBS

Mindestens 30 min NGS (3%) (970 µl PBS + 30 µl NGS) in der feuchten Kammer inkubieren (blockieren)

15 min Avidin Blockierung

1x 5min PBS

15 min Biotin Blockierung

1x 5 min PBS

Ansatz Primärantikörper [1:100]

ca. 80 µl / Schnitt, mit Deckglas abdecken, über Nacht bei 4°C inkubieren

2x 5 min PBS

Sekundärantikörper fertig angesetzt (4°C)

1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubieren

2x 5 min PBS

15 min Streptavidin-Peroxidase (fertig angesetzt) in der feuchten Kammer inkubieren

2 x 5 min PBS

DAB ansetzen

3 min in der feuchten Kammer inkubieren

1x 5 min Aqua dest.

Schnitte in Hämalaun nach Meyer gegenfärben (3 – 5x dippen)

in Aqua dest. spülen

8 min in Leitungswasser bläuen

1x 5 min Aqua dest

Entwässern: 1x 5 min 70%, 80%, 90% Ethanol

2x 5 min 100% Ethanol

3x 10 min reines Xylol

Tag der Disputation: 15.06.2021
Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger
Erstgutachter: Prof. Dr. H-J. Schäfers
Zweitgutachter Prof. Dr. med. M. W. Laschke