

Universität zu Lübeck

Sektion Medizin

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. med. Karl Klotz

In-vitro-Untersuchung
zur initialen Bildung und Lokalisation von Thromben an
biologischen selbstexpandierenden Aortenklappenprothesen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Medizin-



vorgelegt von

Ira Scheidler
aus Lippstadt

Lübeck
2021

1. Berichterstatter/-in: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Doreen Richardt

2. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. med. Tilman Laubert

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.01.2022

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Vorbemerkungen.....	1
1.2 Anatomie der Aortenklappe und der Aortenwurzel	2
1.3 Aortenklappenvitien	5
1.3.1 Aortenklappenstenose.....	5
1.3.2 Aortenklappenregurgitation.....	7
1.4 Kausale Therapieansätze	8
1.4.1 Offen chirurgische Therapie.....	8
1.4.2 Interventionelle Therapie: TAVI.....	12
1.5 Peri- und postinterventionelle Antikoagulation.....	18
1.6 Zielsetzung und Aufgabenstellung	21
2. Material und Methoden	24
2.1 Versuchsaufbau	24
2.2 Untersuchte Klappen	27
2.2.1 CoreValve™	27
2.2.2 JenaValve™.....	28
2.2.3 Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Ease	30
2.3 Biotechnologische und biochemische Grundlagen.....	31
2.3.1 Milch.....	31
2.3.2 Milchgerinnungsenzym	34
2.3.3 Micellstruktur und Labgelbildung	35
2.3.4 Blut	36
2.3.5 Blutgerinnung	38
2.3.6 Labgelbildung und Blutgerinnung im Vergleich.....	42
2.4 Versuchsdurchführung.....	43
2.5 Auswertung.....	44
2.6 Statistik	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1 JenaValve™ 23.....	46
3.2 JenaValve™ 25.....	47

3.3 CoreValve™ 23	48
3.4 CoreValve™ 26	48
3.5 Vergleich der selbstexpandierenden Aortenklappenprothesen.....	49
4. Diskussion.....	54
4.1 Diskussion der Unterschiede bei den Klappentypen	54
4.2 Diskussion der Unterschiede in den Untersuchungsbereichen.....	56
4.3 Limitationen.....	63
5. Zusammenfassung	66
6. Literaturverzeichnis	68
7. Anhang.....	80
7.1 Abbildungsverzeichnis	80
7.2 Tabellarischer Anhang.....	82
7.2.1 JenaValve™	82
7.2.2 CoreValve™	84
7.3 Bildanhang.....	85
7.3.1 CoreValve™	85
7.3.2 JenaValve™	86
8. Danksagungen.....	88

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Activated Clotting-Time
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
CCP	Colloidal Calcium Phosphate
DGK	Deutschen Gesellschaft für Kardiologie
DGTHG	Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
EACTS	European Association for Cardio-Thoracic Surgery
EF	Ejektionsfraktion
ESC	European Society of Cardiology
Faktor I	Fibrinogen
Faktor II	Prothrombin
Faktor III	Gewebethromboplastin
Faktor V	Proakzelerin
Faktor VII	Prokonvertin
Faktor VIII	antihämophiles Globulin A
Faktor IX	Christmas-Factor
Faktor X	Stuart-Power-Factor
Faktor XI	Plasma Thromboplastin Antecedent, Rosenthal-Factor
Faktor XII	Hageman-Factor
HALT	Hypo-Attenuated Leaflet Thickening
HDL	High Density Lipoprotein
HF	Herzfrequenz
HMV	Herzminutenvolumen
IMCU	International Milk Clotting Units
LDL	Low Density Lipoprotein
Met ₁₀₆	Methionin ₁₀₆
NO	Stickstoffmonoxid
NOAK	Neue Orale Antikoagulantien
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PGI ₂	Prostacyclin
Phe ₁₀₅	Phenylalanin ₁₀₅
SLT	Subclinical Leaflet Thrombosis

SV	Schlagvolumen
TAVI	Transcatheter Aortic Valve Implantation
TAVR	Transcatheter Aortic Valve Replacement
TIA	Transitorische Ischämische Attacke
TXA ₂	Thromboxan A ₂
vWF	Von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Im Jahr 2019 waren laut statistischem Bundesamt 35,3 % aller Sterbefälle in Deutschland auf Herz-/Kreislaufkrankungen zurückzuführen. Diese sind die am häufigsten zum Tode führende Ursache und liegen weit vor den Krebserkrankungen, welche etwa 25% der Sterbefälle ausmachen (1). Die drei häufigsten Todesursachen durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die chronische ischämische Herzkrankheit (22,2 %), der akute Myokardinfarkt (13,4 %) und die Herzinsuffizienz (10,7 %) (1).

Zu den Herz-/Kreislaufkrankungen zählen auch die Herzklappenvitien. Die Aortenklappenstenose ist die häufigste primäre Klappenerkrankung, die auch aufgrund der alternden Bevölkerung und mit steigender Prävalenz in Europa und Nordamerika behandelt werden muss. Bei einer hochgradigen Aortenklappenstenose wird üblicherweise zu einer Operation am offenen Herzen oder zu einer weniger invasiven *Transcatheter Aortic Valve Implantation* (TAVI) geraten (2). Die TAVI hat in den letzten Jahren an Bedeutung zugenommen und sich zur Standardtherapie bei Patient:innen mit einer schweren symptomatischen Aortenklappenstenose, die sich im hohen Lebensalter befinden und/ oder ein mittleres bis hohes Operationsrisiko tragen, entwickelt (3). Mittels Kathetertechnik wird z.B. über die *Arteria femoralis* oder den *Apex cordis* eine zusammengefaltete biologische Aortenklappenprothese auf die Klappenebene eingebracht und dort entfaltet (2).

Im Jahr 2020 wurden insgesamt 15.701 Transkatheter-Aortenklappenimplantationen in Deutschland durchgeführt, wobei 14.345 (91 %) Aortenklappenprothesen über einen transvaskulären und 1.356 (9 %) Aortenklappenprothesen über einen transapikalen Zugang eingesetzt wurden (4). Im Jahr 2009 lag die Zahl der kathetergeführten Aortenklappeninterventionen im Vergleich dazu noch bei insgesamt 2.198 (5).

Immer wieder wird diskutiert, ob die TAVI auch eine Behandlungsoption für ein Kollektiv aus jüngeren und körperlich gesünderen Patient:innen mit geringerem chirurgischem Risiko darstellen könnte. Auch wenn es in den vergangenen Jahren eine beeindruckende Weiterentwicklung und Verbesserung dieser noch jungen Methode gab, sind bislang noch nicht alle Risiken und Komplikationen verstanden. Einer dieser unklaren Aspekte ist die Thrombogenität der Transkatheterklappenprothesen und deren optimale Antikoagulation.

Auch die Entstehungsorte von Thromben und die zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang nur unzureichend erforscht.

1.2 Anatomie der Aortenklappe und der Aortenwurzel

Die *Valva aortae* befindet sich zwischen der Ausflussbahn des *Ventrikulus sinister* und der *Aorta* und verhindert den Blutrückfluss in den *Ventrikulus sinister* (6). Sie besteht aus drei *Valvula semilunaris*, die entsprechend des Ursprungs der beiden Koronararterien, als links-, rechts- und nonkoronare Klappentasche definiert werden (7). Die Strukturen dieser halbmondförmigen Taschen und der Kommissuren weisen histologische Unterschiede auf. So sind transversale und vertikale Faserbänder, die von Endokard bedeckt sind und bis in den Bereich der Sinus hineinragen, zu erkennen (6), (Abbildung 1).

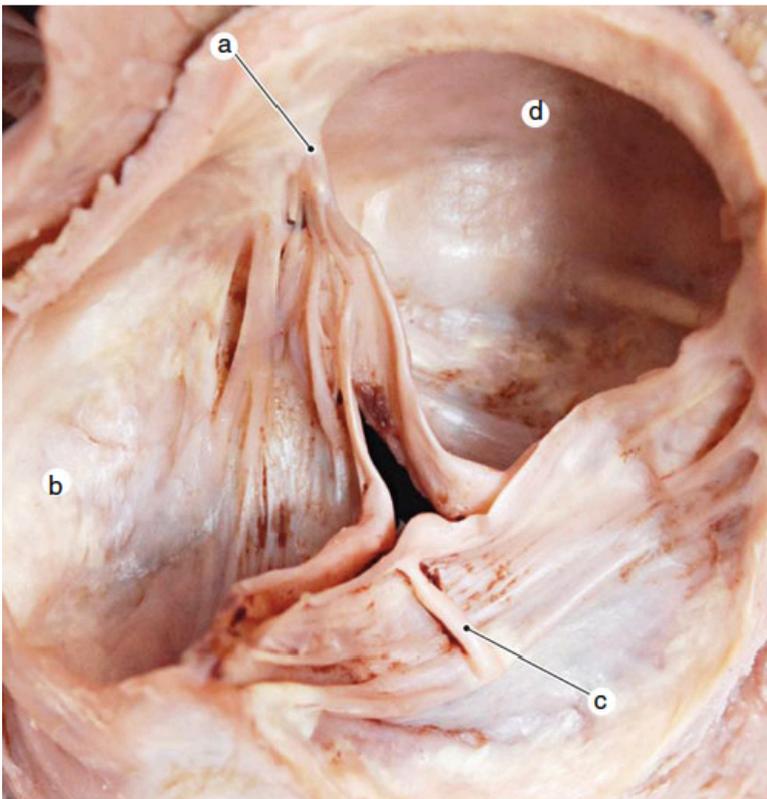


Abbildung 1: Ansicht von oben auf die Aortenklappe. a: Kommissur, b: linkskoronarer Sinus c: vertikale Faserbänder, d: rechtskoronarer Sinus (6). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags

Der zarte Rand einer jeden *Valvula semilunaris* besitzt einen zentral aufliegenden kleinen Knoten, den *Nodulus valvulae semilunaris* (Abbildung 1). Dieser geht seitlich in die *Lunula*

valvulae semilunaris über. Dabei handelt es sich um einen feinen Saum, der zusammen mit den Knötchen einen dichten Klappenschluss während der Diastole sichert und gefenstert sein kann. Hinter der jeweiligen *Valvula semilunaris* entspringen die *Aa. Coronariae sinistra und dextra* in den *Sinus aortae*, die kranzförmig als sogenannte „*Vasa privata*“ den Herzmuskel mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (8). Die Kommissuren definieren das Areal, in welchem die periphersten Bereiche zweier benachbarter Taschenklappen und die Aortenwand aufeinandertreffen (9).

Eine häufige Anomalie am Herzen ist die bikuspidale Aortenklappe, bei der die Aortenklappe statt drei nur zwei und in seltenen Fällen nur eine Klappentasche aufweist. Ätiologisch unterscheidet man zwischen der eher seltenen anatomischen Anlage von nur zwei Klappentaschen und der überwiegend vorkommenden fehlenden Separation der Klappentaschen, wobei dies meist die links- und rechtskoronare Klappentasche betrifft. Das Bild der bikuspidalen Aortenklappe wird bei etwa 1 - 2 % der weltweiten Bevölkerung vorgefunden und resultiert nicht selten in einer Aortenklappenstenose oder -regurgitation (10).

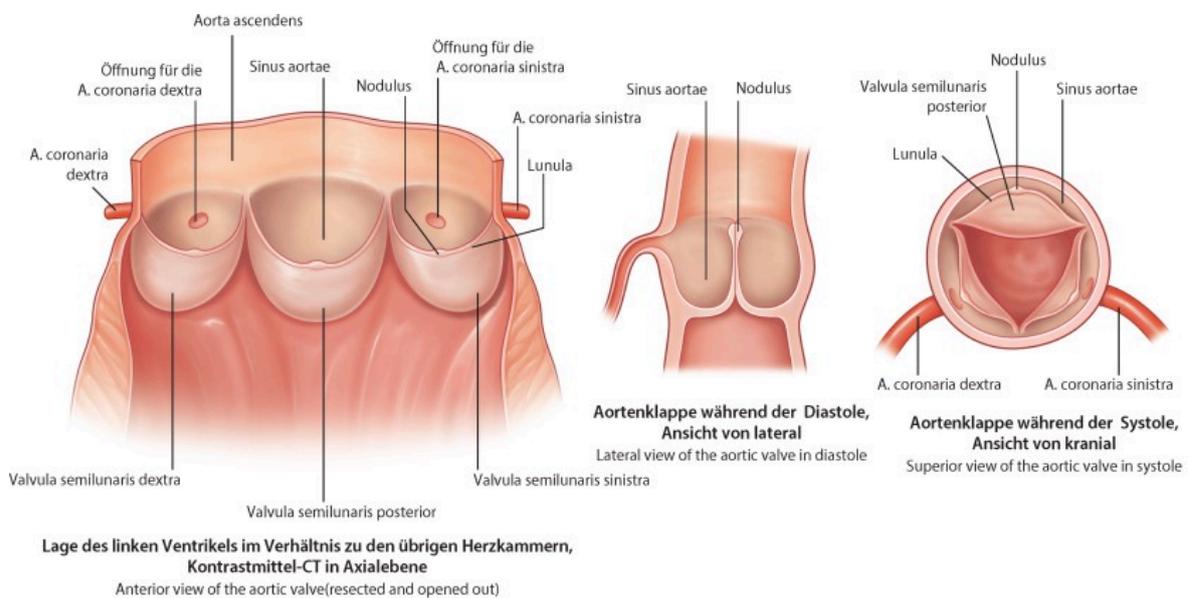
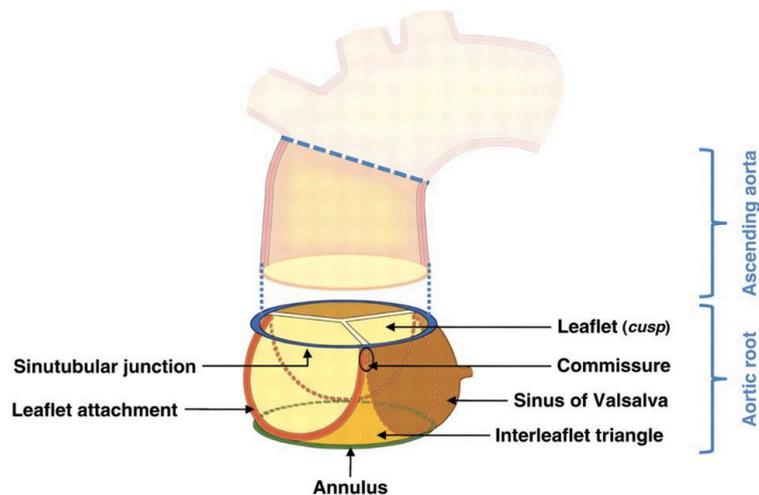


Abbildung 2: Topografie der Aortenklappe seitlich eröffnet (links) und während der Diastole und Systole (Mitte und rechts) (11). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags

Die Anatomie und die Funktion der *Valva aortae* stehen im engen Zusammenhang mit dem *Bulbus aortae*, der Aortenwurzel. Diese setzt sich aus dem *Anulus aortae*, den *Sinus aortae*

mit dem linken und rechten Ostium der *Aa. Coronariae*, dem sinutubulären Übergang (*sinutubular junction*) und der *Valva aortae* mit den zwischen ihren basalen Verankerungen liegenden dreieckigen Flächen (*interleaflet triangle*) zusammen (Abbildung 2, Abbildung 3). Nach distal ist die Aortenwurzel durch den sinutubulären Übergang, eine virtuell zirkulär verlaufende Verbindung aller drei Kommissuren begrenzt. Die proximale Begrenzung wird von dem Aortenannulus gebildet (12).

Man differenziert zwischen einem anatomischen und einem chirurgischen Anulus. Der anatomische Anulus bezeichnet eine Struktur aus dichten Bindegewebsfasern in der Aortenwand, auf welchen die Klappentaschen fußen und die in der Literatur häufig als „kronenförmig“ bezeichnet werden (6). Der chirurgische Anulus definiert eine virtuelle zirkuläre Verbindung zwischen den tiefsten Punkten der basalen Areale der Klappentaschen (9). Der anatomische Anulus grenzt zu 45 % an das interventrikuläre Septum des Myokards und zu 55 % an die fibrösen Strukturen des Herzskeletts. Die Beschaffenheit der drei unterhalb der Kommissuren liegenden dreieckigen Flächen setzt sich bei dem Areal zwischen der rechts- und linkskoronaren Klappentasche aus muskulärer und bei den übrigen zwei Arealen aus fibröser Struktur zusammen (Abbildung 3). Der erweiterte Raum zwischen dem sinutubulären Übergang und dem anatomischen Aortenannulus wird als *Sinus aortae* bezeichnet und wird jeweils durch zwei benachbarte Kommissuren begrenzt. Dieser verhindert mittels kuppelförmiger Ausbuchtung ein Anlegen der sich öffnenden *Valvula semilunaris* an die Aortenwand und somit ein Verlegen der Koronarostien (13). Gleichzeitig beugen turbulente Verwirbelungen in den *Sinus aortae* dem Verschluss der Herzkranzgefäße vor. Die einwandfreie Funktion der Aortenklappe mit ungehinderter Öffnung während der Systole und des Verschlusses während der Diastole ist entscheidend für das Herzzeitvolumen und die Herzfunktion. Somit verhindert die Aortenklappe während der Kammererschaffung fast vollkommen den Rückstrom des ausgeworfenen Blutes (9), (8).



Aortic valve:	Three leaflets only
Aortic root:	All components (Sinuses of Valsalva, interleaflet triangles, sinutubular junction, leaflet attachments, leaflets, annulus)

Abbildung 3: Der anatomische Aufbau der Aortenwurzel (14). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press

1.3 Aortenklappenvitien

Aortenklappenvitien lassen sich in stenosierende, insuffiziente oder kombinierte Herzklappenvitien unterteilen. Unabhängig von der Ätiologie und der Pathophysiologie münden beide Erkrankungen unbehandelt in einer Hypertrophie des linken Ventrikels und einer nachfolgenden Herzinsuffizienz.

1.3.1 Aortenklappenstenose

Während der Systole, der Kontraktionsphase des Herzmuskels, wird Blut aus dem linken Ventrikel in die Aorta ausgeworfen. Ein wichtiger Teil dieses physiologischen Mechanismus stellt die Aortenklappenöffnung dar. Die Aortenklappenstenose definiert eine Verengung der Aortenklappe und eine damit einhergehende verminderte Klappenöffnungsfläche. In Europa und in Nordamerika ist die Aortenklappenstenose die häufigste primäre, d.h. aufgrund einer degenerativen Kalzifikation entstehende, Klappenerkrankung, die zu einer Operation oder Katheterintervention führt (2). Die Prävalenz dieser Erkrankung liegt bei Erwachsenen im Lebensalter von 50 - 59 bei 0,2 % und steigt bei 80-jährigen auf 9,8 %. Die Gesamtprävalenz

beträgt bei Erwachsenen über dem 75. Lebensjahr 2,8 % und steht im engen Zusammenhang mit einer Atherosklerose (15).

Ätiologisch differenziert man zwischen drei wichtigen Ursachen: Kalzifikationen einer trikuspiden Klappe, Kalzifikationen einer kongenitalen bikuspiden Klappe und das rheumatische Fieber. Ersteres ist im hohen Lebensalter (> 70 Jahren) als senile Kalzifikation die häufigste Ätiologie und beruht auf einem degenerativen fortschreitenden Prozess mit Ähnlichkeiten zur Atherosklerose (16). Jährlich entwickeln etwa 1,8 - 1,9 % der Patient:innen mit einer aortalen Sklerose eine Aortenklappenstenose. Kalzifikationen in den Klappentaschen führen zu einer verminderten Dynamik des Öffnungs- und Schließprozesses. Hieraus resultieren Umbauprozesse im Gewebe und ein verkleinertes Lumen der Aortenklappe (17).

Eine bikuspidale Aortenklappe bezeichnet eine im Mutterleib fehlende Separation der Klappentaschen, sodass makroskopisch meist zwei statt der drei physiologischen Klappentaschen sichtbar sind. Eine weitere Variante dieser angeborenen Fehlbildung ist die unikuspidale Aortenklappe, bei der es aufgrund des Vorhandenseins von nur einer Klappentasche und einer stark veränderten Hämodynamik bereits im Säuglingsalter zu einer sehr schweren Aortenklappenstenose kommen kann. Eine fehlgebildete Klappe ist einer höheren mechanischen Belastung ausgesetzt und mündet ebenfalls in pathophysiologischen Veränderungen durch Kalzifikationen (18).

Die erworbene rheumatische Aortenklappenstenose ist aufgrund konsequenter antibiotischer Behandlung von Streptokokkeninfektionen eine seltene Ursache geworden und äußert sich durch Autoimmunantikörper hervorgerufene strukturelle Veränderungen an den Klappentaschen und -kommissuren und den nachfolgenden Kalzifikationen.

Während der Systole muss der linke Ventrikel einen höheren Druckgradienten überwinden, um eine Öffnung der stenosierten Klappe zu bewirken. Die erhöhte Druckbelastung stellt die grundlegende Ursache für die nachfolgenden pathophysiologischen Veränderungen wie eine konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels dar (16).

Studien haben belegt, dass die Mortalität bei symptomatischen Patient:innen mit einer unbehandelten Aortenklappenstenose nach 2 Jahren bei über 50 % liegt. Bei asymptomatischen Patient:innen sei die Sterblichkeitsrate allerdings nicht erhöht (18). Neue Studien zeigen, dass die Häufigkeit des plötzlichen Herztodes bei asymptomatischen Patient:innen höher liegen könnte als bislang in früheren Berichten angegeben wurde (19). Das Risiko für die Entwicklung einer Aortenklappenstenose besteht bereits bei

Veränderungen an den Klappentaschen und kann sich von kleinen Läsionen weiter zu einer Obstruktion entwickeln. Diese Veränderungen sind zu Beginn noch leicht bis mittelschwer, werden aber schließlich schwerwiegend und können mit oder ohne Symptome bei Patient:innen auftreten (2).

Die Erstdiagnose einer kalzifizierenden Aortenklappenstenose beruht meist auf dem Nachweis eines systolischen Herzgeräusches, gefolgt von einer echokardiographischen Bestätigung. Nicht selten handelt es sich aber auch um einen echokardiographischen Zufallsbefund. Bei einem Großteil der Patient:innen wird die Diagnose vor Einsetzen möglicher Symptome gestellt und es erfolgt eine regelmäßige Untersuchung bis schließlich eine kausale Therapie indiziert ist. Betroffene Patient:innen zeigen dann häufig folgende Symptome: Belastungsdyspnoe, Herzinsuffizienz, Angina pectoris oder plötzlich auftretende Synkopen (20).

Die Echokardiographie ist das wichtigste diagnostische Instrument zur Feststellung einer Aortenklappenstenose. Die primären hämodynamischen Parameter, die für die klinische Anwendung zur Bewertung der Aortenklappenstenose für alle Patient:innen mit Aortenklappenstenose empfohlen werden, sind: maximale Flussgeschwindigkeit, mittlerer transvalvulärer Druckgradient und Klappenöffnungsfläche (21).

1.3.2 Aortenklappenregurgitation

Während der Diastole, der Entspannungs- und Füllungsphase des Herzmuskels, füllt sich der linke Ventrikel mit Blut und stellt so das entsprechende Blutvolumen für die nachfolgende Systole bereit. Ein suffizienter Schluss der Aortenklappe ist ein wichtiger Bestandteil dieses physiologischen Prozesses. Die Aortenklappenregurgitation definiert die Schlussunfähigkeit und Undichtigkeit der Aortenklappe und einen daraus resultierenden Rückfluss des während der Systole in die Aorta ausgeworfenen Blutes zurück in den linken Ventrikel.

Wie die Framingham-Herz-Studie belegt, ließ sich bei 13 % der Männer und 8,5 % der Frauen eine Aortenklappenregurgitation mittels einer Farb-Doppler-Echokardiographie nachweisen (22). In Bezug auf die Ätiologie lassen sich zwei Arten dieses Herzvitiums unterscheiden: die akute und die chronische Aortenklappenregurgitation. Eine akut eintretende Schlussunfähigkeit der Aortenklappe beruht meist auf einer infektiösen bakteriellen Endokarditis. Seltener Ursachen sind etwa ein Trauma oder eine Aortendissektion. Ursache der chronischen Regurgitation können ebenfalls unterschiedlichen Ursprungs sein. Häufig ist eine von Geburt an bikuspid angelegte

Aortenklappe der Grund. Sie kann sowohl zu einer Regurgitation als auch zu einer Stenose führen. Weitere Ursachen können pathologische Veränderungen an der Aortenwurzel oder am Aortenannulus sein, die zu einer Dilatation führen. Dies steht oftmals im Zusammenhang mit Bindegewebserkrankungen wie dem Marfan- oder Ehlers-Dahnlos-Syndrom oder aber auch mit Lues (16).

Die Pathophysiologie der Aortenklappenregurgitation beruht auf einem Blutrückfluss und einer damit verbundenen erhöhten Volumenbelastung während der diastolischen Füllung, die nach einer gewissen Zeit zu einer exzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels führt. Viele Patient:innen bleiben oft über einen langen Zeitraum asymptomatisch, da die gesteigerte Dehnbarkeit des Herzmuskels die Belastung durch das größere Blutvolumen zunächst kompensieren kann. Überschreitet die Größe des Herzens ein kritisches Maß, kann ein ausreichendes Schlagvolumen jedoch nicht mehr aufrecht erhalten werden und es kommt zur Linksherzinsuffizienz (23). Patient:innen mit einer Aortenklappenregurgitation zeigen häufig erst in der vierten oder fünften Lebensdekade, oft vergesellschaftet mit erheblichen Mykardfunktionsstörungen oder einer Kardiomegalie, Symptome. Sukzessiv präsentieren diese Patient:innen eine Belastungsdyspnoe, Orthopnoe und nächtliche Dyspnoe. Eine Angina pectoris wird oft zu einem späten Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs beobachtet (24). Auch bei der Aortenklappenregurgitation ist die Durchführung einer Echokardiographie die entscheidende Diagnostik zur Beschreibung der Klappenanatomie, zur Quantifizierung der Regurgitation und zur Bewertung ihres Pathomechanismus (2).

1.4 Kausale Therapieansätze

Spätestens wenn Patient:innen mit einer mittel- oder hochgradigen Herzklappenerkrankung klinische Symptome aufweisen, reicht eine konservative Therapie nicht mehr aus und eine symptomatische oder kausale Therapie ist indiziert (23). Zwei verschiedene kausale Ansätze bilden die therapeutische Grundlage, um die Ursache einer Herzklappenerkrankung zu behandeln: die offen chirurgische und die interventionelle Therapie.

1.4.1 Offen chirurgische Therapie

Die konventionelle chirurgische Therapie meint immer eine Operation am offenen Herzen. Die Operation findet in Allgemeinanästhesie und mithilfe einer Herz-Lungen-Maschine statt. Mittels medianer - meist partieller - Sternotomie wird der Brustkorb eröffnet, ein

Thoraxsperrer eingesetzt und das Perikard eröffnet. Über eine Aortotomie wird die Darstellung und Exploration der Aortenklappe und das weitere Prozedere ermöglicht (25). Es wird zwischen zwei Arten einer chirurgischen Therapie des Aortenklappenvitiums differenziert: die Aortenklappenrekonstruktion und der Aortenklappenersatz.

Im Jahr 2020 wurden in Deutschland insgesamt 8.186 isolierte Operationen an der Aortenklappe vorgenommen, davon wurde bei 1,7 % der Patient:innen eine Rekonstruktion der pathologischen Aortenklappe durchgeführt. Demgegenüber wurde ein Aortenklappenersatz mittels biologischer Klappenprothese bei 87,9 % und mittels mechanischer Klappenprothese bei 10,1 % der Patient:innen durchgeführt (4).

Bei einer Klappenrekonstruktion wird die pathologisch veränderte Herzklappe nicht ersetzt, sondern in einer Weise repariert, dass eine möglichst physiologische Funktion und Anatomie hergestellt wird und damit in der Regel keine dauerhafte Antikoagulation notwendig ist. Die Rekonstruktion ist meist eine Option bei einer Aortenklappenregurgitation, wohingegen eine Aortenklappenstenose regelhaft einen Klappenersatz erfordert (25). Ob eine Rekonstruktion möglich ist, kann üblicherweise erst intraoperativ entschieden werden. Sie wird einem Klappenersatz vorgezogen, da sowohl der biologische als auch der mechanische Klappenersatz gegenüber einer nativen Klappe schwerwiegende Nachteile bietet.

Bei einem Aortenklappenersatz wird die erkrankte Aortenklappe entfernt, der Anulus entkalkt und eine neue Klappenprothese Stich für Stich angenäht. Man differenziert zwischen mechanischen und biologischen Klappenprothesen (Abbildung 4).

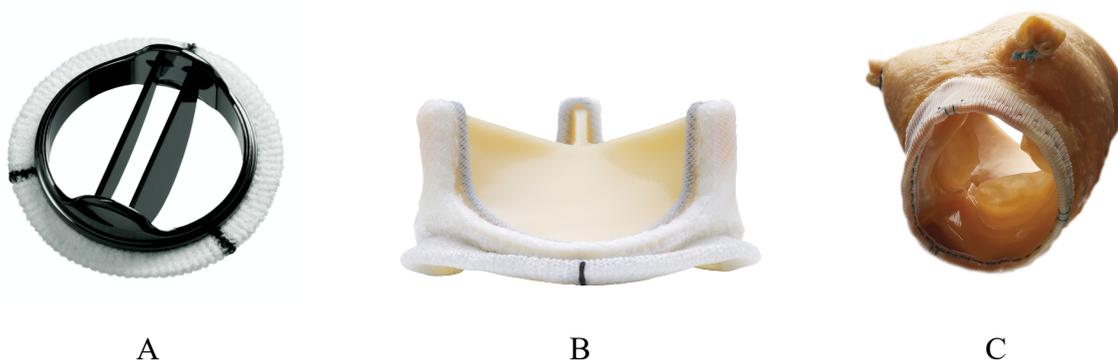


Abbildung 4: Verschiedene mechanische und biologische Klappenprothesen. A: Mechanische Prothese (Abbott Laboratories, Illinois, USA), B: Biologische Prothese mit bovinem Perikard und Stent (Edwards Lifesciences Corporation, Kalifornien, USA), C: Biologische Prothese ohne Stent (Medtronic GmbH, Minnesota, USA). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung der Hersteller

Mechanische Prothesen bestehen aus beschichtetem Kunststoff mit einer Polyester-manschette, die als Nahtring zum Einnähen in das menschliche Herz fungiert. Das Material verleiht der Prothese zwar eine lange Haltbarkeit aber gleichzeitig auch eine hohe Thrombogenität und setzt somit eine dauerhafte Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten voraus. Eine hohe Compliance der Patient:innen und eine strenge Disziplin beim Einstellen und Erhalt des Zielwertes ist notwendig. Dennoch sind Thromboembolien und Blutungen die häufigsten Komplikationen nach einem Klappenersatz mit einer mechanischen Klappenprothese. Außerdem kann es zu Klickgeräuschen der Klappenprothese kommen, die von den Patient:innen als störend empfunden werden können (Abbildung 4, A), (25).

Die biologischen Klappenprothesen bestehen meist aus bovinem oder porcinem Perikard, welche entweder in einen Stent eingenäht (Abbildung 4, B) oder auch gerüsthfrei konstruiert sein können (Abbildung 4, C). Diese Art der Klappen besitzen ebenfalls einen Nahtring, welcher dem Chirurgen eine stabile und sichere Implantation ermöglicht. Sie haben eine durch Alterungsprozesse des biologischen Materials begrenzte Lebensdauer. Je jünger Patient:innen beim Klappenersatz sind, um so schneller altert die biologische Prothese und eine erneute operative oder interventionelle Therapie ist unumgänglich (2), (26), (27), (28). Die Wahl der richtigen Klappenprothese ist ein komplexer, aber notwendiger Abwägungsprozess, um das individuelle Ergebnis des Klappenersatzes für jeden einzelnen Patienten zu optimieren. Die wichtigsten Faktoren, die initial bei der Wahl einer passenden Prothese berücksichtigt werden, sind: Alter, Lebenserwartung, Begleiterkrankungen, Kinderwunsch bei Patientinnen, Präferenz einer bestimmten Prothese und die Indikation oder Kontraindikation einer Antikoagulation. Bei der Wahl einer passenden Prothese ist daher insbesondere das Blutungs- und Thromboemboliesrisiko bei einer mechanischen Prothese bzw. die fortschreitenden strukturellen Veränderungen bei einer biologischen Prothese mit dem Risiko der Re-Operation entscheidend. Grundsätzlich muss zudem der individuelle Wunsch der Patient:innen berücksichtigt werden (10).

Die jüngsten Leitlinien der *European Society of Cardiology* (ESC) aus dem Jahr 2017 empfehlen beispielsweise eine mechanische Prothese bei Patient:innen, welche keine Kontraindikation für eine lebenslange Antikoagulation besitzen. Diese Art der Prothese sollte auch bei Patient:innen mit einer bereits bestehenden Antikoagulation und einem erhöhten Risiko von Thromboembolien in Betracht gezogen werden. Auch bei Patient:innen mit einer hohen Lebenserwartung, die jünger als 60 Jahren alt sind und/ oder bei denen ein

hohes Risiko einer Re-Operation besteht, wird eine mechanische Prothese empfohlen (Abbildung 5), (2).

Recommendations	Class ^a	Level ^b
A mechanical prosthesis is recommended according to the desire of the informed patient and if there are no contraindications to long-term anticoagulation. ^c	I	C
A mechanical prosthesis is recommended in patients at risk of accelerated structural valve deterioration. ^d	I	C
A mechanical prosthesis should be considered in patients already on anticoagulation because of a mechanical prosthesis in another valve position.	IIa	C
A mechanical prosthesis should be considered in patients <60 years of age for prostheses in the aortic position and <65 years of age for prostheses in the mitral position. ^e	IIa	C
A mechanical prosthesis should be considered in patients with a reasonable life expectancy ^f for whom future redo valve surgery would be at high risk.	IIa	C
A mechanical prosthesis may be considered in patients already on long-term anticoagulation due to the high risk for thromboembolism. ^g	IIb	C

Abbildung 5: Die Wahl einer mechanischen Klappenprothese in Abhängigkeit mehrerer Faktoren.

^a: Empfehlungsklasse, ^b: Evidenzgrad, ^c: erhöhtes Blutungsrisiko aufgrund von Komorbiditäten, Compliance-Bedenken oder geografischer Lebensstil- oder Berufsbedingungen, ^d: junges Alter (<40 Jahre), Hyperparathyreoidismus, ^e: bei Patient:innen im Alter von 60 bis 65 Jahre, die eine Aortenprothese erhalten sollen, ist eine zusätzliche sorgfältige Betrachtung aller Faktoren unabhängig vom Alter erforderlich, ^f: Die Lebenserwartung sollte je nach Alter, Geschlecht, Komorbiditäten und länderspezifischer Lebenserwartung auf >10 Jahre geschätzt werden, ^g: Risikofaktoren für Thromboembolien sind Vorhofflimmern, frühe Thromboembolien, Hyperkoagulabilität und schwere systolische links-ventrikuläre Dysfunktion (2). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press

Biologische Prothesen werden nach den ESC-Leitlinien hingegen bei Patient:innen empfohlen, die einen expliziten Wunsch nach einer solchen Prothese äußern, ein hohes Blutungsrisiko unter Antikoagulation oder eine zu erwartende geringe Compliance bei der Einstellung der Antikoagulation einer mechanischen Klappenprothese aufweisen würden. Weiterhin wird die biologische Prothese bei Patient:innen empfohlen, die trotz gut kontrollierter Antikoagulation eine Klappenthrombose bei bestehender mechanischer Prothese entwickeln könnten. Außerdem wird diese Art der Prothese bei Patient:innen mit einem geringen operativen Risiko im Rahmen einer Re-Operation, einem Alter über 65 Jahren und einer Lebenserwartung, die niedriger als die vermutete Haltbarkeit der Bioprothese liegt, empfohlen. Weiterhin sollte sie bei Frauen mit Kinderwunsch empfohlen werden (Abbildung 6), (2).

Recommendations	Class ^a	Level ^b
A bioprosthesis is recommended according to the desire of the informed patient.	I	C
A bioprosthesis is recommended when good-quality anticoagulation is unlikely (compliance problems, not readily available) or contraindicated because of high bleeding risk (previous major bleed, comorbidities, unwillingness, compliance problems, lifestyle, occupation).	I	C
A bioprosthesis is recommended for reoperation for mechanical valve thrombosis despite good long-term anticoagulant control.	I	C
A bioprosthesis should be considered in patients for whom there is a low likelihood and/or a low operative risk of future redo valve surgery.	IIa	C
A bioprosthesis should be considered in young women contemplating pregnancy.	IIa	C
A bioprosthesis should be considered in patients >65 years of age for a prosthesis in the aortic position or >70 years of age in a mitral position or those with a life expectancy ^c lower than the presumed durability of the bioprosthesis. ^d	IIa	C

Abbildung 6: Die Wahl einer Bioklappenprothese in Abhängigkeit mehrerer Faktoren.

^a: Empfehlungsklasse ^b: Evidenzgrad, ^c: Die Lebenserwartung sollte nach Alter, Geschlecht, Komorbiditäten und länderspezifischer Lebenserwartung geschätzt werden, ^d: bei Patient:innen im Alter von 60 bis 65 Jahre, die eine Aortenprothese erhalten sollen, ist eine zusätzliche sorgfältige Betrachtung aller Faktoren unabhängig vom Alter erforderlich (2). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press

1.4.2 Interventionelle Therapie: TAVI

Der transkutane Aortenklappenersatz wird auch als *Transcatheter Aortic Valve Implantation* (TAVI) oder *Transcatheter Aortic Valve Replacement* (TAVR) bezeichnet. Dabei handelt es sich um ein minimalinvasives, interventionelles Verfahren zur Behandlung einer pathologisch veränderten Aortenklappe, bei dem diese nicht offen chirurgisch entfernt wird. Bei allen auf dem Markt vorkommenden Aortenklappenprothesen, die über diesen kathetergestützten Ansatz implantiert werden, handelt es sich um biologische Prothesen, die aus porcinem und/ oder bovinem Perikard bestehen. Ein Metall-Stent spannt die drei Klappentaschen auf und lässt sich komprimieren („*crimpen*“). Über einen perkutanen Zugang mittels eines kathetergestützten Implantationsbesteckes lässt sich die zusammengefaltete Prothese bis zur pathologisch veränderten Aortenklappe durch das kleine Lumen des arteriellen Gefäßsystems vorschieben. Der Aufbau dieser industriell hergestellten Prothese ermöglicht nach der Implantation die Wiederherstellung der Aortenklappenfunktion. Unter den Transkatheterklappen sind zwei in ihrem Aufbau und dem verwendeten Material unterschiedliche Klappentypen weit verbreitet: die selbstexpandierenden und die ballonexpandierenden Katheterklappenprothesen (Abbildung 7).

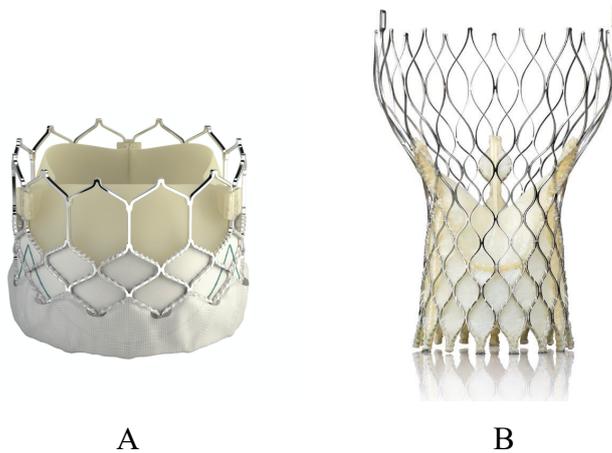


Abbildung 7: Verschiedene Transkatheter-Klappenprothesen. A: Ballonexpandierende Transkatheter Prothese (hier beispielhaft Edwards Lifesciences Corporation, Kalifornien, USA), B: Selbstexpandierende Transkatheter Prothese (hier beispielhaft Medtronic GmbH, Minnesota, USA). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung der Hersteller

Selbstexpandierende Prothesen dehnen sich materialbedingt nach Freisetzen des Klappenstents aus dem Implantationsbesteck im nativen Klappenannulus aus. Ballonexpandierende Prothesen werden mechanisch mittels eines im Inneren der Prothese positionierten aufblasbaren Ballons zirkulär aufgedehnt. Bei beiden Verfahren wird die native Aortenklappe nicht entfernt, sondern die Klappenprothese - ohne eingenäht zu werden - im Kalk der nativen Klappe und des Anulus fixiert (28), (29). In der Choice-Studie konnte 2014 nachgewiesen werden, dass bei Hochrisikopatienten mit schwerer Aortenklappenstenose die Verwendung einer ballonexpandierbaren Klappe zu einer höheren Erfolgsrate führte, als die Verwendung einer selbstexpandierenden Klappe (30). Sowohl bei der selbstexpandierenden als auch bei der ballonexpandierenden Klappenprothese kann, je nach Kalkmuster und Schwere der Verkalkung, eine zusätzliche Vordilatation mittels Ballon-Valvuloplastie erfolgen, um die native verkalkte Aortenklappe zu sprengen. Dabei wird über einen Katheter ein Ballon bis in die Ebene der Aortenklappe geschoben und aufgeblasen. Wie die Arbeitsgruppe um Toutouzas beschreibt, ist die direkte TAVI ohne initiale Klappensprengung mittels Ballon der Prozedur mit Vordilatationsverfahren nicht unterlegen (31).

Die verschiedenen Modelle an Transkatheter-Aortenklappenprothesen sind auf dem Markt in unterschiedlichen Größen erhältlich. Vor jeder TAVI ist eine exakte Messung des nativen Aortenannulus unerlässlich, um die entsprechende Größe der Klappenprothese zu wählen. Es gilt unter anderem potenzielle paravalvuläre Regurgitationen, eine bedeutende

Komplikation bei der TAVI, zu vermeiden. Dabei fließt Blut neben der Herzklappe vorbei und zurück in den Ventrikel. In einer 2012 erschienenen Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Computertomographie eine sehr genaue Bewertung der anulären Größe ermöglicht und das Auftreten von paravalvulären Regurgitationen minimiert werden kann. Damit wurde die ursprünglich standardisierte Messung mittels transösophagealer Echokardiographie als Goldstandard abgelöst (32).

Mit der Verbesserung der Gerätetechnologie und der Implantationsbestecke hat sich das Spektrum der Zugangsoptionen für die Implantation der Prothese erweitert und umfasst aktuell unter anderem: retrograd-transfemorale (über die *Arteria femoralis*), antegrad-transapikal (über den *Apex cordis* mittels lateraler Mini-Thorakotomie), retrograd-transaortal (über eine partielle Sternotomie), retrograd-subclavial (über die *Arteria subclavia*) und retrograd-transaxillär (über die *Arteria axillaris*) (33). Zunächst wird nach einer Punktion des Zielgefäßes bzw. -bereiches in *Seldinger*-Technik über mehrere Zwischenschritte ein stabiler Draht durch die Klappenebene geführt und darüber das Implantationsbesteck mit der gefalteten Transkatheter-Aortenklappenprothese positioniert. Während der Prothesenimplantation einer ballonexpandierenden Prothese wird, genau wie bei einer Valvuloplastie, über einen passageren Schrittmacher eine Herzfrequenz von 160 -200 Schlägen/ Minute erzeugt („*rapid pacing*“). Das dadurch provozierte kurze Kammerflimmern soll einen systolischen Auswurf verhindern und damit eine exakte Positionierung der Klappenprothese gewährleisten. Wie 2017 in einer Studie nachgewiesen wurde, erhöht sich durch eine längere Gesamtdauer der schnellen ventrikulären Stimulation nicht das Risiko einer postprozeduralen Myokardverletzung bei Patient:innen, die sich einer Transkatheter-Aortenklappenimplantation unterzogen haben (34).

Die TAVI wurde zunächst für als inoperabel geltende Patient:innen bzw. für solche mit sehr hohem Operationsrisiko entwickelt und hat im Laufe der letzten fünfzehn Jahre in ihrer medizinischen Bedeutung stark zugenommen (23). Innerhalb der letzten Jahre zeigte sich, dass die Transkatheter-Herzklappe bei Patient:innen, insbesondere diese mit einer starken Aortenklappenstenose und mit hohem Risiko für einen chirurgischen Klappenersatz, eine alternative Behandlungsoption darstellt und zu ähnlichen klinischen Ergebnissen führt (35), (36).

Neueste Studien belegen, dass die kathetergeführte Aortenklappenimplantation mit einer selbstexpandierenden supraanulären Bioprothese dem Herzklappenersatz über das offen-chirurgische Verfahren bei Patient:innen mit schwerer Aortenklappenstenose und geringem

chirurgischen Risiko nicht unterlegen ist. Es wurden Patient:innen mit einem durchschnittlichen Alter von 74 Jahren in Bezug auf den kombinierten Endpunkt des Todes oder eines Schlaganfalls untersucht (37). Die erweiterte Indikationsgenehmigung für die vom Hersteller *Medtronic GmbH* produzierten Aortenklappenprothesen, ermöglichte nun einen Einsatz in einer neuen Patientengruppe. Hierzu zählen Patient:innen, die jünger und aktiver sind als die zuvor behandelten Patient:innen mit hohem Operationsrisiko (38).

Die erste erfolgreiche Implantation einer Transkatheterklappe wurde 2002 in Frankreich mittels Ballondilatation bei einem 57-jährigen Patient:innen mit kalzifizierter Aortenstenose und weiteren Begleiterkrankungen, wie einer subakuten Beinischämie, beschrieben. Aufgrund der stark fortgeschrittenen peripheren arteriellen Verschlusskrankheit wurde damals ein antegrad-transfemorale Zugangsweg über die *Vena femoralis* mit anschließender transeptaler Punktion gewählt (Abbildung 8) (39).

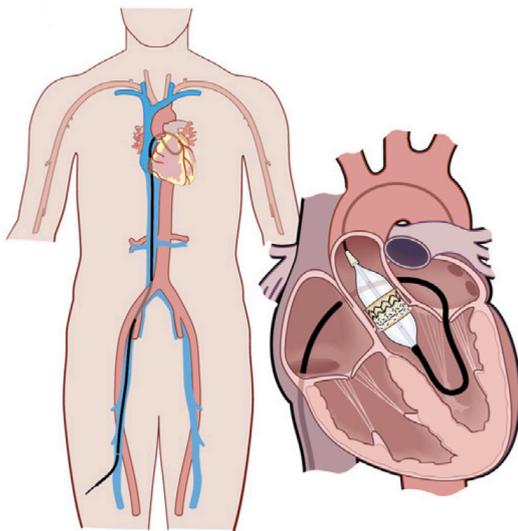


Abbildung 8: Antegrad transfemoraler venöser Zugang, der bei der ersten erfolgreichen Implantation gewählt wurde (33). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags

Laut der 2017 erschienenen Leitlinie zur Behandlung von Herzklappenerkrankungen der ESC und der *European Association for Cardio-Thoracic Surgery* (EACTS) soll bei Patient:innen mit bestehender Aortenklappenstenose und erhöhtem chirurgischen Risiko die Entscheidung zwischen chirurgischen Aortenklappenersatz oder TAVI von einem *Heart Team* entsprechend der individuellen Patientenmerkmale getroffen werden. Dabei soll eine TAVI bei älteren Patient:innen, die für einen transfemorale Zugang geeignet sind, bevorzugt werden (2). Die Leitlinien werden sowohl von der *Deutschen Gesellschaft für*

Kardiologie (DGK) als auch von der *Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG)* zum Großteil anerkannt. Nach der DGK und der DGTHG ist die Indikation zur TAVI multidisziplinär in einem *Heart Team* zu stellen. Dieses setzt sich aus entsprechend spezialisierten Kardiolog:innen, Herzchirurg:innen und Anästhesist:innen zusammen und wird gegebenenfalls durch weitere Spezialist:innen der Rhythmologie, Radiologie, Geriatrie und der Intensivmedizin ergänzt. Weiterhin wird empfohlen, die Durchführung einer TAVI auf Zentren mit einer strukturierten Zusammenarbeit zwischen kardiologischen und herzchirurgischen Fachabteilungen zu beschränken (40).

Während im Jahr 2020 insgesamt 15.701 Transkatheter-Aortenklappenimplantationen in Deutschland in einem Verhältnis von 91 % transvaskulär (14.345 Aortenklappenprothesen) zu 9 % transapikal (1.356 Aortenklappenprothesen) eingesetzt wurden (4), lag dieses Verhältnis der Zugangswege im Jahr 2009 bei 33 % transvaskulär (730 Aortenklappenprothesen) zu 67 % transapikal (1.468 Aortenklappenprothesen) bei insgesamt 2.198 Implantationen (5). Hier zeigt sich auch die beeindruckende Steigerung der Implantationszahlen innerhalb eines kurzen Zeitraumes.

Transfemorale Implantationstechnik

Im Jahr 2006 beschreiben Webb et al. erfolgreiche retrograde transfemorale Transkatheter-Klappenimplantationen (41). Bei dieser Implantationstechnik wird in einem ersten Schritt die *Arteria femoralis* punktiert und danach Katheter zur angiografischen Darstellung und Intervention eingebracht. Je nach Klappenanatomie wird zunächst eine Ballonvalvuloplastie der Aortenklappe durchgeführt. Anschließend wird ein die Aortenklappenprothese tragender Katheter entgegen des Blutstroms auf die Klappenebene vorgeschoben (Abbildung 9). Die Transkatheter-Aortenklappenprothese wird nun so positioniert, dass sie koaxial innerhalb der verkalkten nativen Klappenblätter liegt. Mittels Durchleuchtung und der Gabe von Röntgenkontrastmittel kann während der Prozedur die exakte Position und Expansion der Klappenprothese ermittelt werden. Während des Freisetzens der Transkatheter-Aortenklappenprothese kann - je nach Klappentyp - die Anwendung von *rapid pacing* nötig sein. Hintergrund ist eine Minimierung des pulsatilen transaortalen Flusses und dadurch das Ermöglichen eines störungsfreien Implantationsprozesses und die Verhinderung einer Dislokation der Transkatheter-Aortenklappenprothese. Im Anschluss werden eine Aortenwurzelangiographie und eine Echokardiographie zur Bewertung des Sitzes der Prothese, der Prothesenfunktion und des koronaren Flusses durchgeführt und nach Entfernen

des Implantationsbesteckes und aller Drähte die Leistengefäße mit Verschlusssystemen versorgt (33).

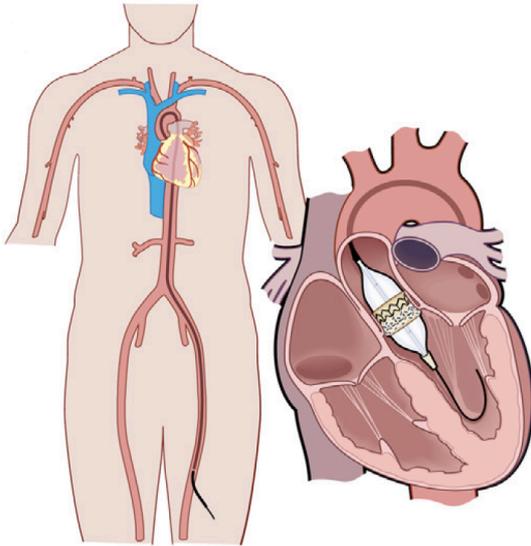


Abbildung 9: Retrograder transfemoraler arterieller Zugang über die *Arteria femoralis* (33). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags

Der transfemorale Zugangsweg bietet die Möglichkeit eines Eingriffs in Analgosedierung und ohne Intubation. Aufgrund seiner geringen Invasivität ist dieser Zugang im klinischen Alltag und in der Mehrzahl der klinischen Studien der bevorzugte Weg und wird von der ESC und der EACTS in den 2017 erschienenen Leitlinien als erste Wahl empfohlen (2).

Transapikale Implantationstechnik

Ebenfalls im Jahr 2006 wurde erstmals von Lichtenstein et al. eine transapikale Aortenklappenimplantation ohne kardiopulmonalen Bypass bei ausgewählten Patient:innen mit Aortenklappenstenose beschrieben (42). Dieser Zugangsweg zeichnet sich durch eine operative Darstellung der linksventrikulären Herzspitze aus und wird im klinischen Alltag meist bei Patient:innen genutzt, die für einen transfemorale Zugang - zum Beispiel bei schweren Gefäßverkalkungen - nicht in Frage kommen. Mittels linkslateraler Mini-Thorakotomie wird der Interkostalraum zwischen zwei Rippen und das *Pericardium* nach vorheriger Ultraschallkontrolle eröffnet und der *Apex cordis* dargestellt (Abbildung 10). Über eine Sicherung des *Myocards* mit Tabaksbeutelnähten ist eine Punktion der Herzspitze und das Einbringen der Führungskatheter und -drähte sowie des Implantationsbesteckes möglich. Über den linken Ventrikel wird die Aortenklappenprothese

auf die Aortenklappenebene vorgeschoben. Nach gegebenenfalls erfolgter Ballonvalvuloplastie wird die Transkatheter-Aortenklappenprothese mit Hilfe einer Angiographie und Durchleuchtung freigesetzt. Zuvor eingebrachte epikardiale linksventrikuläre Schrittmachersonden können hierbei eine Herzfrequenz von 160 - 220 Schlägen/ Minute, das sogenannte *rapid pacing*, erzeugen, um bei einer Valvuloplastie und der Implantation den linksventrikulären Auswurf und die Herzbewegungen minimieren zu können (33).

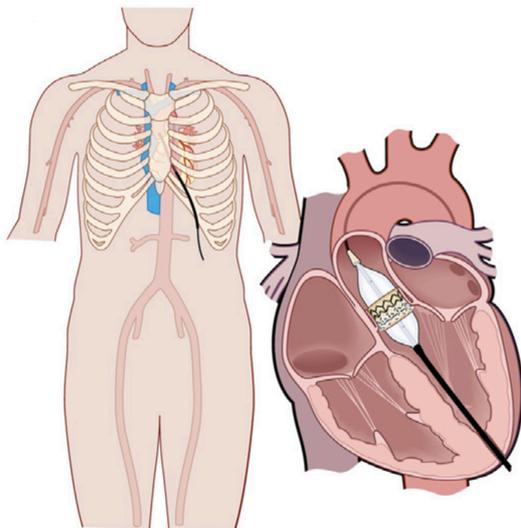


Abbildung 10: Antegrad linksventrikulärer transapikaler Zugang mittels anterolaterale Mini-Thorakotomie (33). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags

Wie in einer multizentrischen Studie von vier europäischen Zentren beschrieben wurde, ist die transapikale Aortenklappenimplantation mit einem erhöhten Risiko der Gesamtmortalität und einem längeren Krankenhausaufenthalt assoziiert. Gleichzeitig existieren jedoch weniger vaskuläre Komplikationen im Vergleich zu dem transfemorale Aortenklappenersatz (43).

1.5 Peri- und postinterventionelle Antikoagulation

In der Leitlinie der ESC zum Management der Herzklappenerkrankungen ist unter anderem die antikoagulative Therapie nach Einsatz einer Bioprothese festgehalten worden (Abbildung 11). Für Patient:innen mit einer klassischen chirurgischen Bioprothese oder einer in Transkathetertechnik implantierten Bioprothese, die eine Indikationen für eine

Antikoagulation aufgrund einer bereits bestehenden Erkrankung haben, wird eine lebenslange orale Antikoagulation empfohlen. Weiterhin sollte eine duale Thrombozytenaggregationshemmung, in den ersten drei bis sechs Monaten nach TAVI, gefolgt von einer lebenslangen einfachen Thrombozytenaggregationshemmung bei Patient:innen, die aus anderen Gründen keine Antikoagulation benötigen, in Betracht gezogen werden. Eine einfache Thrombozytenaggregationshemmung besteht in der Regel aus dem irreversiblen Cyclooxygenase-1-Hemmer Acetylsalicylsäure (ASS), während eine duale Thrombozytenaggregationshemmung zusätzlich zum ASS einen ADP-Rezeptorblocker, bestehend aus Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor beinhaltet. Laut Leitlinie kann bei hohem Blutungsrisiko auch eine einfache Thrombozytenaggregationshemmung nach TAVI in Betracht gezogen werden (2).

Dabei sollte beachtet werden, dass das *Level of Evidence* bei allen Leitlinienempfehlungen mit „C“ kategorisiert wurde und damit die Datenlage als schwach zu betrachten ist.

Bioprostheses		
Oral anticoagulation is recommended lifelong for patients with surgical or transcatheter implanted bioprostheses who have other indications for anticoagulation. ^c	I	C
Oral anticoagulation using a VKA should be considered for the first 3 months after surgical implantation of a mitral or tricuspid bioprosthesis.	IIa	C
Oral anticoagulation using a VKA should be considered for the first 3 months after surgical mitral or tricuspid valve repair.	IIa	C
Low-dose aspirin (75 - 100 mg/day) should be considered for the first 3 months after surgical implantation of an aortic bioprosthesis or valve-sparing aortic surgery.	IIa	C
Dual antiplatelet therapy should be considered for the first 3–6 months after TAVI, followed by lifelong single antiplatelet therapy in patients who do not need oral anticoagulation for other reasons.	IIa	C
Single antiplatelet therapy may be considered after TAVI in the case of high bleeding risk.	IIb	C
Oral anticoagulation may be considered for the first 3 months after surgical implantation of an aortic bioprosthesis.	IIb	C

Abbildung 11: Indikationen zur antithrombotischen Therapie bei Patient:innen mit Bioprosthesen nach Leitlinie der ESC 2017. VKA = Vitamin K-Antagonist, LV= linksventrikulär, TAVI = Transcatheter Aortic Valve Implantation, c: Vorhofflimmern, venöse Thromboembolie, hyperkoagulierbarer Zustand oder, dies mit einem geringen Evidenzgrad, stark beeinträchtigte LV-Dysfunktion (Ejektionsfraktion <35%) (2). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press

Beim Einsatz einer Transkatheter-Prothese kann es zu einer Reihe von Komplikationen kommen, auf welche u.a. die DGK im Jahr 2020 hingewiesen hat. Der AV-Block ist die häufigste mit Transkatheter-Prothesen assoziierte Problematik. Laut DGK erhalten je nach Prothesentyp etwa 4 - 29 % der Patient:innen nach der Prozedur einen Schrittmacher.

Periprozedural sind beispielsweise Zugangs- und Gefäßkomplikationen oder eine Ventrikelperforation möglich. Weiterhin besteht das Risiko einer Anulusruptur, einer Aortendissektion oder -perforation, einer myokardialen Ischämie, eines Nierenversagens, Arrhythmien und Aortenklappenregurgitationen aufgrund paravalvulärer Leckagen. Auch können Schlaganfälle oder Klappenthrombosen auftreten (3).

In den letzten Jahren wurde das Risiko von Schlaganfällen im Zusammenhang mit einer TAVI in größeren Studien untersucht. Wie Register-Studien der Firmen *Edwards Lifesciences Corporation* und *Medtronic GmbH* zeigen, steigt mit einer TAVI die Inzidenz eines Schlaganfalles (35), (38), (44), (45). Allerdings fehlen bislang belastbare Langzeitstudien zum Risiko von thrombotischen Ereignissen wie Schlaganfällen nach TAVI.

Ursprünglich war eine TAVI den Patient:innen mit schwerer Aortenklappenstenose und einem hohen Operationsrisiko vorbehalten. Nach neueren Studien ist eine TAVI aber auch bei Patient:innen mit schwerer Aortenklappenstenose und niedrigem Operationsrisiko denkbar (45). Ein niedriges Operationsrisiko geht oft mit einem jüngeren Lebensalter einher. Auch und gerade bei diesem Patientenkollektiv stellt sich die Frage, wie hoch das Risiko eines Schlaganfalls nach TAVI ist, wenn sich eine implantierte Transkatheterklappe über viele Jahre im menschlichen Körper befindet.

Die Arbeitsgruppe um Grube berichtet beispielsweise in einer Single-Center-Studie aus dem Jahr 2006 über die ersten Implantationen einer CoreValve™ und einer postinterventionellen Antikoagulation mit ASS und Clopidogrel (46). In den meisten Kliniken ist es nach wie vor üblich nach einer TAVI eine duale Thrombozytenaggregationshemmung - in der Regel bestehend aus ASS und Clopidogrel oder Prasugrel - für drei bis sechs Monate anzusetzen. Danach wird dann üblicherweise ASS oder ein ADP-Rezeptorblocker als Monotherapie verordnet. Bei hohem Blutungsrisiko kann auch von Anfang an eine Monotherapie erwogen werden. Sollten die Patient:innen an einer Klappenthrombose leiden, wird die orale Antikoagulation mit einem neuen oralen Antikoagulanz (NOAK) oder einem Vitamin-K-Antagonisten empfohlen (47).

Die sogenannte *Subclinical Leaflet Thrombosis* (SLT), oder auch *Hypo-Attenuated Leaflet Thickening* (HALT) genannt, wird oft zufällig entdeckt und zeichnet sich durch eine dünne Schicht thrombotischen Materials an der aortalen Seite eines oder mehrerer Klappenprothesensegel aus. Im Jahr 2017, dem Jahr des Erscheinens der Leitlinien, wies die Arbeitsgruppe um Chakravarty nach, dass Antikoagulantien wie NOAK oder Vitamin-K-

Antagonisten bei der Prävention oder Behandlung einer SLT bzw. HALT wirksam sind. Für eine duale Thrombozytenaggregationshemmung fand sich eine solche Wirkung nicht. In dieser Studie waren SLT bzw. HALT mit einer erhöhten Rate an transitorischen ischämischen Attacken (TIA) und Schlaganfällen assoziiert (48).

Weiterhin erbrachte eine Studie im Jahr 2016 den Nachweis, dass eine duale Thrombozytenaggregationshemmung im Vergleich zu einer einfachen Thrombozytenaggregationshemmung nach TAVI die Inzidenz von hämorrhagischen Ereignissen - ohne Vorteile in Bezug auf thrombotische Ereignisse und die kardiovaskuläre Mortalität - erhöht (49).

Sowohl klassische Bioprothesen als auch Transkatheter-Bioprothesen bestehen aus einem Material, welches bei jüngeren Patient:innen anfälliger für Degenerationen ist und eine altersabhängige begrenzte Haltbarkeit aufweist. Dieser Fakt ist insbesondere deshalb für jüngere Patient:innen wichtig, da diese eine deutlich höhere Lebenserwartung haben. Thrombotische Auflagerung an Transkatheterklappen können zusätzlich zu funktionellen Einschränkungen und langfristig zur Degeneration der Prothese führen, wie bereits in einigen Studien festgestellt wurde (50), (51), (52), (53).

Die antithrombotische Therapie nach einer Transkatheter-Aortenklappenintervention ist in kontrollierten klinischen Studien nicht ausreichend untersucht worden, um die Frage nach einer Minimierung des Risikos einer Thromboembolie und damit potenziell einhergehender Schlaganfälle oder Klappenthrombosen zu beantworten. Laut der ESC sind zusätzlich groß angelegte Studien erforderlich um die Evidenz in diesem Bereich zu verbessern (2).

1.6 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Die TAVI mit biologischen selbstexpandierenden und ballonexpandierenden Klappenprothesen hat sich innerhalb des letzten Jahrzehnts zu einer tragenden und etablierten Behandlungsoption für Patient:innen mit einer pathologisch veränderten Aortenklappe entwickelt. Die transfemorale und die transapikale Zugangswege stellen im Rahmen der TAVI die weltweit am häufigsten verwendeten Verfahren dar. Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft könnte die Implantation von Transkatheterklappen auch eine Behandlungsoption für ein Kollektiv aus jüngeren und körperlich gesünderen Patient:innen mit niedrigerem chirurgischem Risiko darstellen. Es handelt sich bei der TAVI um eine Behandlungsoption, die in Bezug auf die Patientenpopulation stark expandiert,

obwohl noch nicht alle damit verbundenen Probleme und Ungewissheiten zufriedenstellend gelöst worden sind.

Einer der unklaren Aspekte ist die Thrombogenität der Transkatheterklappenprothesen und die optimale Antikoagulation. Die von der Firma *Medtronic GmbH* hergestellte biologische Aortenklappenprothese *CoreValve™* erhielt 2007 ihre CE-Zertifizierung für medizinische Produkte und wurde seitdem weltweit implantiert. Die Behandlung mit dieser Aortenklappenprothese richtet sich an Patient:innen, die eine hochgradige Aortenklappenstenose haben. Die *JenaValve™*, eine vom Hersteller *JenaValve™ Technology GmbH* entwickelte biologische Aortenklappenprothese, hat 2011 die CE-Zertifizierung erhalten und war von 2011 bis 2016 auf dem europäischen Markt erhältlich. Die *JenaValve™* war sowohl für Prozeduren bei Patient:innen mit einer Aortenklappenstenose und als auch einer Aortenklappenregurgitation zugelassen.

Beide Transkatheter-Aortenklappenprothesen sind selbstexpandierende Klappen mit unterschiedlichem Aufbau sowie Implantations- und Verankerungsmechanismen. Sie unterscheiden sich zudem grundsätzlich von den sogenannten ballonexpandierenden Transkatheter-Aortenklappenprothesen. Für alle Transkatheter-Aortenklappenprothesen gilt aber, dass die Untersuchung der Entstehungsorte von Thromben und die zugrunde liegenden Mechanismen bisher nur unzureichend erfolgt ist. Ebenso konnte nach wie vor keine zufriedenstellende Antikoagulationsstrategie für diese Patient:innen entwickelt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die initiale Bildung von Thrombenformationen (beispielhaft in Abbildung 12 dargestellt) an biologischen selbstexpandierenden Transkatheter-Aortenklappenprothesen darzustellen und hier insbesondere die Thromboseneigung und die Lokalisation der gebildeten Thromben zu untersuchen. Es sollen die Entstehungsorte der Thrombenbildung in der *CoreValve™* und *JenaValve™* identifiziert werden, da dies der Ursprung der Entstehung von z.B. Schlaganfällen sein könnte. Dazu sollen in einem von unserer Arbeitsgruppe modifiziertem Milchgerinnungsmodell, welches die Druck- und Volumenverhältnisse der linken Herzkammer nachstellt, die verschiedenen selbstexpandierenden Transkatheterklappen auf ihre Neigung zur Thrombenbildung evaluiert werden.



Abbildung 12: CoreValve™ nach einem frustran verlaufenden Implantationsversuch. Bereits im Einführungsbesteck kam es trotz *activated-clotting-time* (ACT) - gerechter Heparinisierung des Patienten zu thrombotischen Auflagerungen (Foto: Priv.-Doz. Dr. med. Richardt)

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Die Entwicklung des Lübecker Versuchsaufbaus hat sich an früheren Studien orientiert und wurde in unserem Labor verfeinert. Die Methodik ist international etabliert und wurde in unserer Arbeitsgruppe umfangreich angewandt und entsprechend publiziert (Abbildung 13), (54), (55). Ein existentieller Bestandteil des Versuchsaufbaus ist frische Kuhmilch, welche bereits in ähnlichen Studien zur Untersuchung von verschiedenen Klappenprothesen erfolgreich zum Einsatz gekommen ist (56), (57), (55), (50). In diesen Studien ließen sich Ähnlichkeiten des Gerinnungsprozesses von Blut und enzymaktivierter Milch aufzeigen. Die Initiierung einer Gerinnung ist hierbei von entscheidender Bedeutung, um die Anheftung möglicher Thromben an der Prothese zu ermöglichen.

Die für die Experimente notwendige Kuhmilch (jeweils 60 Liter) wurde früh am Morgen von einem Biobauernhof in der Nachbarstadt Groß Grönau in Kanistern (Abbildung 13, I.) abgeholt und in einem Wasserbad (Abbildung 13, II.) mittels Tauchsieder langsam erwärmt. Um ein gleichmäßiges Erwärmen der Milch auf bis zu 37°C zu gewährleisten und eine durch einen zu schnellen Temperaturanstieg erzeugte Verklumpung zu vermeiden, wurde eine Wasserpumpe (Abbildung 13, III.) zur Umwälzung an das Wasserbad angeschlossen. Nach regelmäßiger Kontrolle der Milchttemperatur, konnte bei Erreichen der optimalen Temperatur von 37°C das Experiment erfolgen.

Durch eine Rollerpumpe (*Stöckert*, München, Deutschland) (Abbildung 13, IV.) wird die Milch mit einer Förderrate von zwei Litern pro Minute aus dem Kanister in das 1000 ml fassende Reservoir (Abbildung 13, VI.) gepumpt. Dieser Teil des Versuchsaufbaus erfolgt ab diesem Zeitpunkt, wie in Abbildung 14 zu sehen ist, in einem Inkubator (*Heinen und Löwenstein*, Bad Ems, Deutschland) (Abbildung 13, V.), welcher die Temperatur der Milch und ihres angrenzenden Mediums konstant bei 37°C stabilisiert. Über einen oberhalb des Inkubators lokalisierten Infusomaten wird ein von Mikroben hergestelltes Gerinnungsenzym (*Milase® Premium 220 BF, Bunte Kuh Käsereibedarf*, Hosenfeld, Deutschland) (Abbildung 13, VII.) mit einer Förderrate von 20 ml pro Minute der Kuhmilch hinzugefügt. Um eine für das Experiment vorgesehene Gerinnungszeit von 90 Sekunden zu gewährleisten, wird das Enzym im Verhältnis 1:2 in destilliertem Wasser gelöst. Damit das Enzym seine optimale Wirkung entfaltet, ist der Zufluss über die Schläuche so konstruiert worden, dass sich sowohl die Lösung als auch die Milch mit nur minimalem zeitlichen und

räumlichen Abstand zueinander im Reservoir vermengen. Über eine mechanische Klappe (Abbildung 13, VIII.), die sich in physiologischer Position einer Atrioventrikularklappe zu der zu untersuchenden Klappe (Abbildung 13, XII.) befindet, fließt die Milch-Enzym-Lösung dann passiv in die zweite Testkammer (Abbildung 13, IX.). Bei dieser zylinderförmigen Testkammer handelt es sich, wie in Abbildung 15 zu sehen ist, um einen nachgebildeten anatomischen, linken Ventrikel mit einem Fassungsvermögen von 250 ml. Eine außerhalb des Inkubators befindliche Hubkolbenpumpe (Abbildung 13, XI.) versetzt die am Boden des Zylinders eingebaute Membran (Abbildung 13, X.) in Schwingungen. Die Pumpe verdrängt mit einer Frequenz von 70 Schlägen pro Minute Luft im Innern ihres Zylinders. Dies erzeugt einen sich verändernden Luftdruck unterhalb der Membran und verformt diese. Hierdurch wird eine physiologische Herzfrequenz nachgeahmt.

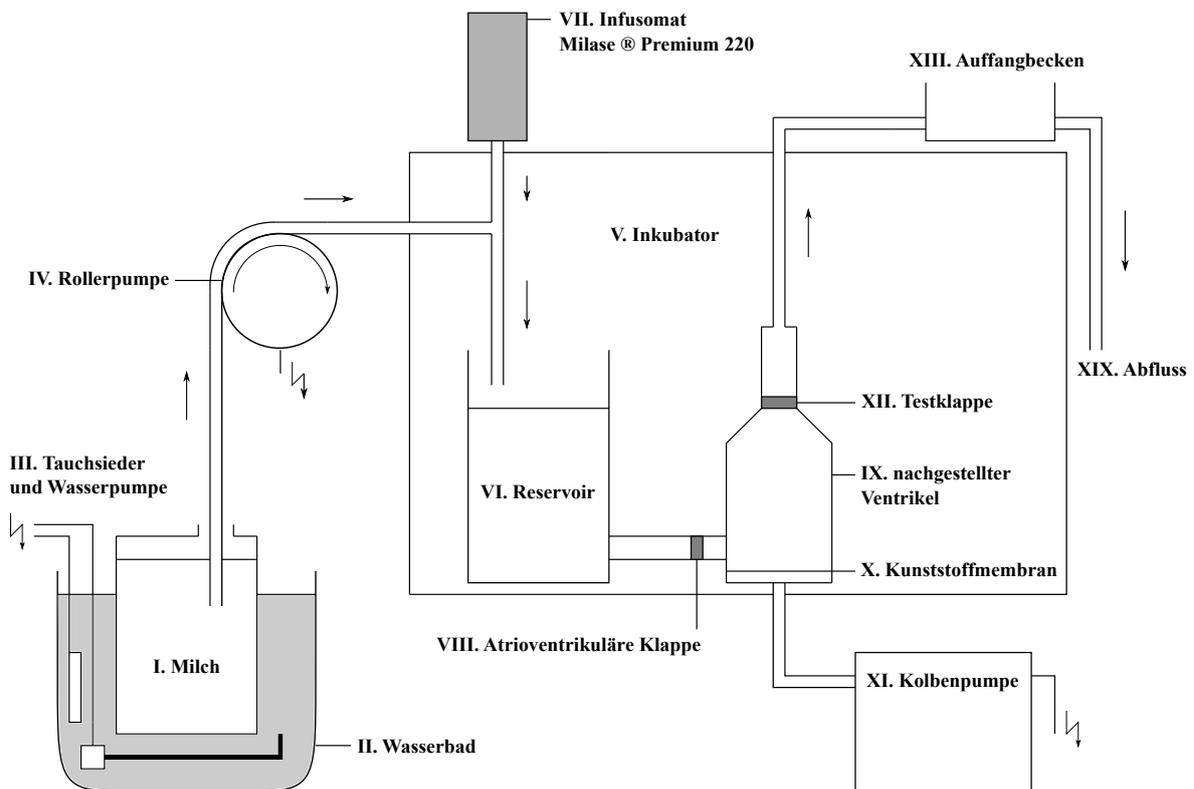


Abbildung 13: Lübecker Versuchsaufbau. Modifiziert nach (54) (Grafik: I. Scheidler)

Nach der Formel $HMV = HF \times SV$ (Herzminutenvolumen = Herzfrequenz x Schlagvolumen) ergibt sich ein Herzminutenvolumen von etwa 2 Liter pro Minute bei einer Herzfrequenz von 70 Schlägen pro Minute und einem Schlagvolumen von 28,6 ml. Am oben sich verschmälern Teil der Testkammer ist die Testklappe (Abbildung 13, XII.) fixiert, durch

welche die mit Enzym versetzte Milch das Kammersystem verlässt. Dabei wird die zu untersuchende Transkatheterklappe in einer biologische Aortenklappenprothese verankert. Ein an den Nahring der Aortenklappenprothese eingenähter Filzkragen mit einer Breite von 2 cm dient zur Befestigung der Klappe in der Kammer. Die Lokalisation der Klappe entspricht der Lage einer Aortenklappe im menschlichen Herzen. Die Milch-Enzym-Lösung wird über einen hinter der Testklappe angeschlossenen Schlauch in einem Auffangbecken (Abbildung 13, XIII.) abgeführt und strömt anschließend in den Abfluss (Abbildung 13, XIX.).

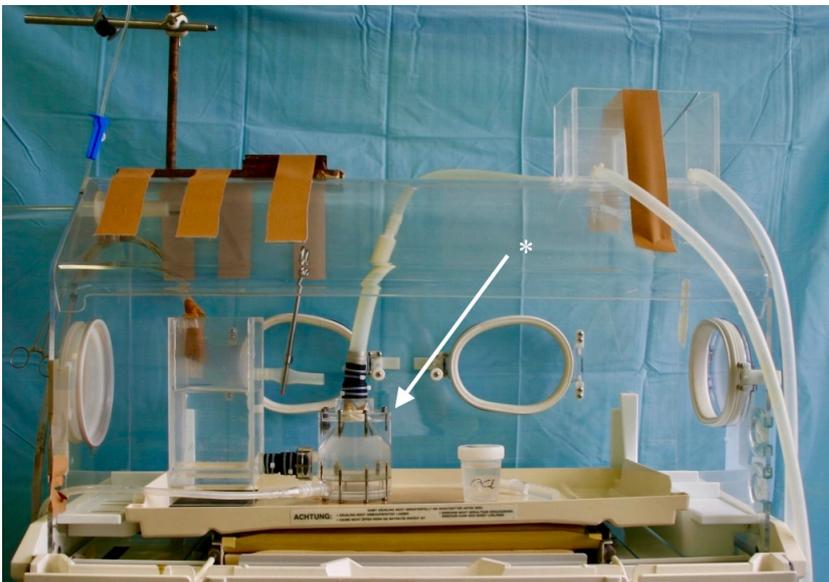


Abbildung 14: Inkubator mit Testkammer (*) (Foto: I. Scheidler)

Um ein optimales Ausmaß der Bildung von Milchthromben zu gewährleisten, wurde die Länge des Experiments in einem Testdurchlauf evaluiert. Die Versuchsdauer betrug sowohl bei den Experimenten mit der JenaValve™ als auch mit der CoreValve™ 20 Minuten. Während die Bildung der Milchgerinnsel bei einer geringeren Versuchsdauer nicht ausreichend war, um einen Thrombus identifizieren zu können, kam es bei einer Versuchsdauer von mehr als 20 Minuten zu einer flächigen Bildung von nicht mehr zu differenzierenden einzelnen Thromben.

Nach Ende des Durchlaufs wird die Milch- und Enzymzufuhr gestoppt und das Testsystem unter den gleichen Bedingungen mit Wasser durchspült, um die sich noch in der Testkammer und den Schläuchen befindende Milch zu entfernen. Anschließend wird die Testklappe ausgebaut. Nach jedem Versuchsdurchlauf wird das Testsystem in seine Bestandteile zerlegt

und gründlich gesäubert. Die an der Testklappe anheftenden Milchthromben werden nach Sicherung der Ergebnisse mittels einer weichen Bürste von den Klappentaschen und dem Stentgerüst entfernt und die Klappe sorgfältig auf etwaige Schäden untersucht.

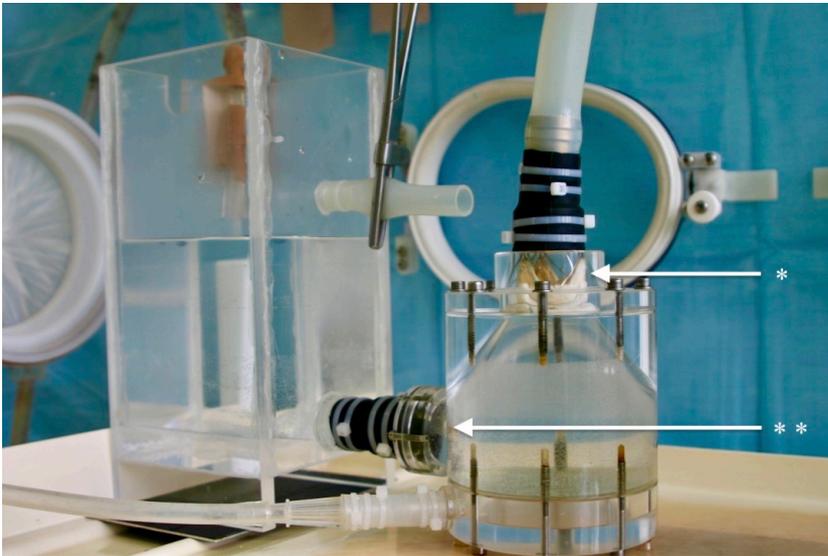


Abbildung 15: Testkammer mit Testklappe (*) und Atrioventrikularklappe ()** (Foto: I. Scheidler)

2.2 Untersuchte Klappen

In den Experimenten wurden Versuche mit den selbstexpandierenden Transkatheterklappen JenaValve™ und CoreValve™ durchgeführt. Diese waren während der experimentellen Durchläufe in einer biologischen Aortenklappenprothese (Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease) verankert.

2.2.1 CoreValve™

Bei der CoreValve™ (*Medtronic GmbH*, Minnesota, USA) handelt es sich um eine selbstexpandierende Transkatheterklappe, die endovaskulär (z.B. transfemorale) implantiert wird. Sie erhielt 2007 ihre CE-Zertifizierung für medizinische Produkte und wurde seitdem weltweit implantiert.

Die Behandlung mit einer CoreValve™ richtet sich vorrangig an Patient:innen mit einer hochgradigen Aortenklappenstenose und einem hohen Risiko für einen chirurgischen Aortenklappenersatz (58). Diese Klappe ist auf dem Markt nicht mehr erhältlich, da sie in schneller Folge weiterentwickelt wurde und bereits neue Generationen hervorgegangen sind (CoreValve™ Evolut™ R und CoreValve™ Evolut™ PRO) (59). Die Grundstruktur der Klappengenerationen ist jedoch vergleichbar.

Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, wird die Grundstruktur dieser Prothese aus einem selbstexpandierenden Nitinol-Stent gebildet. Dieser ist strahlenundurchlässig und bildet ein Gerüst für drei eingenähte Taschenklappen, die aus Perikardgewebe vom Schwein bestehen (58). Eine supraanuläre Positionierung der CoreValve-Klappen optimiert die Klappenöffnungsfläche und den Blutfluss durch die Klappe. Die Klappenprothese ist so konzipiert, dass der Zufluss in die Koronararterien in der Regel aufrecht erhalten wird. Der Stent ist derart gestaltet, dass eine möglichst hohe Abdichtung des nativen Aortenklappenanulus und damit eine geringe Rate paravalvulärer Leckagen erreicht werden kann (60).

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden Klappen der Größe 23 und 26 untersucht. Die Größe 23 wird für einen Aortenklappenanulusdurchmesser von 18 - 20 mm und die Größe 26 für einen Aortenklappenanulusdurchmesser von 20 - 23 mm empfohlen (29).

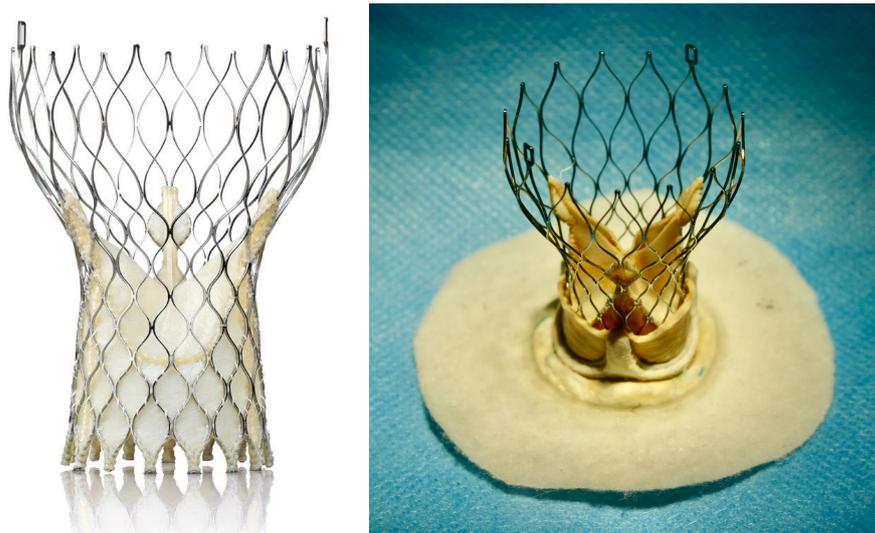


Abbildung 16: CoreValve™ vor Implantation und expandiert in einer im Filzkragen eingenähten Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Ease (Foto links: Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung von *Medtronic GmbH*, Foto rechts: I. Scheidler)

2.2.2 JenaValve™

Die JenaValve™ (*JenaValve Technology GmbH*, München, Deutschland) ist ebenfalls eine biologische Transkatheterklappe, die mittels Röntgen- und Kathetertechnik in die native Aortenklappe selbstexpandierend freigesetzt wird. Im September 2011 erhielt das transapikale JenaValve-System die CE-Kennzeichnung und wurde von der Firma *JenaValve*

Technology GmbH auf den europäischen Markt gebracht. Auf Grund technischer Probleme wurde die Klappenprothese im Jahr 2016 vom Markt genommen (61), (62). Eine nächste Generation des JenaValve-Systems mit transfemorale und transapikale Zugängen baut auf dem ursprünglichen CE-gekennzeichneten System des Unternehmens auf und befindet sich derzeit in klinischen Studien (63).

Das transapikale JenaValve™ System erhielt exklusiv die Zulassung sowohl für die Behandlung von Patient:innen mit Aortenklappenstenose als auch mit Aortenklappenregurgitation und galt als eine gute Behandlungsoption im Bereich dieser Indikationen (64).

Die JenaValve™ wird supraannulär platziert und besteht, wie in Abbildung 17 zu sehen ist, aus einem selbstexpandierenden Nitinol-Stent (65), (61). Durch das flache Design ohne Stentgitter im Bereich der Koronarostien kann eine Obstruktion der beiden Koronararterien weitestgehend vermieden werden. Die JenaValve™ besitzt drei Klappensegel, die aus Schweineperikard bestehen (62).

Bei der Implantation werden nach Aufsuchen der Klappenebene drei strahlendichte Lokalisatoren mittels Röntgenstrahlen präzise in den drei nativen Klappentaschen positioniert. Nach Lösen der Lokalisatoren ist noch eine nachfolgende Repositionierung der Prothese vor dem Expandieren des Stents möglich, was zu einer hohen Flexibilität während der Prozedur führt. Die endgültige Positionierung erfolgt letztlich durch das „Einklemmen“ der patienteneigenen Klappensegel im Nitinolgerüst der Transkatheterklappe (66).

Eine Verwendung dieser derzeit vom Markt genommenen Klappenprothese erfolgte im Rahmen dieser Promotion bewusst, da gezielt zwei verschieden aufgebaute selbstexpandierende Katheterklappen mit unterschiedlichen Implantations- und Verankerungstechniken und deren Thromboseneigungen betrachtet werden sollen.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurden jeweils zwei Klappen der Größe 23 und 25 untersucht. Die Größe 23 wird für einen Aortenklappenannulusdurchmesser von 21 - 22,9 mm und die Größe 25 für einen Aortenklappenannulusdurchmesser von 23 - 24,9 mm empfohlen (66).



Abbildung 17: JenaValve™ vor Implantation und expandiert in einer im Filzkragen eingenähten Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Ease. Die Fühler sind noch nicht korrekt in den Sinus platziert (Foto links: mit freundlicher Genehmigung von *JenaValve Technology GmbH*, Foto rechts: I. Scheidler)

2.2.3 Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Ease

Die Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease (*Edwards Lifesciences Services GmbH*, Irvine, USA) ist eine biologische Aortenklappenprothese und dient Patient:innen mit fortgeschrittenen Aortenklappenerkrankungen seit vielen Jahren als Ersatz der nativen Aortenklappe oder nicht mehr funktionsfähiger Aortenklappenprothesen bei Reoperationen. Die Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease wird im Rahmen des kardiochirurgischen Aortenklappenersatzes offen chirurgisch implantiert (67). Sie kann nicht im minimalinvasiven Transkatheterverfahren implantiert werden, ist jedoch als tragende Klappe für die *Valve-in-Valve-Prozedur* („Klappe-in-Klappe-Prozedur“) hervorragend geeignet. Dieses Verfahren kann bei Patient:innen mit einer Degeneration der implantierten Aortenklappenbioprothese und hohem Operationsrisiko durchgeführt werden.

Der Stent dieser Prothese besteht, wie in Abbildung 18 gezeigt wird, aus einer Kobalt-Chrom-Legierung und spannt drei bovine Perikardsegel auf. Die Dicke und Elastizität des Perikards ermöglichen eine Optimierung der Druckverhältnisse. Zudem liegen die Segel einer flachen Stentbasis auf. Die Stentkonstruktion ist so gewählt, dass diese die entstehende Energie während der Herzkontraktion aufnimmt, die Beanspruchung der Perikardsegel vermindert und sehr gute hämodynamische Bedingungen herstellt. Der Klappen-Nahring besteht aus Silikonkautschuk und besitzt eine Nahtmarkierung. Diese dient während der Operation der korrekten Klappenausrichtung. Diese Bioprothese besitzt einen niedrigen Querschnitt und glatte Kommissurenpfosten, was ein unkompliziertes Einführen und den spannungsfreien Verschluss der Aortomie ermöglichen soll (67).

Für die Versuche wurde eine Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease der Größe 23 verwendet, die im Versuchsaufbau eine native Aortenklappe simuliert und in welche die beschriebenen Transkatheterklappen implantiert wurden. Die Größe 23 besitzt laut Hersteller einen Innendurchmesser von 22 mm (*Stent ID*: ohne Segel) bzw. 21 mm (*True ID*: mit Segel) (68), (69).



Abbildung 18: Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Ease. Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung der *Edwards Lifesciences Corporation*

2.3 Biotechnologische und biochemische Grundlagen

2.3.1 Milch

Milch von Rindern, Ziegen und Schafen gilt als wichtige Nährstoffquelle und wird in den Milchdrüsen weiblicher Säugetiere produziert. Im Rahmen der Domestizierung von Rindern hat die Kuhmilch heutzutage als Handelsware die mit Abstand wichtigste Bedeutung (70). Die Zusammensetzung der Milchbestandteile (Fett, Protein, Laktose, Ionen) zeigt in der Kuhmilch eine große Varianz. Die Ursache dafür ist zum einen die Entstehung unterschiedlicher Rassen, welche die Produktivität der Milchleistung steigern sollten, als auch die verschiedenen Stadien der Laktation, Fütterung und Milchtechnik. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, besteht Milch zu 87 - 88 % aus Wasser, welches als Lösungsmittel für Milchsätze und als Dispersionsmittel für Milchkügelchen dient und zum Großteil als freies Wasser vorliegt. Nur ein kleiner Anteil ist an Milchbestandteile gebunden oder liegt als Hydratwasser vor. Nach Verdampfung des Wassers bleibt die Trockenmasse der Milch übrig, die 12 - 13 % ausmacht. Diese untergliedert sich wiederum in Milchfett und fettfreie Trockenmasse. Milchfett macht mit 3 - 6 % einen kleinen Teil aus und schwankt stark abhängig vom Fütterungszustand der Tiere und der Rinderrasse. Bei Milchfett handelt es

sich um Lipide, die in Milch sogenannte Fettkügelchen bilden und mit 97 - 99 % zum Großteil aus Triacylglyceriden bestehen. Lactose ist ein Disaccharid und setzt sich aus den Monosacchariden Glucose und Galactose zusammen, was den süßlichen Geschmack der Milch verursacht und 4,6 - 4,8 % der Trockenmasse ausmacht. Weitere Kohlenhydrate bilden nur einen kleinen Bestandteil. Eine weitere wichtige Nährstoffklasse bildet das Milcheiweiß, welches mit 3,2 - 3,6 % den Proteinanteil der Milch darstellt. Davon bildet das Casein mit 2,8 - 3,2 % die Hauptprotein Komponente gegenüber dem kleinen Anteil der Molkeproteine von 0,5 - 0,6 %. Nebenbestandteile machen einen kleinen Teil der fettfreien Trockenmasse aus. Dieser beläuft sich auf 1 - 1,5 % und wird unter anderem von Milchsäuren wie beispielsweise Natrium (Na^+) oder Calcium (Ca^{2+}) gebildet (71).

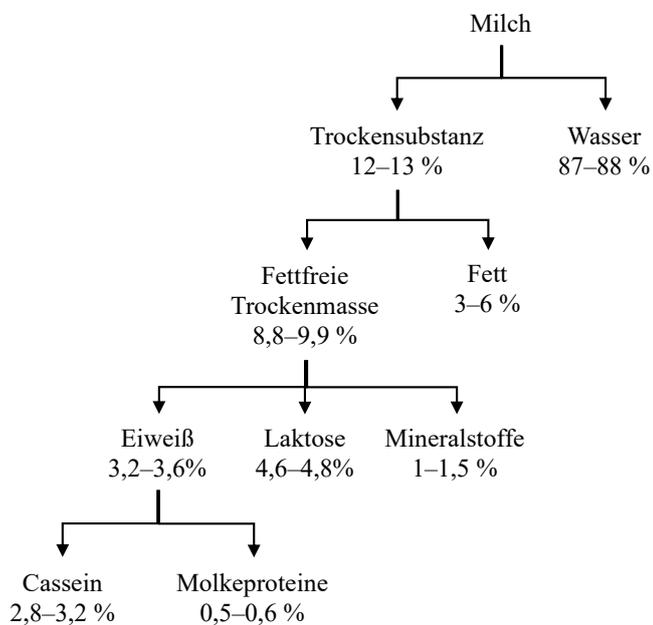


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Milchezusammensetzung (71) (Grafik: I. Scheidler)

Bereits 1939 konnte Mellander nachweisen, dass das in der Kuhmilch vorkommende Protein Casein aus drei Komponenten besteht. Diese bezeichnete er als α -, β - und γ -Casein, definiert nach elektrophoretischen Komponenten, die in seinen Experimenten nachgewiesen wurden (72). Die sich im Milcheiweiß befindliche Fraktion der Caseine macht 78 - 82 % aus und ist im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten von besonderem Interesse (73). So wird die Gerinnung der Milch unter anderem durch Caseine initiiert und zeigt Ähnlichkeiten zur Blutgerinnung (74).

Caseine lassen sich in primäres α_{S1} -, α_{S2} -, β - und κ -Casein sowie β -Caseinfragmente, sogenannte γ -Caseine, einteilen. Mit 38 % des Gesamtcaseins macht α_{S1} -Casein den größten Anteil aus. Es besteht aus 199 Aminosäuren, hat eine molare Masse von $23.619 \text{ g mol}^{-1}$ und lässt sich in fünf genetische Varianten einteilen. α_{S1} -Casein zeigt eine starke Bindungsaffinität gegenüber Calcium, welche mit der Anzahl der Phosphorylgruppen weiter steigt. Der zweitgrößte Anteil wird von β -Casein mit 36 % gebildet und setzt sich aus 209 Aminosäuren zusammen. Diese werden aus sieben unterschiedlichen genetischen Varianten gebildet. Die molekulare Masse beläuft sich auf $23.983 \text{ g mol}^{-1}$. Das β -Casein weist im Vergleich zu anderen Caseinen insbesondere bei niedrigen Temperaturen die größte Wasserlöslichkeit auf. κ -Casein setzt sich aus 169 Aminosäuren zusammen und besitzt eine molare Masse von $19.007 \text{ g mol}^{-1}$, somit ist es das kleinste und leichteste Molekül der Caseine. Sein Anteil am Gesamtcasein beträgt 11 % und es sind drei genetische Varianten bekannt. Die Besonderheit dieses Moleküls ist das Vorhandensein eines Kohlenhydratanteils und eine amphipile Molekülstruktur, welche es dem κ -Casein ermöglicht sich an der Oberfläche der Caseinmicellen anzuordnen. Das C-terminale Fragment bildet dabei mit Glutaminsäure und Kohlenhydraten die hydrophilen und das N-terminale Fragment die hydrophoben Eigenschaften (73). Weiterhin ist eine Unempfindlichkeit gegenüber Calcium bekannt, welche das κ -Casein selbst als auch α_{S1} - und β -Casein vor einer Ausfällung durch Bindung von Calcium schützt und wesentlich zur Stabilität der Caseinmicellen beiträgt. Darüber hinaus besteht eine sehr starke Empfindlichkeit gegenüber dem Labenzym, welches das κ -Casein in ein para- κ -Casein und ein Glykopeptid katalysiert. Durch eine starke Bindungsaffinität von para- κ -Casein zu Calcium kommt es zur Ausfällung der Caseinmicellen. Dies hat zur Folge, dass κ -Casein seiner Schutzfunktion vor Ausfällung nicht mehr nachkommen kann (70). α_{S2} -Casein bildet mit 10 % den kleinsten Anteil unter den primären Caseinen. Dieses unter den Caseinfraktionen größte Molekül besteht aus 207 Aminosäuren und besitzt eine molare Masse von $25.230 \text{ g mol}^{-1}$. Es existieren vier genetische Varianten. Wie auch beim α_{S1} -Casein zeigt das Molekül eine sehr starke Empfindlichkeit gegenüber Calcium. Bei der Spaltung von β -Casein durch milcheigenes Plasmin entstehen drei β -Caseinfragmente (γ_1 , γ_2 , γ_3). Sie machen einen Anteil von 3 % des Gesamtcaseins aus (73).

2.3.2 Milchgerinnungsenzym

Naturlab, bestehend aus den beiden Enzymen Chymosin und Pepsin, wird aus der Magenschleimhaut des Labmagens junger Kälber gewonnen und dient als Milchgerinnungsmittel zur traditionellen Käseherstellung. Chymosin ist das elementare Enzym in der Primärphase der Labgerinnung und hydrolysiert die Bindung zwischen Phenylalanin₁₀₅ und Methionin₁₀₆ (Phe₁₀₅ und Met₁₀₆) in der hydrophilen Region des κ -Casein. Durch Verlust der hydrophilen Hydrathülle lagern sich die entstandenen para- κ -Caseinteilchen zu Aggregaten zusammen und leiten die Gelbildung ein (74), (75).

Nach dem zweiten Weltkrieg kam es zum großen Bestreben, ein Alternative zu Milchgerinnungsenzymen aus tierischem Material zu entwickeln, da nur eine geringe Anzahl von Kälbern zur Herstellung von Naturlab verfügbar waren (76). Experimente an der Universität von Tokyo im Jahre 1966 zeigten, dass bestimmte Pilzstämme ein Enzym besitzen, welches die Milchgerinnung innerhalb einer Stunde auslösen kann. Eine entscheidende Bedeutung hatte - vor allem in der Käseindustrie - die Entdeckung der hohen Milchgerinnungsaktivität der Pilzgattung *Rhizomucor* (77). Neben tierischem Lab und pflanzlichen Proteasen haben sich so vor allem Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze als Quelle zur Herstellung von alternativen Gerinnungsenzymen in der Produktion von verschiedenen Käsesorten durchgesetzt. Hierbei wurden eine Reihe verschiedener Stämme des Schimmelpilzes *Rhizomucor miehei* für die Entwicklung von Milchgerinnungsenzymen genutzt (78), (79). Im Jahre 1971 separierte Sternberg in experimentellen Versuchen eine Protease mit milchgerinnender Eigenschaft aus *Rhizomucor miehei* und untersuchte deren chemische Eigenschaften (80). Eine umfangreich untersuchte mikrobielle Protease aus *Rhizomucor miehei* ist das Mucorpepsin, welches eine hohe Milchgerinnungs-Aktivität gegenüber einer geringen proteolytischen Aktivität besitzt. Es spaltet ebenso wie Chymosin die Phe₁₀₅-Met₁₀₆-Bindung des κ -Casein und leitet so die Milchgerinnung ein (81).

Im Rahmen der Experimente wurde *Milase® Premium 220 BF* verwendet. Dies ist eine synthetische Lösung mit einem Anteil von 1 - 2 % Mucorpepsin, welches ein aus dem Pilz *Rhizomucor miehei* kultiviertes Enzym ist. Die Lösung besitzt eine Stärke von 220 IMCU/ml \pm 10 % (*International Milk Clotting Units*) und dient unter anderem der Herstellung von Hartkäse und Weichkäse (82), (83).

2.3.3 Micellstruktur und Labelbildung

Monomere Caseine bilden, zusammengelagert als Aggregat, die Caseinsubmicellen. Diese wiederum lagern sich abermals als Komplex, den Caseinmicellen zusammen. Casein liegt zu 95 % im Zustand von Caseinmicellen vor. Sowohl hohe Calciumkonzentrationen als auch hohe Temperaturen verlagern das Gleichgewicht zu Gunsten der Bildung von Caseinmicellen (70).

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene molekulare Modelle der Micellstruktur beschrieben, bislang konnte man sich aber noch nicht auf ein allgemeingültiges Modell zur Struktur der Caseinmicelle festlegen. Als ein sehr populäres Modell gilt das „Dual-binding“-Modell der Caseinmicelle nach Horne, wie es in Abbildung 20 zu sehen ist. Demnach entsteht eine Caseinmicelle durch elektrostatische Abstoßung und der hydrophoben Anziehung der beteiligten Moleküle. Horne postuliert, dass zwei oder mehr hydrophobe Regionen verschiedener Moleküle ein Cluster bilden („rechteckige Balken“). Demgegenüber binden Calcium-Phosphat-Cluster (CCP = „Dreieck“) an vier oder mehr Phosphoserinresten, welche Bestandteile der α_{S1} -, α_{S2} - und β - Caseine (α_{S1} -, α_{S2} - und β -CN) sind („schwarze Linien“). So entsteht eine Quervernetzung der beteiligten Moleküle. κ -Casein interagiert über seine hydrophoben Domänen mit den hydrophoben Bereichen der anderen Caseine. Die Micellvergrößerung wird durch die Bindung von κ -Casein (κ -CN) mit dem hydrophilen C-terminalen Ende an der Oberfläche limitiert (84).

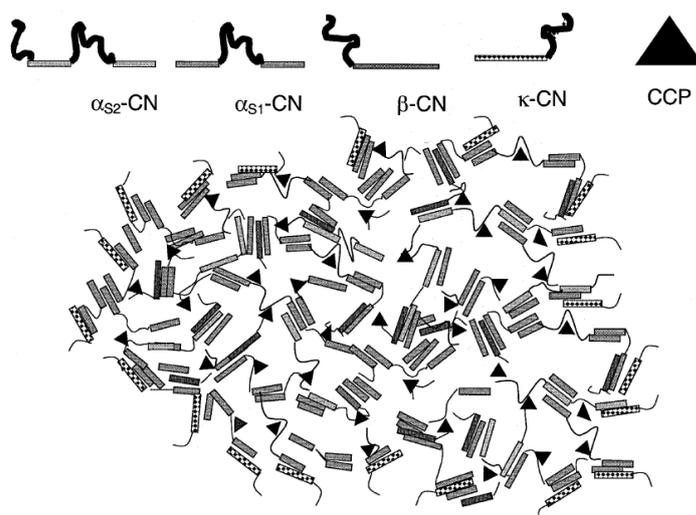


Abbildung 20: "Dual-binding"-Modell der Caseinmicelle nach Horne. Rechteckige Balken = hydrophobe Proteinbereiche; schwarze Linien = hydrophile Proteinbereiche, CCP = Colloidal Calcium Phosphate, α_{S1} -, α_{S2} -, β -, und κ -CN = α_{S1} -, α_{S2} -, β -, und κ -Casein (85). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags

Die Milchgerinnung lässt sich in drei wichtige kinetische Prozesse unterteilen, welche von Carlson 1987 beschrieben wurden (86):

1. Enzymatische Hydrolyse des κ -Caseins
2. Ausflockung von Caseinmicellen
3. Bildung einer vernetzten Gelstruktur

Die einleitende Phase wird durch die initiale Spaltung der Peptidbindung zwischen Phenylalanin₁₀₅ und Methionin₁₀₆ des κ -Caseins durch das Chymosin, ein enzymatischer Bestandteil des Kälberlafs, gebildet (87). Bei dieser sehr schnell ablaufenden Spaltung entstehen das para- κ -Casein, welches im Micellverband verweilt, und das Caseinmakropeptid, welches wiederum in das Milchserum abwandert. Aufgrund der Schnelligkeit der Reaktion wird davon ausgegangen, dass sich diese Peptidbindung an der Oberfläche der Caseinmicelle befindet (88), (75).

Die zweite Phase beinhaltet einen komplex ablaufenden Prozess der Ausflockung der Caseinmicellen. Ausgelöst wird dies u. a. durch den Verlust des Oberflächenpotenzials (86). Durch Dissoziation des Caseinmakropeptids verliert die Caseinmicelle sowohl einen Teil der negativen Oberflächenladung als auch ihre Hydrathülle. Die nun nicht mehr vorherrschenden Abstoßungskräfte ermöglichen eine kettenförmige Zusammenlagerung der para- κ -Caseinelemente. Wenn etwa 75 - 80 % des κ -Caseins enzymatisch aufgespalten sind, läuft die Gelbildung an und Ca^{2+} -Ionen binden jeweils zwei benachbarte para- κ -Caseine (75).

Die dritte Phase der Milchgerinnung beinhaltet die Gelverfestigung, welche mit steigender Temperatur zunimmt und in einem Temperaturbereich von 31 - 45 °C optimal gewährleistet ist (89), (70). Die para- κ -Caseinketten werden miteinander verfestigt und es entsteht ein dreidimensionales Netzwerk (75).

2.3.4 Blut

Innerhalb des lebenden Organismus übernimmt das Blut vielzählige Funktionen. Neben der Funktion der Speicherung von Flüssigkeit, ist die Transportfunktion von entscheidender Bedeutung, welche zum Beispiel bei der Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und dem Abtransport von Kohlenstoffdioxid ein wichtiger Bestandteil ist. Darüber hinaus werden Muskulatur und Nervensystem über den Blutkreislauf mit aufgenommenen Nährstoffen aus

Leber, Darm und Fettgewebe versorgt und anfallende Stoffwechselprodukte der Ausscheidung über Niere und Leber sowie Hormone, welche der Kommunikation zwischen den Körperzellen dienen, und überschüssige, an die Körperoberfläche abzugebende Wärme transportiert (90).

Der menschliche Körper besitzt - gewichtsabhängig - etwa fünf Liter Blut, welches sich in eine korpuskuläre und eine gelblich-klare flüssige Komponente unterteilen lässt. Mittels Zentrifugation von ungeronnenem Blut ist die Trennung dieser beiden Komponenten, also in Zellvolumen und Plasmavolumen, möglich. Wird hingegen geronnenes Blut zentrifugiert, handelt es sich bei dem Überstand um Serum, da gerinnungsaktive Proteine, zum Großteil Fibrinogen, dem Plasmavolumen zur Gerinnung zuvor entzogen wurden. Das Zellvolumen setzt sich zu 99 % aus Erythrozyten und zu 1 % aus Thrombozyten und Leukozyten zusammen (90). Das Plasmavolumen besteht zu 90 % aus Wasser und zu 10 % aus gelösten Bestandteilen wie Proteinen, niedermolekularen Stoffen und Elektrolyten (91). Die Erythrozyten enthalten Hämoglobin, ein Blutfarbstoff, der Ihnen die rote Farbe verleiht und ihnen ermöglicht Sauerstoff zu binden und diesen zwischen Lunge und Gewebe zu transportieren. Die Leukozyten, welche sich aus den verschiedenen Leukozytensubtypen in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten gliedern, erfüllen die Funktion der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr. Bei den Thrombozyten handelt es sich um eine kleine Zellpopulation von kernlosen Blutplättchen, welche mit einer Anzahl von 170.000 - 400.000/ μl für die Hämostase, also für die Blutstillung und Blutgerinnung, bei Gefäßendothelverletzungen verantwortlich sind. Die gelösten Substanzen des Blutplasmas bestehen zu etwa 75 % aus Plasmaproteinen, von denen über 100 Proteine und ihre Funktion charakterisiert wurden. Insgesamt nachgewiesen wurde allerdings eine große Anzahl von 300 Proteinen, welche überwiegend nur in sehr geringen Konzentrationen im Plasma vorliegen (91).

Mittels Serumelektrophorese lassen sich die Serumproteine nach ihrer Ladung und Größe in sechs Fraktionen auftrennen: Albumin (60,9 %), Alpha 1 (4,7 %), Alpha 2 (11,3 %), Beta 1 (6,0 %), Beta 2 (5,3 %) und Gamma (11,8 %). Albumin weist aufgrund seiner relativ geringen Molekülmasse und hohen Konzentration die größte Anzahl osmotisch wirksamer Teilchen auf und ist somit das Protein, welches den überwiegenden Anteil des kolloidosmotischen Drucks bildet. Eine weitere Funktion von Albumin ist die Bindung und der Transport von hydrophoben Substanzen und zweiwertigen Ionen wie Kalziumionen. Die Fraktion der α_1 -Globuline ist unter anderem mit α_1 -Antitrypsin an der Proteaseninhibition

und mit α_1 -Lipoprotein, auch bekannt als *High Density Lipoprotein* (HDL), am Transport von Cholesterin zur Leber beteiligt. Bei den α_2 -Globulinen handelt es sich unter anderem um α_2 -Makroglobulin, welches ebenfalls eine Rolle bei der Proteaseninhibition spielt, und Antithrombin, das ein Thrombininhibitor ist und somit die Hemmung der Blutgerinnung auslöst. Die Bande der β -Globuline bildet den drittgrößten Anteil der Eiweiße im Plasma und besteht unter anderem aus β -Lipoprotein, das das Cholesterin von der Leber in die Peripherie transportiert und unter dem Namen *Low Density Lipoprotein* (LDL) bekannt ist. Ein weiterer Vertreter dieser Fraktion ist das C-reaktive Protein, welches ein Akute-Phase-Protein der Leber ist und unter anderem bei entzündlichen Prozessen gebildet wird. Die γ -Globuline sind die zweitgrößte Fraktion der Plasmaproteine und werden hauptsächlich von im Blut zirkulierenden Immunglobulinen gebildet, welche der erworbenen humoralen Immunabwehr dienen (92).

2.3.5 Blutgerinnung

Kommt es im menschlichen Organismus zu einer Verletzung der Gefäße, so ist eine adäquate Blutstillung und Blutgerinnung unerlässlich. Diese lässt sich in eine primäre und sekundäre Hämostase unterteilen. Während der primären zellulären Hämostase kommt es zur initialen Bildung eines sogenannten weißen Thrombus und somit zum Sistieren einer Blutung aus kleinen Gefäßen innerhalb weniger Minuten (Abbildung 21). Die sekundäre plasmatische Hämostase ist für die Bildung eines roten Thrombus verantwortlich, welcher den Gefäßeinriss endgültig verschließt und insbesondere eine wichtige Funktion bei größeren Verletzungen hat (Abbildung 22) (93).

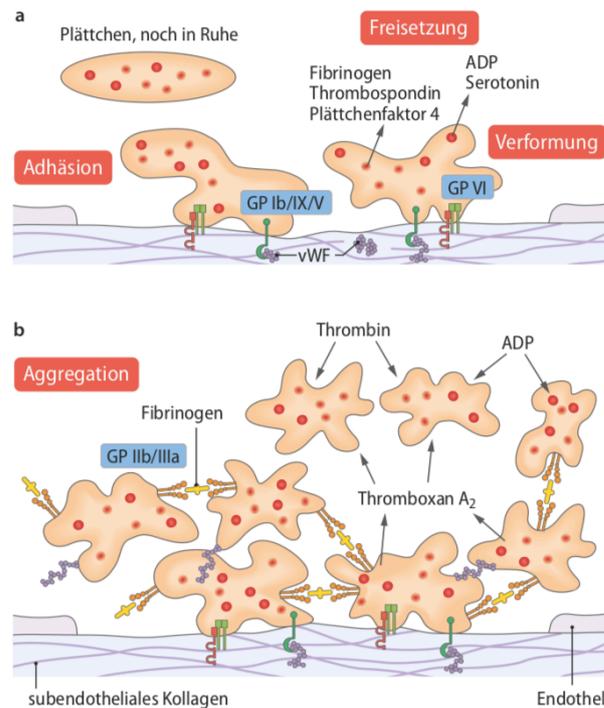


Abbildung 21: Entstehung eines Thrombozytenpfropfes an subendothelial freiliegendem Kollagen (93).

Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags

Die primäre Blutstillung lässt sich in mehrere Phasen unterteilen: Vasokonstriktion, Thrombozytenadhäsion, Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenaggregation (Abbildung 21). Unter physiologischen Bedingungen befinden sich Thrombozyten an der Außenseite des Blutstroms und werden durch von Endothelzellen ausgeschüttetes Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) an einer Adhäsion und Aggregation am Gefäßendothel gehindert (92). Unmittelbar nach einer Verletzung des Gefäßendothels kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten. Diese exprimieren einen Rezeptor, das sogenannte Glykoprotein Ib/IX/V, welcher eine Komplexbildung mit dem Von-Willebrand-Faktor (vWF) eingeht und an freiliegendes subendotheliales Kollagen binden kann. Der vWF liegt gespeichert in Thrombozyten, Endothelzellen und gebunden an dem Gerinnungsfaktor VIII (antihämophiles Globulin A) vor. Zusätzlich exprimierte Rezeptoren, Glykoprotein VI und Ia/IIa, ermöglichen eine direkte Bindung der Thrombozyten an das freiliegende Kollagen, Laminin und Fibronectin (93). Aktivierte Thrombozyten ändern über die Lipidzusammensetzung der Membran ihre Form und es kommt zur Ausschüttung von in Granula gespeicherten Substanzen wie Thromboxan A₂ (TXA₂) und Serotonin, welche eine Vasokonstriktion herbeiführen und somit dem Blutverlust entgegenwirken. Freigesetztes Adenosindiphosphat (ADP) und Plättchenaktivierender Faktor (PAF) verstärken die

Aktivierung weiterer Thrombozyten. Zur Bildung eines stabilen Netzwerks aus zusammenhängenden Thrombozyten ist die Adhäsion der Blutplättchen untereinander unerlässlich. Über Glykoprotein IIb und IIIa, Rezeptoren auf den Thrombozyten, können die Blutplättchen untereinander an Faktor I (Fibrinogen) und den vWF binden und eine Aggregation bewirken (92).

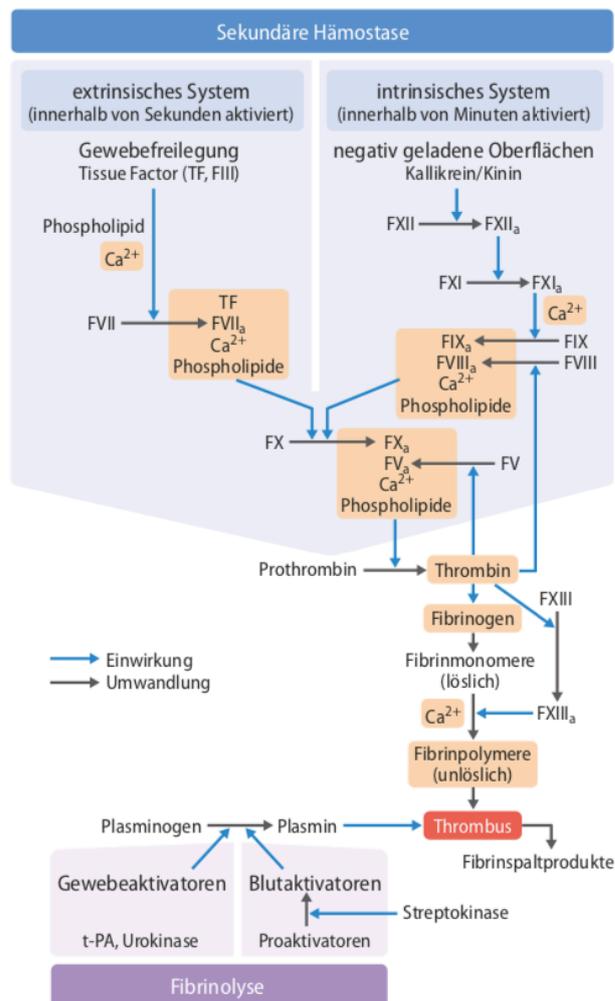


Abbildung 22: Extrinsisches und intrinsisches System der sekundären Hämostase (93). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags

Um einen dauerhaften Verschluss der Wunde und eine adäquate Wundheilung zu gewährleisten, ist die Stärkung der bestehenden nicht-kovalenten Bindungen zwischen den Thrombozyten durch die Bildung kovalenter Fibrinpolymeren entscheidend. Die sekundäre Hämostase wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen ausgelöst: das extrinsische und das intrinsische System (Abbildung 22). Eine entscheidende Rolle spielen die

Gerinnungsfaktoren, die, entsprechend ihrer Entdeckung, in römische Zahlen I - XIII definiert wurden. Sobald ein Gerinnungsfaktor im Rahmen der Gerinnungskaskade aktiviert wird, deklariert man diesen mit einem tiefgestellten „a“ (92). Die Blutgerinnung basiert auf einer Kaskade von Zymogenaktivierungen. Zymogene sind inaktive Vorstufen von Enzymen, welche durch Proteolyse aktiviert werden. Ein aktivierter Gerinnungsfaktor führt zur Aktivierung zahlreicher nachfolgender Gerinnungsfaktoren. Diese sind zugleich auch in der Lage mehrere Gerinnungsfaktoren zu aktivieren. Die Besonderheit dieses Prozesses ist somit die Verstärkung der Katalyse eines einzelnen Enzyms, was für eine schnelle Einleitung der Blutgerinnung bei Gefäßverletzungen von Bedeutung ist (94). Die Aktivierung des extrinsischen (extravaskulären) Weges geschieht durch den Faktor III (Gewebethromboplastin), ein freigesetztes Membranprotein, nach vorheriger Läsion des Gefäßendothels. Dem gegenüber steht die innerhalb von Minuten ablaufende Aktivierung des intrinsischen Weges durch intravaskulär exponierte negativ geladene Oberflächen an Läsionen des Endothels, wie zum Beispiel Kollagen. Der extrinsische Mechanismus läuft innerhalb von Sekunden ab und ist von größerer Bedeutung bei der menschlichen Blutgerinnung (94). Nach Kontakt mit dem Blut, bindet der Faktor III an negativ geladene Phospholipide und positiv geladene Ca^{2+} - Ionen und es kommt zur Komplexbildung mit Faktor VII (Prokonvertin) (93). Diese Komplexbildung und die nachfolgenden Prozesse der Gerinnung finden größtenteils an den Oberflächen der aktivierten Thrombozyten statt, da diese eine hohe Anzahl an negativ geladenen Phospholipiden besitzen (92). Demgegenüber aktivieren die intravaskulär negativ geladenen Oberflächen den Faktor XII (Hageman Factor), welcher die Bereitstellung der aktivierten Faktoren XI (Plasma Thromboplastin Antecedent, Rosenthal-Factor) und IX (Christmas-Factor) initiiert. Es bildet sich ein Komplex aus aktiviertem Faktor IX, Ca^{2+} und Phospholipiden, dessen Entstehung ebenfalls vom Faktor VIII (antihämophiles Globulin A) beschleunigt wird. Sowohl das extrinsische, als auch das intrinsische System mit ihren jeweils gebildeten Enzymkomplexen münden in einer gemeinsamen Endstrecke, welche durch die Aktivierung des Faktor X (Stuart-Power-Factor) gekennzeichnet ist. Dessen aktive Form bindet an die aktive Form des Faktor V_a (aktiviertes Proakzelerin), Ca^{2+} und Phospholipiden und bildet einen dritten Komplex, der den Faktor II (Prothrombin) in den aktiven Faktor II_a katalysiert (93). Eine Bindung an aktivierte Thrombozyten und dessen negativ geladene Phospholipide findet nun nicht mehr statt, Thrombin katalysiert die Reaktion von Fibrinogen zu Fibrin.

Fibrinogen besteht aus jeweils zwei α -, β - und γ -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und eine parallele Organisation aufzeigen. Thrombin spaltet jeweils kurze Peptide an der α - und der β -Untereinheit des Fibrinogens ab, sodass hydrophobe Areale freigelegt werden. Diese Bereiche interagieren über nicht-kovalente Bindungen zu anderen Fibrinmonomeren und lassen so ein instabiles Fibrinpolymer entstehen (Abbildung 23). Der Faktor XIII, welcher durch Thrombin aktiviert wird, bildet Isopeptidbindungen zwischen zwei benachbarten Fibrinmonomeren. Die sekundäre Hämostase schließt mit der Bildung eines stabilen und über kovalente Bindungen bestehenden weißen Thrombus ab (92).

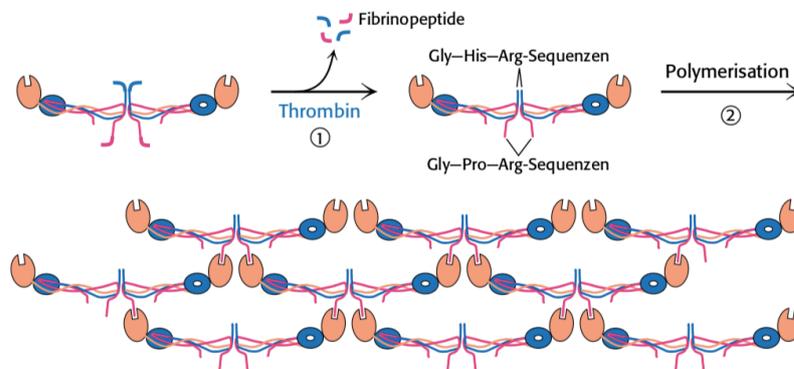


Abbildung 23: Bildung von Fibrinpolymeren (94). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags

2.3.6 Labelbildung und Blutgerinnung im Vergleich

Bereits 1975 verglich Jollès die strukturellen Eigenschaften des Prozesses der Blut- und Milchgerinnung. So ging er davon aus, dass sowohl die limitierte Proteolyse des Fibrinogens durch Thrombin als auch die des κ -Caseins durch Chymosin der Auslöser der Gerinnung sei (74). Sowohl Thrombin als auch Chymosin katalysieren als proteolytisches Enzym im Gerinnungsprozess die Hydrolyse von Peptidbindungen (95). Die Bindestellen der beiden Substrate Fibrinogen und κ -Caseins reagieren beide unter Photooxidation mit einem Verlust der Bindungsaffinität zu ihren jeweiligen Enzymen. Bezüglich der Oberflächenladung lässt sich feststellen, dass sowohl Fibrinopeptide des Fibrinogens als auch N-Acetylneuraminsäure und Phosphoserin des κ -Caseins ein negatives Verhalten zeigten. Eine weitere Gemeinsamkeit ist sowohl die beschleunigte Aggregation der Fibrinpolymere als auch der Caseinmicellen in Anwesenheit von Calcium-Ionen (74). In darauffolgenden

Untersuchungen stellte Jollès fest, dass sowohl die Primärstruktur von κ -Casein und die γ -Kette des Fibrinogen in bestimmten Aminosäuresequenzen als auch die Sekundärstruktur in untersuchten Positionen von der α -Helix und des β -Faltblatts teilweise übereinstimmen (96).

2.4 Versuchsdurchführung

Es wurden vier Versuchsreihen mit JenaValve™-Klappen in den Größen 23 und 25 und mit CoreValve™-Klappen in den Größen 23 und 26 durchgeführt. Diese Größen entsprechen der klinischen Erfahrung nach den am häufigsten genutzten Implantationsgrößen und sind für die Implantation in eine Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease Bioprothese der Größe 23 geeignet. Mit jedem Klappentyp und jeder Klappengröße wurden jeweils mindestens fünf experimentelle Durchläufe vollzogen, um eine statistisch verwertbare Auswertung sicherzustellen.

Mit der JenaValve™ der Größe 23 wurden insgesamt neun Versuche durchgeführt, davon waren vier Versuche verwertbar. Gründe für den Ausschluss der übrigen Versuche waren eine übersteigerte Bildung von Milchthromben, welche sich bereits im Reservoir gebildet hatten, im nachgestellten Ventrikel angespült wurden und sich an die Taschenklappen angelagert hatten. Auch eine nicht ausreichend verwertbare fotografische Datenerhebung führte zum Ausschluss von Versuchen. Die Versuchsreihen mit der JenaValve™ der Größe 25 und der CoreValve™ der Größe 26 wurden mit jeweils fünf Versuchen durchgeführt, die alle ausgewertet werden konnten. Die Versuchsreihe mit der CoreValve™ der Größe 23 musste ausgeschlossen werden, da - auch nach dem Austausch von Materialien im Versuchsaufbau - keine akzeptablen Volumen - und Druckverhältnisse aufgebaut werden konnten.

Um ein optimales Ausmaß der Bildung von Milchthromben zu gewährleisten, wurde die Länge des Experiments in initialen Testdurchläufen angepasst. Die Versuchsdauer betrug sowohl bei den Experimenten mit der JenaValve™ als auch mit der CoreValve™ 20 Minuten. Bei einer geringeren Versuchsdauer waren die Bildung der Milchgerinnsel nicht ausreichend, um einen Thrombus zu identifizieren und bei einer Versuchsdauer von mehr als 20 Minuten kam es zu einer flächigen Bildung von nicht zu identifizierenden einzelnen Tromben. Im optimalen Zeitfenster zeigte sich eine Gerinnselbildung unterschiedlichen Ausmaßes im Bereich des Sinus, der Kommissuren und der Wand der jeweiligen Tasche.

2.5 Auswertung

Unmittelbar nach dem Versuchsdurchlauf wurde die biologische Aortenklappenprothese mit der darin befindlichen und zu untersuchenden Transkatheterklappe ausgebaut. Mit einer *Canon EOS 300D-Kamera* (*Carls Zeiss GmbH*, Göttingen, Deutschland) wurde die Klappe fotografisch aus verschiedenen Aufnahmewinkeln dokumentiert. Um eine hochwertige optische Vergrößerung der angelagerten Thromben gewährleisten zu können, wurde eine Nahlinse mit einer Vergrößerung von 10 dpt verwendet. Die Aufnahmen wurden anschließend auf dem Computer im *JPG*-Format gespeichert und die an der Klappentasche haftenden Thromben am Bildschirm ausgezählt. Anhand eines international etablierten Zähl-Schemas erfolgte die Auszählung und Auswertung der Thromben in den jeweiligen Aufnahmen (Abbildung 24).

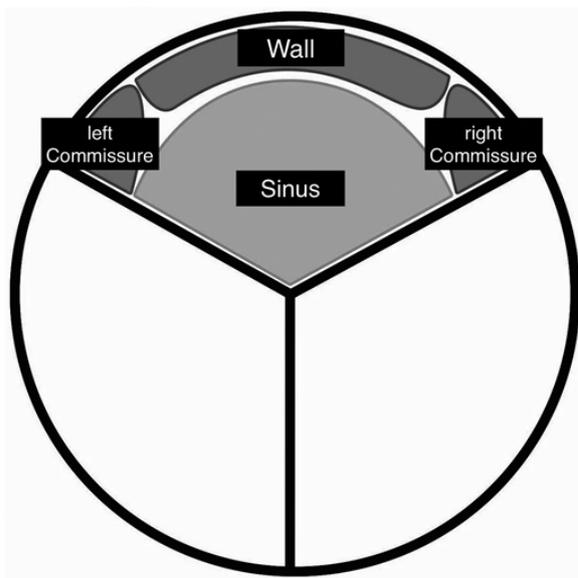


Abbildung 24: Definition der Gerinnsellokalisation in der Transkatheterklappe: Ablagerung im Bereich der linken Kommissur (*left Commissure*), Ablagerung im Bereich der rechten Kommissur (*right Commissure*), Ablagerung im Bereich der Wand (*Wall*) und Ablagerung im Bereich des Sinus (*Sinus*) (49). Mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press

Zu Beginn wurden die jeweils zu untersuchenden Klappentaschen von eins bis drei durchnummeriert, um einer Verwechslung während des Auszählens entgegenzuwirken. Die unterschiedlichen Aufnahmewinkel ermöglichten eine Auswertung der Anzahl der Thromben in den verschiedenen Lokalisationen der Klappe. Die Auszählung erfolgte durch

zwei Personen, um die Gefahr eines systematischen Fehlers zu minimieren und die Auszählung zu objektivieren.

2.6 Statistik

Die erhobenen Daten wurden in der Anzahl \pm Standardabweichung angegeben. Mittels des *Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests* ließ sich anhand paarweiser Vergleiche der Mittelwerte in den vier Untersuchungsbereichen als auch der verschiedenen Klappen feststellen, welche Mittelwerte sich signifikant voneinander unterscheiden. Mithilfe des *Kruskall-Wallis-Test* wurde überprüft, ob sich die mittlere Anzahl der Thromben in Bezug auf die Lokalisation und die Art der Klappe unterscheiden und eine Signifikanz besteht. Als hoch signifikant wurden p-Werte $<0,001$ und als signifikant p-Werte $<0,05$ gewertet. Zur Durchführung der statistischen Bewertung wurde *IBM SPSS Statistics Version 22* (IBM, Armonk, New York, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 JenaValve™ 23

Von neun Versuchsdurchläufen mit der JenaValve™ der Größe 23 konnten vier in die Versuchsauswertung einbezogen werden. Zu Beginn der ersten drei Versuchsdurchläufe kam es zu einer überschießenden Milchgerinnung und zur Bildung nicht voneinander abgrenzbarer Thromben im Bereich der Taschen. Bei einem weiteren Versuch zeigte sich im Verlauf ebenfalls eine zu starke Milchgerinnung mit Bildung von nicht auswertbaren Artefakten. Eine unzureichende Förderrate des Gerinnungsenzyms bei einem der letzten Experimente führte zum Ausbleiben der Milchgerinnung und somit der Thrombenbildung und konnte daher nicht in die Auswertung eingeschlossen werden. Insgesamt konnten damit zwölf Klappentaschen im Bereich von Sinus, Kommissuren und Wand ausgewertet werden (Abbildung 25). Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Thromben im Bereich der Taschen der JenaValve™ 23.

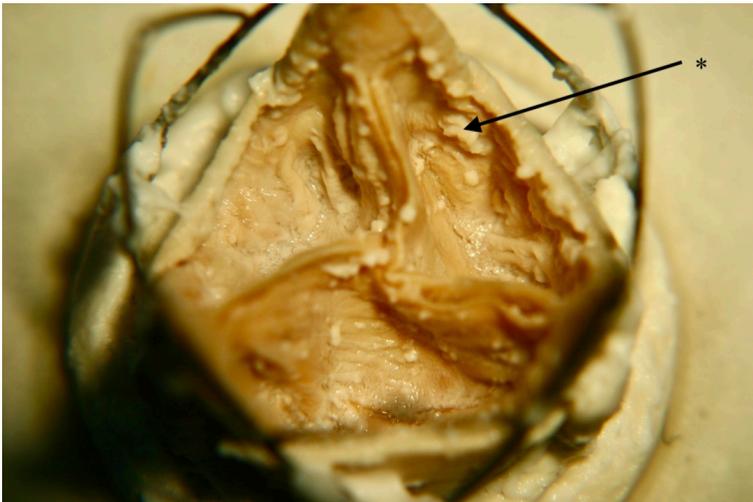


Abbildung 25: Thrombenbildung im Bereich der linken Kommissur der JenaValve™ 23 (*)
(Foto: I. Scheidler)

Absolute Thrombenzahl	JV 23
Sinus	273
Kommissur rechts	171
Kommissur links	194
Wand	146
Gesamtthrombenzahl	784

Tabelle 1: Absolute Thrombenzahl in den kategorisierten Untersuchungsbereichen der JenaValve™ 23 (JV 23)

3.2 JenaValve™ 25

Alle durchgeführten fünf Versuche konnten in die Bewertung einfließen. Während des vorletzten Versuchs zeigte sich eine vermehrte flächenhafte Mikrothrombenbildung, welche die Auswertung der Thrombenverteilung jedoch nicht beeinflusste. Weiterhin kam es bei dem letzten Versuch zur Entstehung größerer miteinander verbundener Thromben, es ließen sich allerdings einzelne Thromben abgrenzen und auswerten. Somit sind insgesamt 15 Klappentaschen der JenaValve™ in die Auswertung geflossen (Abbildung 26). Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der Verteilung der Thromben in den Taschen der JenaValve™ 25.

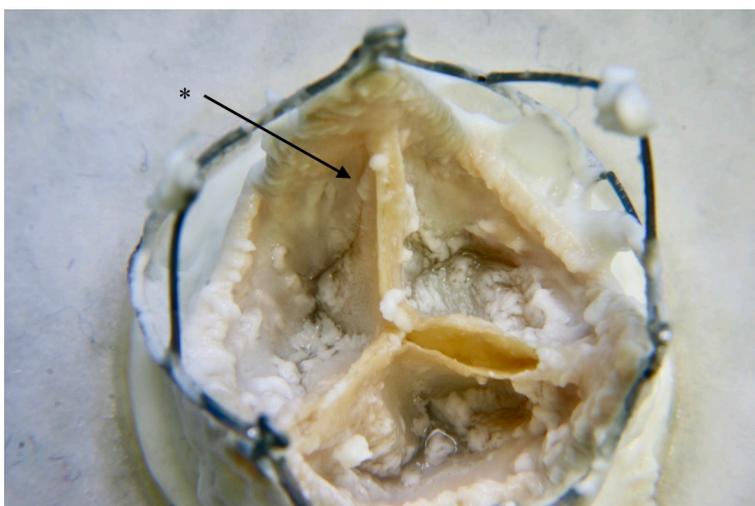


Abbildung 26: Thrombenbildung im Bereich der rechten Kommissur der JenaValve™ 25 (*).
(Foto: I. Scheidler)

Absolute Thrombenzahl	JV 25
Sinus	665
Kommissur rechts	399
Kommissur links	361
Wand	250
Gesamtthrombenzahl	1675

Tabelle 2: Absolute Thrombenzahl in den kategorisierten Untersuchungsbereichen der JenaValve™ 25 (JV 25)

3.3 CoreValve™ 23

Die geplante Versuchsreihe mit der CoreValve™ 23 ließ sich nicht verwirklichen. So zeigte sich auch nach Materialwechsel keine Möglichkeit eines Aufbaus adäquater Druck- und Volumenverhältnisse. Eine mögliche Ursache könnte eine nicht effektiv zu behebende und suboptimale Positionierung der CoreValve™ 23 gewesen sein, da diese grenzwertig klein für die Verankerungsklappe ist. Es kam zur Bildung großer Koagel im Reservoir und die Experimente mussten frühzeitig abgebrochen werden.

3.4 CoreValve™ 26

Es konnten alle fünf Versuchsdurchläufe in die Auswertung eingeschlossen werden, jedoch waren nur drei vollständig beurteilbar. Während des dritten Versuchsdurchlaufs waren die Thromben im Bereich der rechten Kommissur eines Segels nicht auszählbar aufgrund eines aufliegenden großen Thrombus und einer sehr starken Thrombosierung des Stentgerüsts und der Segelränder. Im nachfolgenden Experiment zeigten sich wiederholt starke Auflagerungen von großen Thromben am Stentgerüst und im Öffnungsbereich. Somit war eine Auswertung des Sinus, der Wand und der rechten Kommissur nicht möglich. Insgesamt zeigte sich bei allen Versuchsdurchläufen eine starke Thrombosierung am Stentgerüst und im Öffnungsbereich der Taschenränder (Abbildung 27). Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der Verteilung der Thromben in den Taschen der CoreValve™ 26. Insgesamt konnten fünfzehn Klappentaschen der fünf CoreValve™ 26 mit in die Auswertung einfließen.

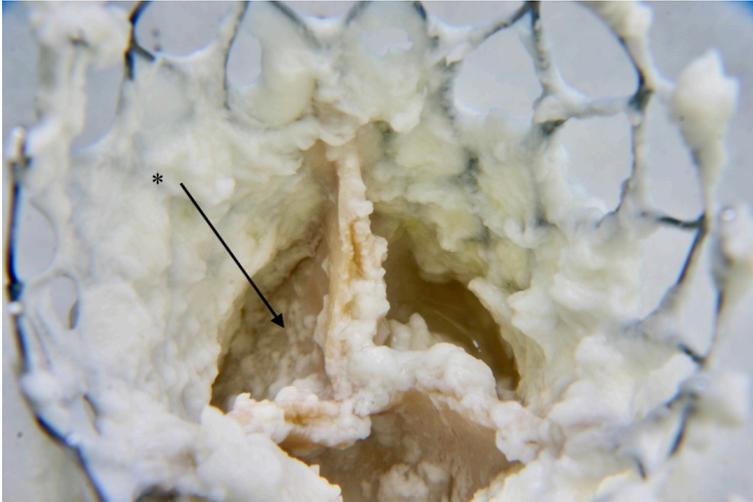


Abbildung 27: Thrombenbildung im Bereich des Sinus der CoreValve™ 26 (*). (Foto: I. Scheidler)

Absolute Thrombenzahl	CV 26
Sinus	696
Kommissur rechts	265
Kommissur links	313
Wand	166
Gesamtthrombenzahl	1440

Tabelle 3: Absolute Thrombenzahl in den kategorisierten Untersuchungsbereichen der CoreValve™ 26 (CV 26)

3.5 Vergleich der selbstexpandierenden Aortenklappenprothesen

Die untersuchten Klappenprothesen zeigen eine ähnliche Formation und Lokalisation von Thromben wie dies zuvor in explantierten Klappenprothesen beobachtet wurde (Abbildung 12, Abbildung 29). Formationen von Milchthromben konnten in allen vier kategorisierten Untersuchungsbereichen der untersuchten Aortenklappenprothesen identifiziert werden (Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 10 im tabellarischen Anhang). In Tabelle 4 sind die absoluten Zahlen an Thromben in den definierten Bereichen der untersuchten Prothesentypen dargestellt.

Absolute Thrombenzahl	CV 26	JV 23	JV 25	Gesamt
Sinus	696	273	665	1634
Kommissur rechts	265	171	399	835
Kommissur links	313	194	361	868
Wand	166	146	250	562
Gesamtthrombenzahl	1440	784	1675	3899

Tabelle 4: Absolute Zahl der Thromben in der CoreValve™ 26 (CV 26), JenaValve™ 23 (JV 23) und JenaValve™ 25 (JV 25)

Sowohl bei der CoreValve™ als auch bei der JenaValve™ bildete sich ein dünner Film aus zarten Milchthromben mit größeren aufgelagerten und an Brotkrümel erinnernde Thromben (beispielhaft Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27). Im Durchschnitt lag die Anzahl der Thromben aller untersuchten Klappenprothesen zu 41,9 % im Sinus, zu 21,4 % in der rechten Kommissur, zu 22,3 % in der linken Kommissur und zu 14,4 % an der Wand (Abbildung 28, Tabelle 5).

Prozentualer Anteil	CV 26	JV 23	JV 25	Gesamt
Sinus	48,3	34,8	39,7	41,9
Kommissur rechts	18,4	21,8	23,8	21,4
Kommissur links	21,7	24,7	21,6	22,3
Wand	11,5	18,6	14,9	14,4

Tabelle 5: Prozentualer Anteil der Thromben in der CoreValve™ 26 (CV 26), JenaValve™ 23 (JV 23) und JenaValve™ 25 (JV 25)

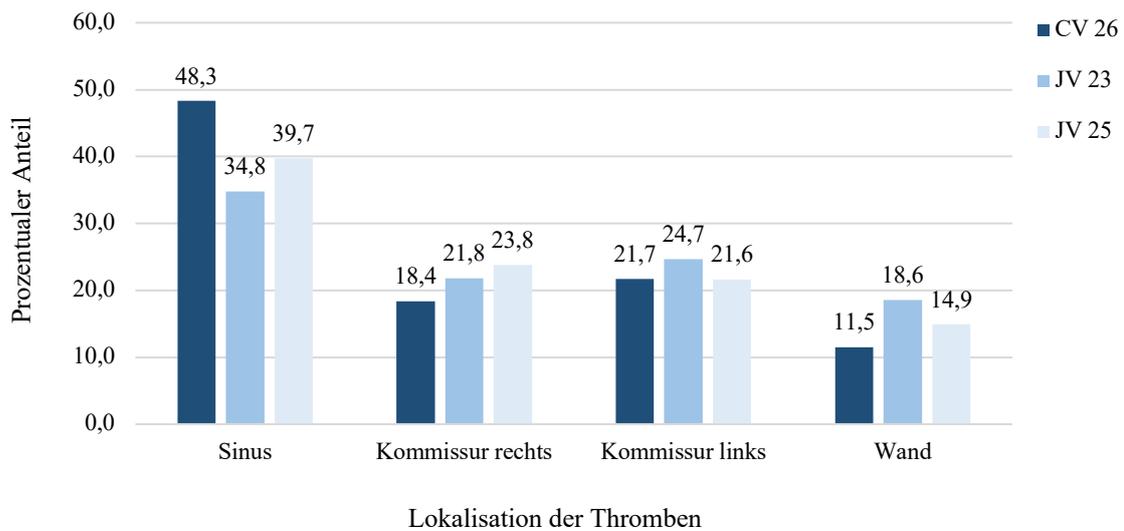


Abbildung 28: Verteilung der Milchthromben an den drei untersuchten selbstexpandierenden Klappenprothesen (CV 26: CoreValve™ 26; JV 23: JenaValve™ 23; JV 25: JenaValve™ 25).
Grafik: I. Scheidler

Nachfolgend sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung hinsichtlich möglicher Unterschiede der mittleren Anzahl der Thromben in Bezug auf den Klappentyp dargestellt.

Gerinnsellokalisierung	CV 26 - JV 23	CV 26 - JV 25	JV 23 - JV 25
Sinus	.000	1	.001
Rechte Kommissur	.000	.125	.086
Linke Kommissur	.006	.761	.126
Wand	.001	.009	1

Tabelle 6: Vergleich der Aortenklappenprothesen hinsichtlich signifikanter Unterschiede der mittleren Thrombenverteilung in den untersuchten Klappenarealen, angegeben ist der p-Wert, wobei ein Wert $\leq 0,5$ als signifikant und ein Wert $\leq 0,01$ als hochsignifikant gilt (CV 26: CoreValve™ 26; JV 23: JenaValve™ 23; JV 25: JenaValve™ 25)

Im statistischen Vergleich sind hochsignifikante Unterschiede zwischen der CoreValve™ 26 und der JenaValve™ 23 in allen kategorisierten Untersuchungsbereichen zum Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ nachweisbar. Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei

der absoluten Anzahl der Milchthromben im Bereich des Sinus ($p < 0.000$), der rechten Kommissur ($p < 0.000$), der linken Kommissur ($p = 0.006$) und der Wand ($p = 0.001$) (Tabelle 6). Wie in Tabelle 4 zu sehen ist, hafteten an der CoreValve™ 26 im Vergleich zu der JenaValve™ 23 mehr Milchthromben in diesen Arealen. Weiterhin zeigt sich, wie in Tabelle 6 dargestellt ist, ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der JenaValve™ 25 und der CoreValve™ 26 bezüglich der Anzahl der Thromben im Untersuchungsbereich der Wand ($p = 0.009$). Die fotografischen Aufnahmen zeigten in diesem Areal mehr Thromben in der Klappenprothese vom Typ JenaValve™ 25 im Vergleich zur CoreValve™ 26 (Tabelle 4).

Die Auswertung der Anzahl der Milchthromben bei der JenaValve™ 23 und der JenaValve™ 25 ergab einen hochsignifikanten Unterschied im untersuchten Areal des Sinus ($p = 0.001$) (Tabelle 6). Bei der JenaValve™ vom größeren Klappentyp ließen sich dabei mehr Thromben im kategorisierten Bereich des Sinus identifizieren als bei der JenaValve™ mit der kleineren Anulusgröße (Tabelle 4).

Nachfolgend sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung hinsichtlich der mittleren Anzahl der Thromben in Bezug auf die Lokalisation dargestellt.

Klappe	W - RC	W - LC	W - S	RC - LC	RC - S	LC - S
JV 23	1	.470	.000	1	.004	.049
JV 25	.057	.006	.000	1	.006	.062
CV 26	.050	.019	.000	1	.002	.003

Tabelle 7: Vergleich der Lokalisation der Milchthromben in den untersuchten Klappen , angegeben ist der p-Wert, wobei ein Wert ≤ 0.5 als signifikant und ein Wert $\leq 0,01$ als hochsignifikant gilt (S: Sinus; RC: Rechte Kommissur; LC: linke Kommissur; W: Wand. JV 23: JenaValve™ 23; JV 25: JenaValve™ 25; CV 26: CoreValve™ 26)

Die statistische Auswertung ergab hochsignifikante Unterschiede beim Vergleich der Thrombenanzahl im Sinus und an der Wand in allen drei untersuchten Klappentypen (JV 23: $p < 0.000$; JV 25: $p < 0.000$; CV 26: $p < 0.000$), (Tabelle 7). Dabei kam es zu einer

vermehrten Ablagerung von Thromben im Untersuchungsareal des Sinus im Vergleich zur Wand (Tabelle 4).

Auch ließ sich in allen drei Klappen nachweisen, dass sich hochsignifikant mehr Thromben im Areal des Sinus als in der rechten Kommissur befinden (JV 23: $p=0.004$; JV 25: $p=0.006$; CV 26: $p=0.002$), (Tabelle 4, Tabelle 7).

JenaValve™ 23 und CoreValve™ 26 präsentierten ebenfalls signifikant bzw. hochsignifikant mehr Milchthromben im Bereich des Sinus als in der linken Kommissur (JV 23: $p=0.049$; CV 26: $p=0.003$), bei der JenaValve™ 25 waren ebenfalls tendenziell mehr Thromben im Bereich des Sinus zu beobachten ($p=0.062$).

In Bezug auf Ablagerungen von Thromben im Klappenareal der Wand ließ sich feststellen, dass es in der JenaValve™ 25 und der CoreValve™ 26 zu einer hochsignifikant bzw. signifikant größeren Anzahl von Milchgerinnseln in der linken Kommissur kam als an der Wand (JV 25: $p=0.006$; CV 26: $p=0.019$), (Tabelle 4, Tabelle 7).

Auch zeigte sich, dass sich bei der JenaValve™ 25 und der CoreValve™ 26 tendenziell signifikant mehr Gerinnsel in der rechten Kommissur als an der Wand anlagern (CV 26: $p=0.050$; JV 25: $p=0.057$), (Tabelle 4, Tabelle 7).

Im Vergleich der rechten mit der linken Kommissur konnten bei allen Klappentypen keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden (Tabelle 7).

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Unterschiede bei den Klappentypen

Vor einer Implantation einer Transkatherklappe ist eine patientenindividuelle präzise Messung der anatomischen Strukturen nötig, um den passenden Klappentyp und die optimale Größe der Klappenprothese zu wählen. Dies wird in den meisten Kliniken durch die Nutzung einer Auswertungssoftware nach Durchführung einer EKG-getriggerten Computertomographie bewerkstelligt. Bis heute sind nicht alle Probleme der TAVI gelöst und es besteht, neben der möglichen Notwendigkeit einer Schrittmacherimplantation auch die Gefahr eines Schlaganfalles. Auch die Art der Antikoagulation ist nicht zufriedenstellend geklärt. Die Wahl einer zu großen Prothese kann unter anderem zu einer unvollständigen Entfaltung der Klappenprothese oder zu einer Annulusruptur führen. Die Wahl einer zu kleinen Prothese kann beispielsweise zu einer Migration der Klappenprothese, einer schlechten Hämodynamik und paravalvulären Leckagen führen (9). Tendenziell findet sich im klinischen Alltag je nach Verkalkungsmuster des Aortenklappenringes eher eine Überdimensionierung der Klappengröße um die Radialkraft des Stentgerüsts optimal zu nutzen (97).

Wie die Ergebnisse der durchgeführten Experimente belegen, kommt es zu statistisch hoch signifikanten Unterschieden beim Vergleich der CoreValve™ 26 mit der JenaValve™ 23. In allen Untersuchungsbereichen der CoreValve™ 26 ließ sich eine intensivere Thrombenbildung feststellen. Einerseits scheint eine große Rahmenhöhe des Stents mit dichtem Stentgitter und andererseits die tief einlaufenden Taschen der CoreValve™ für diese vermehrte Thrombenbildung verantwortlich zu sein. Auffällig ist die überschießende Thrombogenität im Bereich des Stentgitters bei der CoreValve™ (Abbildung 27). So ist zu vermuten, dass sich auch frisch gebildete Milchthromben aus dem Stentgitter lösen und sich im Sinus anlagern. Hingegen könnte auch der Aufbau der Klappensegel bei den Transkatheterklappenprothesen Ursache für das erhöhte Auftreten der Thrombenbildung sein. Eine gesunde menschliche Aortenklappe zeigt keine erhöhte Thrombogenität. Die glatte Oberfläche des Endokards, welche als Duplikatur die Taschenklappen bildet, gewährleistet unter physiologischen Bedingungen einen optimalen und gleichmäßigen Blutfluss und verhindert das Anheften von Blutbestandteilen und Blutthromben. Dieser Prozess wird zum Beispiel gestört sobald Unebenheiten im Endokard, wie z.B. im Rahmen einer Endokarditis, entstehen (98).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass sich an der JenaValve™ 25 im Vergleich zu der CoreValve™ 26 hochsignifikant mehr Thromben im Untersuchungsbereich der Wand anlagern. Bei der fotografischen Auswertung der Thrombenanzahl an der Wand der JenaValve™ 25 ließ sich feststellen, dass hier vermehrt kleine Thromben aufgelagert waren. Im Vergleich dazu präsentierte die CoreValve™ größere flächige Thromben. Die CoreValve™ wird aus einem röntgendichten Nitinol-Stent gebildet, welcher die drei Klappensegel, bestehend aus einer Lage Perikardgewebe vom Schwein, aufspannt. Die drei Segel sind von innen an das Stentgitter genäht. Die Prothese wird mit Alpha-Amino-Ölsäure, welche aus natürlich vorkommenden langkettigen Fettsäuren gewonnen wird, antimineralisierend vorbehandelt (29). Die Rahmenhöhe beläuft sich bei einer CoreValve™ der Größe 23 auf eine Höhe von 45 mm und bei einer Größe von 26 auf eine Höhe von 55 mm (99). Auch die JenaValve™ zeichnet sich durch einen selbstexpandierenden Nitinol-Stent aus, der als Grundgerüst für drei Schweineperikardklappen dient (62). Die Rahmenhöhe der JenaValve™ der Größe 23 ist mit 30 mm und die der Größe 25 mit 32 mm angegeben. Eine Vorbehandlung, wie sie bei der CoreValve™ angewandt wird, ist im Herstellungsprozesses nicht vorgesehen (66), (100). Sowohl die große Stenthöhe als auch das dichte und engmaschige Stentgitter der CoreValve™ bieten optimale Voraussetzungen für die Bildung flächiger und großvolumiger Thromben. Demgegenüber tritt bei der JenaValve™ mit einem kronenförmigen Stent und einer niedrigeren Rahmenhöhe ohne dichtes Stentgittergeflecht die Bildung vieler kleiner Thromben auf. Besonders eindrucksvoll war dies im Vergleich der CoreValve™ der Größe 26 mit der JenaValve™ der Größe 23. Es könnte daher einen Zusammenhang zwischen Stenthöhe bzw. der Form des Stentgitters und der Anzahl bzw. der Formation von Thromben geben.

Weiterhin ließ sich ein hoch signifikanter Unterschied beim Vergleich der beiden Klappen vom Typ der JenaValve™ feststellen. Im Sinus der JenaValve™ vom größeren Klappentyp 25 hafteten mehr Thromben. Die Klappenprothese Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease der Größe 23 besitzt einen Anulusdurchmesser von 21 mm (69). Für eine Implantation einer JenaValve™ in eine Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease wird offiziell eine JenaValve™ der Größe 23 für einen Anulusdurchmesser von 21 - 22,9 mm empfohlen. Eine JenaValve™ der Größe 25 wird für einen Anulusdurchmesser von 23 - 24,9 mm empfohlen (66). Es könnte daher bei der JenaValve™ des größeren Klappentyps nicht zu einer optimalen Entfaltung der Klappenprothese gekommen sein. Dies

könnte ein ungünstiges Flussmuster mit einer geringeren Auswaschung der Klappensinus erzeugt haben, welches eine erhöhte Thrombogenität im Sinus der Klappenprothesen der Größe 25 erklären könnte.

Die geplante Versuchsreihe mit der CoreValve 23 konnte aufgrund einer übermäßigen Thrombosierung nicht durchgeführt werden. Selbst nach Wechsel des Versuchsmaterials konnten immer noch keine adäquaten Druck- und Volumenverhältnisse aufgebaut werden. Für die Implantation einer CoreValve™ in eine Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease der Größe 23 wird eine CoreValve™ der Größe 26 empfohlen. Sie eignet sich für eine Annulusgrößen von 20 - 23 mm. Die CoreValve™ der Größe 23 ist für eine Annulusgröße von 18 - 20 mm vorgesehen (29). Wahrscheinlich war die CoreValve™ 23 in diesem Modell nicht adäquat und ausreichend abdichtend verankerbar, während dies im klinischen Alltag bei bestimmten Verkalkungsmustern auch in dieser Konstellation durchaus möglich ist.

Wie in vorangegangenen Versuchen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, ließen sich in der Carpentier-Edward Perimount Magna Ease keine Anlagerung von Thromben feststellen (101), (102). Somit ist anzunehmen, dass der Aufbau der Transkatheterklappen, d.h. die Anordnung der Segel und die Stentformationen, als Quelle der Thromben angesehen werden kann und die Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease als nicht thrombogen einzuordnen ist.

4.2 Diskussion der Unterschiede in den Untersuchungsbereichen

Wie die Ergebnisse der vorgestellten Studie zeigen, kommt es in allen untersuchten Klappentypen zu einer signifikant vermehrten Ablagerung von Milchthromben im Untersuchungsbereich des Sinus im Vergleich zur Wand. Ähnliche Ergebnisse ließen sich beim Vergleich der Untersuchungsbereiche des Sinus und der rechten bzw. linken Kommissur feststellen. Der Sinus bildet in beiden Klappentypen die anatomisch tiefste Untersuchungsfläche und birgt somit sehr wahrscheinlich durch einen geringeren Auswascheffekt die größte Gefahr der Auflagerung von Thromben.

Es ließ sich außerdem feststellen, dass es sowohl in der CoreValve™ 26 als auch in der JenaValve™ 25 zu signifikant verstärkter Thrombenbildung in der linken Kommissur im Vergleich zur Wand kommt. Die CoreValve™ 26 präsentierte dieses Ergebnis mit einer grenzwertigen Signifikanz von $p=0.50$ auch beim Vergleich der rechten Kommissur mit der Wand. Möglicherweise führt der Aufbau der Prothesen im Bereich der engen Kommissuren

zu Verwirbelungen. Dies bildet eventuell eine Grundlage für das Anheften der kleinen Milchthromben. Es lässt sich schlussfolgern, dass der Aufbau der Transkatheterklappenprothesen die Anheftung von Thromben verursachen könnte.

Die Formation der thrombusähnlichen Milchgerinnsel in den untersuchten selbstexpandierten Bioprothesen stimmt mit den von uns zuvor beobachteten Blutthromben in explantierten Prothesen überein (Abbildung 29).



Abbildung 29: Vergleich von Blutthromben (*) an einer explantierten CoreValve™ (links) und Milchthromben () an einer untersuchten CoreValve™ (rechts).** (Foto links: PD Dr. med. habil. D. Richardt und mit freundlicher Genehmigung der Patientin; Foto rechts: I. Scheidler)

Die Anwendung biologischer, selbstexpandierender Transkatheterklappenprothesen findet weltweit in wachsendem Ausmaß statt und hat sich zu einer Standardprozedur bei der Behandlung von Aortenklappenstenosen entwickelt. Thrombotische Ablagerungen an den Transkatheter-Aortenprothese sind keine Seltenheit und gehen bei der Mehrheit der Patient:innen ohne Symptome einher. Weniger als 1 % der Patient:innen mit diesen Klappenveränderungen zeigen Symptome (52). Die thrombotischen Ablagerungen lassen sich als makroskopisch sichtbare Adhäsionen an explantierten Modellen beobachten (Abbildung 12, Abbildung 29). Es stellt sich die Frage, inwiefern diese Veränderungen an den Prothesen ein Risiko für das Auftreten von thrombotischen Ereignissen darstellt.

Studien zufolge treten subklinische Klappenthrombosen bei bioprothetischen Aortenklappen häufig auf, wobei dies bei den Transkatheter-Klappen im Vergleich zu den chirurgischen

Klappen häufiger zu beobachten ist. Diese subklinischen Klappenthrombosen sind mit einer erhöhten Rate an Schlaganfällen und TIAs verbunden (48).

Yanagisawa et al. haben in einer Multicenterstudie mittels einer 4-dimensionalen-Multidetektor-Computertomografie herausgefunden, dass 9,3 % der Patient:innen mit selbst- oder ballonexpandierenden Prothesen nach einer medianen Dauer von drei Tagen, postinterventionell HALT aufwiesen. Allerdings waren die Patient:innen asymptomatisch. Während der Nachbeobachtungen konnte kein Einfluss der frühen thrombotischen Ablagerungen auf den Endpunkt Tod, Schlaganfall oder einem erneuten Krankenhausaufenthalt festgestellt werden. Jedoch konnten während einer 3-jährigen Nachbeobachtungszeit alte thrombotische Ablagerungen in den Prothesen beobachtet werden (103).

Zu einem ähnlichen Ergebnis sind Vollema et al. gekommen. Nach einer 3-jährigen Nachbeobachtungszeit mittels Echokardiografie ließ sich bei 3 % der Patient:innen mit einer selbst- oder ballonexpandierenden Prothese eine abnormale Klappenhämodynamik feststellen. Anhand einer Multidetektor-Computertomografie ließ sich ein HALT nicht mit einem erhöhten Risiko für einen ischämischen Schlaganfall oder eine TIA assoziieren (104). Diese Studienergebnisse verwundern in Bezug auf die in dieser Untersuchung hervorgebrachten Ergebnisse und die postinterventionell beobachteten Thromben an explantierten Klappenprothesen. Anhand der Ergebnisse in der hier durchgeführten Studie lässt sich eine Progredienz der thrombotischen Ablagerungen, insbesondere für einen postinterventionellen Untersuchungszeitraum von mehr als drei Jahren vermuten.

Die von *Edwards Lifesciences* initiierte PARTNER 1-Studie aus dem Jahr 2015 untersuchte an insgesamt 25 Zentren in den USA, Kanada und Deutschland Patient:innen mit schwerer symptomatischer Aortenklappenstenose mit hohem Risiko für ein offen chirurgisches Vorgehen. Dabei wurden Patient:innen für eine TAVI oder einen chirurgischen Aortenklappenersatz randomisiert und nachbeobachtet. Das Risiko einen Schlaganfalls oder eine TIA fünf Jahre nach einer TAVI zu erleiden, beläuft sich in dieser Studie auf 15,9 % (35).

Im Rahmen der PARTNER 2-Studie wurden 2016 Patient:innen aus 57 Zentren mit einer schweren Aortenklappenstenose und einem mittleren Operationsrisiko auf den Endpunkt Tod oder schwerer Schlaganfall untersucht. Innerhalb dieser Studie stand erneut der Vergleich der TAVI mittels Implantation einer ballonexpandierenden Sapien XT mit dem

chirurgischen Aortenklappenersatz im Fokus. Die Rate schwerer Schlaganfälle zwei Jahre nach TAVI-Prozedur belief sich auf 6,8 % (44).

Die Ergebnisse der PARTNER 3-Studie, welche 2019 veröffentlicht wurden, beinhalten eine Untersuchung von Patient:innen mit schwerer Aortenklappenstenose mit einem niedrigeren Operationsrisiko. Dabei wurden erneut der klassische chirurgische Aortenklappenersatz mit der TAVI mittels ballonexpandierenden Sapien 3-Prothesen verglichen. Der primäre Endpunkt dieser Studie ist als eine Kombination aus Tod, Schlaganfall oder Rehospitalisierung nach einem Jahr definiert. Nach einem Jahr waren 1,2 % der Patient:innen mit einer Transkatheterklappe von einem Schlaganfall betroffen (45).

Auch eine von der *Medtronic GmbH* im Jahr 2019 durchgeführte Studie an Patient:innen mit schwerer Aortenklappenstenose und einem niedrigeren Operationsrisiko befasste sich mit dem Vergleich der TAVI und dem chirurgischen Aortenklappenersatz. Die Inzidenz eines Schlaganfalls nach 24 Monaten lag nach Implantation einer CoreValve™, Evolut R™ oder Evolut PRO™ bei 5,8 % (37).

In Zusammenschau dieser Registerstudien stellt sich die Frage, wie hoch die Schlaganfallrate bei Patient:innen mit einer TAVI innerhalb eines längeren Untersuchungszeitraumes ist, wofür weitere Studien erforderlich sind. Wie in einer Fallstudie von De Marchene et al. mit explantierten Katheterklappen des Typ CoreValve™ beschrieben, konnte in der Autopsie Tage bis Monate nach der Implantation eine Thrombusbildung festgestellt werden, die sich bis zu einer Aortenklappenstenose entwickeln konnte. Die Folge dieser Klappenthrombosen spielte entweder direkt oder indirekt eine Rolle bei dem frühem Tod (105). Der Aufbau und das verwendete Material scheinen einen Einfluss auf die Bildung von thrombotischen Ablagerungen zu haben. Die in dieser Fallstudie vorgestellten Ergebnisse ähneln den Ergebnissen dieser Studie.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den Ablagerungen in den vier Untersuchungsbereichen Sinus, Wand und Kommissuren. Allerdings ließen sich auch insbesondere im Bereich des Stentgitters massenhaft miteinander verschmolzene Thromben feststellen (Abbildung 30 - Abbildung 34). Im Vergleich zu den Thromben im direkten Bereich der Klappe erscheinen diese sehr groß. Beim Lösen solcher großen Thromben im menschlichen Körper wäre das Risiko eines folgenschweren Gefäßverschlusses höher als bei kleinen Thromben. Auch scheint die Höhe der Klappen einen Einfluss auf das Ausmaß der Thrombenbildung zu haben. Die CoreValve™ 26 misst in ihrer Gesamthöhe 55 mm und begünstigt mit ihrer supraannulären Position einen ungestörten Blutfluss zu den

Koronargefäßen. Während der Versuche war das Stentgitter teilweise vollständig von einem Thrombenfilm überzogen, sodass es denkbar wäre, dass zu den Koronararterien kein ausreichender Blutfluss stattgefunden hätte (Abbildung 30 - Abbildung 34). Sowohl die im Vergleich zu anderen Transkatheterklappenprothesen größere Höhe als auch das relativ enge Stentgitter der CoreValve™ scheinen optimale Bedingungen für das Ansetzen von Thromben zu schaffen und es zeigte sich eine höhere Thrombosierung im Vergleich zu der JenaValve™. Die JenaValve™ 23 besitzt eine Stenthöhe von 30 mm und die JenaValve™ 25 eine Stenthöhe von 32 mm (66). Die Anheftung von Thromben zeichnet sich vor allem durch längliche miteinander verschmolzene Thromben aus, welche im Vergleich zu der CoreValve™ in geringerem Ausmaß auftraten (Abbildung 35 - Abbildung 44). Aufgrund einer geringeren Höhe scheint die JenaValve™ eine kleine Anlagefläche für Thromben zu bieten.

Es wurden unter anderem aus der hiesigen Klinik Fälle bei Patient:innen beschrieben, bei denen die CoreValve™ wieder entnommen werden musste. Diese intraoperativen Befunde wiesen thrombotisches Material am Stent, eine frühe strukturelle Degeneration der Aortenklappenprothese und eine Störung der Klappenbewegung auf (51). Das Auftreten von Thromben in Transkatheterklappen wirft seit vielen Jahren die mögliche Indikation einer längeren oder anders gestalteten Antikoagulation auf. Nach der aktuellen Leitlinie der ESC von 2017 sollte bei Patient:innen in den ersten drei bis sechs Monaten nach TAVI eine duale Thrombozytenaggregationshemmung in Betracht gezogen werden, gefolgt von einer lebenslangen einfachen Thrombozytenaggregationshemmung, sofern sie aus anderen Gründen keine Antikoagulation benötigen. Sollte eine Indikationen für eine Antikoagulation aufgrund einer bereits bestehenden Erkrankung bei Patient:innen vorliegen, wird eine lebenslange orale Antikoagulation empfohlen (2). Aktuell wird nach dem Eingriff bei einem niedrigen Blutungsrisiko für drei bis sechs Monate eine duale Plättchenhemmung mit 100 mg ASS und 75 mg Clopidogrel, einem Thienopyridin, empfohlen. Bei einem hohen Blutungsrisiko kann eine Monotherapie erwogen werden. Sollten Patient:innen an einer Klappenthrombose leiden, wird die orale Antikoagulation mit einem NOAK oder einem Vitamin-K-Antagonisten empfohlen (47).

Es stellt sich, unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse, die Frage, ob eine antikoagulierende Therapie über den von der ESC empfohlenen Zeitraum von drei bis sechs Monaten hinaus angeraten werden sollte, um das Risiko des Ablösens potenzieller Thromben an der Prothese und des Verschlusses wie z. B. eines arteriellen zerebralen

Stromgebietes zu minimieren. Bei der großen Anzahl an Thromben an Transkatheterklappen könnte eine Antikoagulation mit einem Vitamin K-Antagonisten eine vorteilhafte Auswirkung auf die Thrombenbildung haben. Wie bereits in Studien untersucht, ist eine Antikoagulation nach einem Eingriff wie der Transkatheter-Implantation von Vorteil. Es zeigte sich, dass eine Antikoagulation, sowohl mit NOAK als auch mit Warfarin, jedoch keine duale Thrombozytenaggregationshemmung, bei der Vorbeugung oder Behandlung von subklinischen Klappenthrombosen wirksam war (48).

Der Vorteil einer Antikoagulation mit einem Vitamin K-Antagonisten ließ sich auch in einer anderen Studie aufzeigen. Makkar et al. konnten mittels vier-dimensionaler-Computertomografie nachweisen, dass Patient:innen mit Bioprothesen sowohl vom chirurgischen als auch vom Transkatheter-Typ eine verringerte Bewegung der Klappensegel zeigten, welches sich mittels therapeutischer Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten neutralisieren ließ (52). Eine weitere Arbeitsgruppe um Dangas kam zu dem Ergebnis, dass die intravenöse Gabe von Heparin gegenüber dem NOAK Bivalirudin während einer TAVI in Bezug auf das Blutungsrisiko nach 48 Stunden und dem klinischen Nutzen nach 30 Tagen keinerlei signifikante Unterschiede zeigte. Im klinischen Alltag wird während der Prozedur eine ACT-gesteuerte intravenöse Gabe von Heparin - vor allem wegen des Einbringens von Schleusen, Drähten, Implantationsbesteck und thrombogenen Materialien - praktiziert. Bivalirudin stellt laut dieser Studie ein alternatives Antikoagulanz dar, falls eine Unverträglichkeit gegenüber Heparin besteht (106).

In den 5-Jahres-Daten der Choice-Studie konnte nach transfemoraler TAVI durch selbstexpandierende bzw. ballonexpandierende Prothesen kein signifikanter Unterschied gesehen werden (107). Die in dieser Promotionsarbeit erbrachten Ergebnisse ließen sich auch in ähnlicher Weise in ballonexpandierenden Transkatheterklappenprothesen feststellen. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe, welche den gleichen in-vitro-Versuchsaufbau wie diese Studie beinhaltete, konnten auch an ballonexpandierenden Transkatheterklappenprothesen (Sapien-XT und S3 Prothese) thrombusähnliche Formationen gesehen werden. Dabei ließen sich Auflagerungen zu 54 % im Sinus, 28 % an der Wand und zu 13 % an der rechten und zu 10 % an der linken Kommissur nachweisen (50). Im Vergleich dazu zeigen die Ergebnisse der Experimente mit der CoreValve™ und der JenaValve™, dass der größte Anteil der thrombusähnlichen Ablagerungen mit 41,9 % auch im Sinus zu verzeichnen war. Im Unterschied zu der Studie an ballonexpandierenden Transkatheterklappenprothesen konnte allerdings eine größere

Anzahl an Formationen an den Kommissuren mit 22,3 % an der rechten und 21,4 % an der linken nachgewiesen werden. Das Untersuchungsareal der Wand war bei den selbstexpandierenden Transkatheterklappenprothesen im Vergleich zu den ballonexpandierenden Transkatheterklappenprothesen mit 14 % weitaus weniger betroffen (Tabelle 5). Die thrombusähnlichen Formationen in der Sapien S3 ähnelten einem flächigen Film, während die Sapien XT eher krümelige Strukturen aufwies. Diese Beobachtungen wurden bereits an explantierten Prothesen beobachtet (50). Eine ähnliche Formation konnte auch in dieser Untersuchung beobachtet werden. Das Ergebnis dieser Studie ergab eine eher flächige Ablagerung in der JenaValve™ mit kleinen aufgelagerten Milchthromben. Die thrombusähnlichen Auflagerungen an der CoreValve™ wiesen die Struktur von groben und klumpigen Krümeln auf (Abbildung 30 - Abbildung 44).

Eine weitere Ursache für die Entstehung von Thromben an Transkatheterklappenprothesen ist das veränderte Flussmuster. Bereits die *Virchow-Trias* beschreibt drei pathophysiologische Grundlagen, die zur Entstehung einer Thrombose führen: Veränderung des Gefäßendothels, Veränderung der Blutströmungsgeschwindigkeit und die Veränderung der Zusammensetzung des Blutes (108). Mit der Implantation einer Klappenprothese verändert sich das hämodynamische Flussmuster in der Aortenwurzel und kann somit ein Risiko für die Entstehung von Thromben darstellen (105), (52). So ließ sich auch in einer Studie unserer Arbeitsgruppe feststellen, dass das veränderte Flussmuster einen Effekt auf die Entstehung von Thromben in ballonexpandierenden Transkatheterklappenprothesen hat (50).

Trotz meist guter klinischer Ergebnisse nach einer TAVI mit Transkatheterklappenprothesen könnte eine Prävention und Behandlung der Klappenthrombosen dringend zu empfehlen sein, da bekannt ist, dass SLT bzw. HALT mit einer erhöhten Rate von TIA oder Schlaganfällen assoziiert ist. Der wissenschaftlichen Datenlage folgend ist eine Antikoagulation mit einem Vitamin K-Antagonisten bei der Vorbeugung als auch bei der Behandlung von SLT bzw. HALT wirksam (48), (52). In der randomisierten GALILEO-Studie wurde der Faktor-Xa-Inhibitor Rivaroxaban (täglich 10 mg) mit einer Plättchenhemmung durch ASS (täglich 75 mg bis 100 mg) bei 1.644 TAVI-Patienten verglichen, wobei es in der Rivaroxaban-Gruppe zu signifikant mehr thromboembolischen Komplikationen, Blutungen und einer höheren Gesamtsterblichkeit als in der ASS-Gruppe kam. Dabei wurde in der Substudie GALILEO-4D bei 231 Patienten etwa 90 Tage nach der Randomisierung die Beweglichkeit der Klappensegel sowie deren Verdickung mit einer

vier-dimensionalen Computertomografie evaluiert. Es zeigte sich eine signifikant höhere Reduktion der Beweglichkeit bei der ASS-Gruppe (2,1 % der Patient:innen unter Rivaroxaban, 19,9 % der Patient:innen unter ASS). Zu einer Verdickung von mindestens einem Segel kam es bei 12,4 % in der Rivaroxaban-Gruppe und bei 32,4 % der Patient:innen in der ASS-Gruppe beobachtet. Da jedoch die Einnahme von Rivaroxaban in der GALILEO-Studie mit einem signifikant schlechteren klinischen Outcome vergesellschaftet war, kann derzeit weder die routinemäßige Bildgebung mit vier-dimensionaler Computertomografie zur Detektion von SLT bzw. HALT noch die Gabe von Rivaroxaban nach TAVI empfohlen werden (109), (110).

Es sollten weitere Studien durchgeführt werden, um die Leitlinien für eine antikoagulative Therapie nach einer TAVI anzupassen, langfristig dem Auftreten von thrombotischen Auflagerungen an den Prothesen entgegenzuwirken und das Risiko des Ablösens eines dieser Thromben mit den entsprechenden Konsequenzen für Patient:innen zu verhindern.

4.3 Limitationen

Die hier verwendete, etablierte und international anerkannte Methodik zur Untersuchung der Thrombogenität von Klappenprothesen imitiert die physiologischen, menschlichen Bedingungen im Herzen, wie etwa die Fluss-, Druck- und Volumenverhältnisse und die Temperatur. Es handelt sich jedoch um eine in-vitro Untersuchung, die in ihrer Aussagekraft limitiert ist und sich nur in einem gewissen Maße auf ein in-vivo-Modell übertragen lässt, da die physikalischen Parameter im Vergleich zu einer Blutzirkulation in-vivo abweichen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Blut- und Milchgerinnung durch die entstandenen Scherkräfte an den untersuchten Transkatheterklappenprothesen unterschiedlich beeinflusst werden.

Mit dem Einsatz der selbstexpandierenden Klappenprothesen in eine Carpentier-Edwards Perimount Magna Ease Bioprothese wurde versucht, die Fixierung in eine menschliche Aortenklappe zu imitieren. Dieser Prozess findet auch als *Valve-in-Valve-Prozedur* im klinischen Alltag bei Patient:innen mit erhöhtem Risiko für eine erneute offene Herzoperation mit pathologisch veränderter Bioprothesen praktische Anwendung (111). So konnten die Transkatheterklappen sicher für den Versuchsdurchlauf verankert werden. Allerdings ist diese Verankerung in einer biologischen Aortenklappenprothese gleichbedeutend mit dem Verlust einer Verankerung in einen (je nach Verkalkungsmuster

zumindest noch teilweise) elastischen Anulus der patienteneigenen Aortenwurzel. Andererseits liegen die Stents eng an der Aortenklappenprothese an und minimieren durch diese Abdichtung die Entstehung von Strömungsturbulenzen und einer Leckage.

Der Einsatz von Milch und einem Labenzym diene der Bildung von Thrombusformationen, die mit der des Blutes vergleichbar erscheint. Milch gilt in der Wissenschaft seit 1983 als eine optimale Alternative zu Blut im Rahmen von in-vitro Untersuchungen zur Thrombogenität von Herzklappen. Der Einsatz von Vollblut wird als ungeeignet angesehen, zum einen aufgrund einer sofortigen Gerinnung an Fremdf Flächen und einer nicht zuverlässigen Steuerbarkeit einer notwendigen Teil-Antikoagulation, zum anderen aufgrund der speziesbedingten Unterschiede der Blutbestandteile. In der Praxis ist das Arbeiten mit den benötigten Mengen an Blut und der damit verbundenen Verschmutzung nicht umsetzbar. Bei in-vitro Studien ist außerdem eine intrakorporale Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Thrombusformationen nicht möglich (56). Sowohl in unserer als auch in anderen Arbeitsgruppen wurde dieses Verfahren zur Untersuchung von u. a. mechanischen und ballonexpandierenden Aortenklappenprothesen angewandt (56), (57), (55), (50). Trotz dieser international etablierten Methodik sind die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Milchgerinnung im Vergleich zu der menschlichen Hämostase unterschiedlich. So katalysieren zwei verschiedene Enzyme im Gerinnungsprozess die Hydrolyse von Peptidbindungen. Im Rahmen der Blutgerinnung spaltet Thrombin die Peptidbindung des Fibrinogens. Demgegenüber wird dieser Prozess bei der Milchgerinnung durch das Chymosin katalysiert, welches das κ -Caseins spaltet (74).

Zur Quantifizierung der Thrombenanzahl in den Untersuchungsbereichen der Prothesen wurden die fotografisch dokumentierten Formationen visuell ausgezählt. Durch diese Auszählungsmethode sind subjektive Abweichungen der Untersuchungsergebnisse nicht auszuschließen. Um diese Limitation zu begrenzen, wurde vorab die Größe einer thrombusähnlichen Formation definiert und die Auszählung erfolgte durch zwei Personen, um die Gefahr eines systematischen Fehlers zu minimieren und die Auszählungsergebnisse zu objektivieren.

Das verwendete Wurzelmodell weist keinen Koronarostien auf, wie es in-vivo jedoch in zwei der drei Sinus aortae mit dem Abgang der linken und rechten Koronararterie gegeben ist. Die Form und Größe des Ausflusstraktes als auch die Volumenverschiebungen ähneln jedoch denen eines in-vivo-Modells und erzeugen ein angemessenes Flussmuster. Somit

gelten zumindest für einen der drei Sinus angemessene Versuchsbedingungen, die denen einer in-vivo nonkoronaren Klappentasche gleichen.

5. Zusammenfassung

Die Transkatheter-Aortenklappenimplantation ist ein stetig wachsendes Verfahren, welches vor allem bei älteren Patient:innen mit erhöhtem Operationsrisiko bei einer bestehenden Aortenklappenstenose oder Aortenklappenregurgitation zur Anwendung kommt. Allerdings bestehen immer noch Unklarheiten zur Thrombogenität der Transkatheterklappenprothesen und zu Klappenthrombosen. Eine optimale Strategie der Antikoagulation zur Vermeidung von Thromben und dem damit einhergehenden Risiko eines Schlaganfalls gibt es nicht.

In dieser experimentellen in-vitro-Studie wurde die initiale Bildung und Lokalisation von Thromben an biologischen selbstexpandierenden Aortenklappenprothesen, der CoreValve™ und JenaValve™, untersucht. Anhand eines international etablierten Versuchsmodells wurden die Klappenprothesen unter fest definierten und wissenschaftlich anerkannten Druck- und Volumenverhältnissen unter Einsatz enzymaktivierter Milch in einem Inkubator auf ihre Thrombogenität untersucht und anhand einer Schablone die gebildeten Milchthromben ausgezählt. Bei allen Klappen fanden sich hochsignifikant die meisten thrombusartigen Formationen im Sinus und es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen rechter und linker Kommissur. An der CoreValve™ ließen sich im Vergleich zu der JenaValve™ der kleineren Stentgröße in der absoluten Anzahl hochsignifikant mehr Milchgerinnsel in allen Untersuchungsbereichen nachweisen. Bei der JenaValve™ vom größeren Klappentyp ließen sich weitaus mehr Thromben im Sinus identifizieren als bei der JenaValve™ mit der kleineren Stentgröße, was mit einer suboptimalen Entfaltung der größeren Klappe erklärbar wäre.

Zudem zeigte sich ein unterschiedliches Muster der thrombusähnlichen Formationen. Die CoreValve™ präsentierte größere, flächige Thromben im Vergleich zu vielen kleinen Mikrothromben in der JenaValve™. Auffällig war außerdem eine sehr starke Thrombenbildung am Stentgerüst der CoreValve™. Dabei zeigten die untersuchten Klappenprothesen ähnliche Formationen und Lokalisationen von Thromben wie zuvor in explantierten Klappenprothesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es bei den untersuchten Prothesen einen Zusammenhang zwischen ihrem strukturellen Aufbau, der Stenthöhe, der Form des Stentgitters, dem verwendeten Material und der Anzahl bzw. Formation von Thromben sowie der thrombotischen Tendenz zu geben scheinen. Um die in dieser in-vitro-Studie gewonnenen Ergebnisse auf ein menschliches Modell zu übertragen, sind weitere Studien

erforderlich. Zudem scheinen weitere intensive Bemühungen zur Festlegung einer optimalen Antikoagulationsstrategie nach TAVI unumgänglich.

6. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt: Todesursachen nach Krankheitsarten 2019, URL: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>. (Letzter Zugriff: 15. August 2021)
2. Baumgarten H., Falk V., Bax J.J., De Bonis M., Hamm C., Holm P.J., Iung B., Lancellotti P., Lansac E., Munoz D.R., Rosenhek R., Sjögren J., Mas P.T., Vahanian A., Walther T., Wendler O., Windecker S., Zamorano J.L., 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J.* 38, 2739-2791 (2017)
3. Kuck K.-H., Bleiziffer S., Eggebrecht H., Ensminger S., Frerker C., Möllmann H., Nef H., Thiele H., Treede H., Wimmer-Greinecker G., Walther T., Konsensuspapier der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) und der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG) zur kathetergestützten Aortenklappenimplantation (TAVI) 2020. *Der Kardiol.* 14, 182-204 (2020)
4. Beckmann A., Meyer R., Lewandowski J., Markewitz A., Gummert J., German Heart Surgery Report 2020: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* (69), 294-307 (2021)
5. Gummert J.F., Funkat A., Beckmann A., Schiller W., Hekmat K., Ernst M., Beyersdorf F., Cardiac Surgery in Germany during 2009: A Report on Behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 58, 379-386 (2010)
6. Filipoiu F.M., The Aortic Valve. *Atlas of Heart Anatomy and Development.* 1. Auflage, Kapitel 6.4.5., Springer London, S. 140-149 (2014)
7. Hraška V., Photiadis J., Angeborene Anomalien des linksventrikulären Ausflusstrakts. *Herzchirurgie.* 3. Auflage, Kapitel 14, Springer-Verlag Berlin, S. 421-456 (2010)
8. Schünke M., Schulte E., Schumacher U., Organe des Kreislaufsystems und ihre Leitungsbahnen. *Prometheus Lernatlas der Anatomie: Hals Und Innere Organe.* 5. Auflage, Kapitel 3, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 96-134 (2005)
9. Schubert S.A., Ghanta R.K., Aortic Valve Anatomy: Implications for Transcatheter Aortic Replacement. *Catheter Based Valve and Aortic Surgery.* 1. Auflage, Kapitel 1, Springer Verlag New York, S. 1-10 (2016)

10. Schmid C., Aortenklappenvitien. *Leitfaden Erwachsenenherzchirurgie*. 3. Auflage, Kapitel 3.1, Springer-Verlag Berlin, S. 40-52 (2014)
11. Drake R.L., Vogl A.W., Mitchell A.W.M., Tibbitts R.M., Richardson P.E., Bräuer L., Thorax. *Gray's Atlas Der Anatomie - Deutsche Bearbeitung von Lars Bräuer*. 2. Auflage, Kapitel 3, Urban & Fischer/Elsevier München, S. 56-121 (2016)
12. Loukas M., Heart. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 41. Auflage, Kapitel 57, Elsevier, S. 994-1023 (2016)
13. Schmid C., Thorakale Aortenaneurysmen. *Leitfaden Erwachsenenherzchirurgie*. 3. Auflage, Kapitel 5.1, Springer-Verlag Berlin, S. 88-101 (2014)
14. Sievers H.H., Hemmer W., Beyersdorf F., Moritz A., Moosdorf R., Lichtenberg A., Misfeld M., Charitos E.I., The everyday used nomenclature of the aortic root components: the tower of Babel? *Eur J Cardio-Thoracic Surg*. 41, 478-582 (2012)
15. Otto C.M., Pendergast B., Aortic-Valve Stenosis - From Patients at Risk to Severe Valve Obstruction. *N Engl J Med*. 371 (8), 744-756 (2014)
16. Herold G. und Mitarbeiter, Kardiologie. *Innere Medizin 2018*. Kapitel 2, Dr. med. Gerd Herold, S. 174-179 (2018)
17. Coffey S., Cox B., Williams M.J.A., The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 63 (25), 2852-2861 (2014)
18. Makkar R.R., Fontana G.P., Jilaihawi H., Kapadia, S., Pichard, A. D., Douglas, P. S., Thourani, V. H., Babaliaros, V. C., Webb, J. G., Herrmann, H. C., Bavaria, J. E., Kodali, S., Brown, D. L., Bowers, B., Dewey, T. M., Svensson, L. G., Tuzcu, M., Moses, J. W., Williams, M. N., Siegel, R. J., Akin, J. J., Anderson, W. N., Pocock, S., Smith, C. R., Leon, M. B., Transcatheter Aortic-Valve Replacement for Inoperable Severe Aortic Stenosis. *N Engl J Med*. 366 (18), 1696-1704 (2012)
19. Taniguchi T., Morimoto T., Shiomi H., Ando K., Kanamori N., Murata K., Kitai T., Kawase Y., Izumi C., Kato T., Ishii K., Nagao K., Nakagawa Y., Toyofuku M., Saito N., Minatoya K., Kimuru T., Sudden Death in Patients With Severe Aortic Stenosis: Observations From the CURRENT AS Registry. *J Am Heart Assoc*. 7 (11), e008397 (2018)
20. Lindman B.R., Bonow R.O., Otto C.M., Current Management of Calcific Aortic Stenosis. *J Am Heart Assoc*. 113 (2), 223-327 (2013)

21. Baumgarten H., Hung J., Bermejo J., Chambers J.B., Edvardsen T., Goldstein S., Lancellotti P., LeFevre M., Miller F., Otto C.M., Recommendations on the echocardiographic assessment of aortic valve stenosis: a focused update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. *Eur Heart J.* 18 (3), 254-475 (2017)
22. Singh J.P., Evans J.C., Levy D., Larson M.G., Freed L.A., Fuller D.L., Lehman B., Benjamin E.J., Prevalence and Clinical Determinants of Mitral, Tricuspid, and Aortic Regurgitation (The Framingham Heart Study). *Am J Cardiol.* 83 (6), 897-902 (1999)
23. Kuck K.-H., Eggebrecht H., Elsässer A., Hamm C., Haude M., Ince H., Katus H., Möllmann H., Naber C.K., Schunkert H., Thiele H., Werner N., Qualitätskriterien zur Durchführung der kathetergestützten Aortenklappenimplantation (TAVI). *Der Kardiolog.* 10, 282-300 (2016)
24. Lindman B.R., Bonow R.O., Otto C.M., Aortic Valve Disease. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine.* 11. Auflage, Kapitel 68, Elsevier Philadelphia, S. 1389-1414 (2019)
25. Sievers H.-H., Misfeld M., Erworbene Vitien der Aortenklappe. *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und den herznahen Gefäßen.* 3. Auflage, Kapitel 22, Springer Verlag Berlin, S. 601-634 (2010)
26. Johnston D.R., Soltesz E.G., Vakil N., Rajeswaran J., Roselli E.E., Sabik J.F., Smedira N.G., Svensson L.G., Lytle B.W., Blackstone E.H., Long-Term Durability of Bioprosthetic Aortic Valves: Implications From 12,569 Implants. *Ann Thorac Surg.* 99 (4), 1239-1247 (2015)
27. Tsvlodub S., Pieper B., Stock S., Sievers H.-H., Richardt D., Long-Term (up to 21 Years) Follow Up after Biological and Mechanical Aortic Valve Replacement in Younger Patients. *J Heart Valve Dis.* 99 (4), 1239-1247 (2015)
28. Parikh P.B., Kodali S., Transfemoral TAVR: Balloon- Expandable Valves. *Catheter Based Valve and Aortic Surgery.* Kapitel 2, Springer New York, S. 11-32 (2016)
29. Medtronic CoreValve, *CoreValve™ Instructions for Use.* (2014)
30. Abdel-Wahab M., Mehilli J., Frerker C., Neumann F.-J., Kurz T., Tölg R., Zachow D., Guerra E., Massberg S., Schäfer U., El-Mawardy M., Richardt G., Comparison of Balloon-Expandable vs Self-expandable Valves in Patients Undergoing Transcatheter Aortic Valve Replacement - The CHOICE Randomized Clinical Trial. *J Am Med Assoc.* 311 (15), 1503-1514 (2014)

31. Toutouzas K., Benetos G., Voudris V., Drakopoulou M., Stathogiannis K., Latsios G., Synetos A., Antonopoulos A., Kosmas E., Iakovou I., Katsimagklis G., Mastrokostopoulos A., Moraitis S., Zeniou V., Daneberg H., Vavuranakis M., Toussoulis D., Pre-Dilatation Versus No Pre-Dilatation for Implantation of a Self-Expanding Valve in All Comers Undergoing TAVR. *JACC Cardiovasc Interv.* 12 (8), 767-777 (2019)
32. Jilaihawi H., Kashif M., Fontana G., Furugen A., Shiota T., Friede G., Makhija R., Doctor N., Leon M.B., Makkar R.R., Cross-Sectional Computed Tomographic Assessment Improves Accuracy of Aortic Annular Sizing for Transcatheter Aortic Valve Replacement and Reduces the Incidence of Paravalvular Aortic Regurgitation. *J Am Coll Cardiol.* 59 (14), 1275-1286 (2012)
33. Alfirevic A., Mehta A.R., Svensson L.G., Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Anesthesiol Clin.* 31 (2), 355-381 (2013)
34. Okitsu K., Iritakenishi T., Imada T., Iwasaki M., Shibata S.C., Fujino Y., A longer total duration of rapid ventricular pacing does not increase the risk of postprocedural myocardial injury in patients who undergo transcatheter aortic valve implantation. *Heart Vessel.* 32 (9), 1117-1122 (2017)
35. Mack M.J., Leon M.B., Smith C.R. Miller, D. C., Moses, J. W., Tuzcu, E. M., Webb, J. G., Douglas, P. S., Anderson, W. N., Blackstone, E. H., Kodali, S. K., Makkar, R. R., Fontana, G. P., Kapadia, S., Bavaria, J., Hahn, R. T., Thourani, V. H., Babaliaros, V., Pichard, A., Herrmann, H. C., Brown, D. L., Williams, M., Akin, J., Davidson, M. J., Svensson, L. G., 5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial. *Lancet.* 385 (9986), 2477-2484 (2015)
36. Smith C.R., Leon M.B., Mack M.J. Miller, D. C., Moses, J. W., Svensson, L. G., Tuzcu, E. M., Webb, J. G., Fontana, G. P., Makkar, R. R., Williams, M., Dewey, T., Kapadia, S., Babaliaros, V., Thourani, V. H., Corso, P., Pichard, A. D., Bavaria, J. E., Herrmann, H. C., Akin, J. J., Anderson, W. N., Wang, D., Pocock, S. J., Transcatheter versus Surgical Aortic-Valve Replacement in High-Risk Patients. *N Engl J Med.* 364 (23), 2187-2198 (2011)
37. Popma J.J., Deeb G.M., Yakubov S.J. Mumtaz, M., Geda, H., O'Hair, D., Bajwa, T., Heiser, J. C., Merhi, W., Kleiman, N. S., Askew, J., Sorajja, P., Rovin, J., Chetcuti, S. J., Adams, D. H., Teirstein, P. S., Zorn, G. L., Forrest, J. K., Tchétché, D., Resar,

- J., Walton, A., Piazza, N., Ramlawi, B., Robinson, N., Petrossian, G., Gleason, T. G., Oh, J. K., Boulware, M. J., Qiao, H., Mugglin, A. S., Reardon, M. J., Transcatheter Aortic-Valve Replacement with a Self-Expanding Valve in Low-Risk Patients. *N Engl J Med.* 380 (18), 1706-1715 (2019)
38. Medtronic GmbH, Medtronic Evolut TAVR System Receives Expanded Indication to Treat Symptomatic Severe Aortic Stenosis Patients at Low Risk for Surgical Mortality. *GlobeNewswire* (16. August 2019)
39. Cribier A., Eltchaninoff H., Bash A., Borenstein N., Tron C., Bauer F., Derumeaux G., Anselme F., Laborde F., Leon M.B., Percutaneous Transcatheter Implantation of an Aortic Valve Prosthesis for Calcific Aortic Stenosis: First Human Case Description. *Circulation.* 106 (24), 3006-3308 (2002)
40. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V., *Presstext DGK 04/2018 - Neuer Kommentar: Deutsche Kardiologen und Herzchirurgen wollen gemeinsam die Herzklappen-Therapie optimieren.*
41. Webb J.G., Chandavimol M., Thompson C.R., Ricci D.R., Carere R.G., Munt B.I., Buller C.E., Pasupati S., Lichtenstein S., Percutaneous Aortic Valve Implantation Retrograde From the Femoral Artery. *Circulation.* 113 (6), 842-850 (2006)
42. Lichtenstein S. V., Cheung A., Ye J., Thompson C.R., Carere R.G., Pasupati S., Webb J.G., Transapical Transcatheter Aortic Valve Implantation in Humans - Initial Clinical Experiences. *Circulation.* 114 (6), 591-596 (2006)
43. Van der Boon R.M.A., Marcheix B., Tchetché D., Chieffo A., Van Mieghem N.M., Dumonteil N., Vahdat O., Maisone F., Serruys P.W., Kappetein A.P., Fajadet J., Colombo A., Carrié D., Van Domburg R.T., De Jaegere P.P.T., Transapical Versus Transfemoral Aortic Valve Implantation: A Multicenter Collaborative Study. *Ann Thorac Surg.* 97 (1), 22-28 (2014)
44. Leon M.B., Smith C.R., Mack M.J. Makkar, R. R., Svensson, L. G., Kodali, S. K., Thourani, V. H., Tuzcu, M., Miller, D. C., Herrmann, H. C., Doshi, D., Cohen, D. J., Pichard, A. D., Kapadia, S., Dewey, T., Babaliaros, V., Szeto, W. Y., Williams, M. R., Kereiakes, D., Zajarias, A., Greason, K. L., Whisenant, B. K., Hodson, R. W., Moses, J. W., Trento, A., Brown, D. L., Fearon, W. F., Pibarot, P., Hahn, R. T., Jaber, W. A., Anderson, W. N., Alu, M. C., Webb, J. G., Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients. *N Engl J Med.* 374 (17), 1609-1620 (2016)

45. Mack M.J., Leon M.B., Thourani V.H. Makkar, R., Kodali, S. K., Russo, M., Kapadia, S. R., Malaisrie, S. C., Cohen, D. J., Pibarot, P., Leipsic, J., Hahn, R. T., Blanke, P., Williams, M. R., McCabe, J. M., Brown, D. L., Babaliaros, V., Goldman, S., Szeto, W. Y., Genereux, P., Pershad, A., Pocock, S. J., Alu, M. C., Webb, J. G., Smith, C. R., Transcatheter Aortic-Valve Replacement with a Balloon-Expandable Valve in Low-Risk Patients. *N Engl J Med.* 380 (18), 1695-1705 (2019)
46. Grube E., Laborde J., Gerckens U., Felderhoff T., Sauren B., Buellesfeld L., Mueller R., Menichelli M., Schmidt T., Zickmann B., Iversen S., Stone G.W., Percutaneous Implantation of the CoreValve Self-Expanding Valve Prosthesis in High-Risk Patients With Aortic Valve Disease. The Siegburg First-in-Man Study. *Circulation.* 114 (15), 1616-1624 (2006)
47. Bocksch W., Steeg M., Kiliass A., Antithrombotische Therapie während und nach Transkatheter-Aortenklappenersatz (TAVI) - Entscheidung über das optimale Verfahren für den Patienten. *Klinikerzt.* 48 (03), 96-101 (2019)
48. Chakravarty T., Søndergaard L., Friedman J. De Backer, O., Berman, D., Kofoed, K. F., Jilaihawi, H., Shiota, T., Abramowitz, Y., Jørgensen, T. H., Rami, T., Israr, S., Fontana, G., De Knecht, M., Fuchs, A., Lyden, P., Trento, A., Bhatt, D. L., Leon, M. B., Makkar, R. R., Subclinical leaflet thrombosis in surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves: an observational study. *Lancet.* 389 (10087), 2383-2392 (2017)
49. Vavuranakis M., Siasos G., Zografos T., Oikonomou E., Vrachatis D., Kalogeras K., Papaioannou T., Kolokathis M.-A., Moldovan C., Tousoulis D., Dual or Single Antiplatelet Therapy After Transcatheter Aortic Valve Implantation? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Pharm Des.* 22 (29), 4596-4603 (2016)
50. Richardt D., Haban-Rackebbrandt S.L., Stock S., Scharfschwerdt M., Sievers H.-H., A matter of thrombosis: different thrombus-like formations in balloon-expandable transcatheter aortic valve prostheses†. *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 54 (1), 157-161 (2018)
51. Richardt D., Hanke T., Sievers H.-H., Two Cases of Heart Failure after Implantation of a CoreValve Prosthesis. *N Engl J Med.* 372 (11), 1079-1080 (2015)
52. Makkar R.R., Fontana G., Jilaihawi H. hakravarty, T., Kofoed, K. F., De Backer, O., Asch, F. M., Ruiz, C. E., Olsen, N. T., Trento, A., Friedman, J., Berman, D., Cheng, W., Kashif, M., Jelnin, V., Kliger, C. A., Guo, H., Pichard, A. D., Weissman, N. J.,

- Kapadia, S., Manasse, E., Bhatt, D. L., Leon, M. B., Søndergaard, L., Possible Subclinical Leaflet Thrombosis in Bioprosthetic Aortic Valves. *N Engl J Med.* 373 (21), 2015-2024 (2015)
53. Franzone A., Pilgrim T., Haynes A.G., Lanz J., Asami M., Praz F., Räber L., Roost E., Langhammer B., Windecker S., Stortecky S., Transcatheter aortic valve thrombosis: incidence, clinical presentation and long-term outcomes. *Eur Heart J.* 19 (4), 398-404 (2017)
54. Thomschke M., In-vitro-Untersuchung zur initialen Bildung und der Lokalisation von Thromben an mechanischen Herzklappen. Klinik für Herzchirurgie der Universität Lübeck (2008)
55. Scharfschwerdt M., Thomschke M., Sievers H.-H., In-vitro localization of initial flow-induced thrombus formation in bileaflet mechanical heart valves. *ASAIO J.* 55 (1), 19-23 (2009)
56. Lewis J.M.O., Macleod N., In-vitro localization of initial flow-induced thrombus formation in bileaflet mechanical heart valves. *Cardiovasc Res.* 17 (8), 466-475 (1983)
57. Martin A.J., Christy J.R.E., An In-Vitro Technique for Assessment of Thrombogenicity in Mechanical Prosthetic Cardiac Valves: Evaluation with a Range of Valve Types Aimee. *J Heart Valve Dis.* 13 (3), 509-520 (2004)
58. Medtronic GmbH, *CoreValve™ Transcatheter Aortic Valve Replacement (TAVR) - Patient Booklet.* (2015)
59. Medtronic GmbH, *CoreValve™ Evolut™ R System Overview.* (2017)
60. Medtronic GmbH, *CoreValve™ Product Description.* (2014)
61. JenaValve Technology GmbH, Die JenaValve™ Technology. URL: <http://jenavalve.com/about/> (Letzter Zugriff: 12. August 2019)
62. Treede H., Mohr F.-W., Baldus S., Rastan A., Ensminger S., Arnold M., Kempfert J., Figulla H.-R., Transapical transcatheter aortic valve implantation using the JenaValve™ system: acute and 30-day results of the multicentre CE-mark study†. *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 41 (6), e131-e138 (2012)
63. JenaValve Technology GmbH, JenaValve™ Product Information. URL: http://jenavalve.com/new_page/ (Letzter Zugriff: 12. August 2019)
64. Seiffert M., Bader R., Kappert U., Rastan A., Krapf S., Bleiziffer S., Hofmann S., Arnold M., Kallenbach K., Conradi L., Schlingloff F., Wilbring M., Schäfer U.,

- Diemert P., Treede H., Initial German Experience With Transapical Implantation of a Second-Generation Transcatheter Heart Valve for the Treatment of Aortic Regurgitation. *JACC Cardiovasc Interv.* 7 (10), 1168-1174 (2014)
65. Mieres J., Menéndez M., Fernández-Pereira C., Rubio M., Rodríguez A.E., Transapical Implantation of a 2nd-Generation JenaValve Device in Patient with Extremely High Surgical Risk. *Case Rep Cardiol.* 2015, 458151 (2015)
66. JenaValve Technology GmbH, Product Brochure: JenaValve Transapical TAVI System for Heart Teams.
67. Edwards Lifesciences Corporation, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Ease-Aortenherzklappe 3300TFX. URL: <https://www.edwards.com/de/devices/heart-valves/aortic-pericardial> (Letzter Zugriff: 04. September 2019)
68. Edwards Lifesciences Corporation, The Aortic Valve Guide - Measurements that affect valve selection. (2010)
69. UBQO, Bapat D. V., ViV Aortic App 5.0 - An instant guide to Valve in Valve procedures for clinicians (Letzter Zugriff: 04. September 2021)
70. Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P., Kapitel 10: Milch und Milchprodukte. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie.* 6. Auflage, Kapitel 10, Springer-Verlag Berlin, S. 514-561 (2008)
71. Töpel A., Zusammensetzung - Milchbestandteile. *Chemie und Physik der Milch: Naturstoff – Rohstoff – Lebensmittel.* 4. Auflage, Kapitel 2, Behr's Verlag Hamburg, S. 3-10 (2016)
72. Mellander O., Elektrophoretische Untersuchung von Casein. *Biochem Z.* 300, 240-245 (1939)
73. Töpel A., Milchproteine - Milcheiweiß. *Chemie und Physik der Milch.* 4. Auflage, Kapitel 7.4, Behr's Verlag Hamburg, S. 217-270 (2016)
74. Jollès P., Structural aspects of the milk clotting process. Comparative features with the blood clotting process. *Mol Cell Biochem.* 7 (2), 73-85 (1975)
75. Töpel A., Milch als polydisperses System. *Chemie und Physik der Milch.* 4. Auflage, Kapitel 13, Behr's Verlag Hamburg, S. 363-425 (2016)
76. Kirhhübel W., Milchgerinnungsenzyme. *Lebensmittelbiotechnologie - Entwicklung und Aspekte.* 1. Auflage, Kapitel 5, Akademie-Verlag Berlin, S. 268-286 (1991)
77. Arima K., Iwasaki S., Tamura G., Milk Clotting Enzyme from Microorganisms - Part I. Screening Test and the Identification of the Potent Fungus. *Agric Biol Chem.*

- 31 (5), 540-545 (1967)
78. Kumar A., Grover S., Sharma J., Batish V.K., Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit Revies Biotechnol.* 30 (4), 242-258 (2010)
79. Preetha S., Boopathy R., Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World J Microbiol Biotechnol.* 13, 573-578 (1997)
80. Sternberg M.Z., Crystalline milk-clotting protease from *mucor miehei* and some of its properties. *J Dairy Sci.* 54 (2), 159-167 (1971)
81. Dunn B.M., Mucorpepsin. *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 2. Auflage, Kapitel 26, Elsevier, S. 111-113 (2004)
82. Bunte Kuh Käsebedarf in Hainzell, Milase Premium 220 Produktbeschreibung. URL:<http://kaesereibedarf.de/shop/lab/lab-microbielles-fluessig-1-liter/> (Letzter Zugriff: 26. Juli 2019)
83. CSK food enrichment Wageningen, Milase Premium 220 BF Produkdatenblatt. (2019)
84. Horne D.S., Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *Int Dairy J.* 8 (3), 171-177 (1998)
85. Lucey J.A., ADSA Foundation Scholar Award - Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *J Dairy Sci.* 85 (2), 281-294 (2002)
86. Carlson A., Hill C.G., Olson N.F., Kinetics of Milk Coagulation: II. Kinetics of the Secondary Phase: Micelle Flocculation. *Biotechnol Bioeng.* 29 (5), 590-600 (1987)
87. Visser S., Slangen C.J., Van Rooijen P.J., Peptide substrates for Chymosin (rennin) - Interaction sites in i-casein-related sequences located outside the (103-108) hexapeptide region that fits into the enzyme's active-site cleft. *Biochem J.* 244 (3), 553-558 (1987)
88. Carlson A., Hill C.G.J., Olson N.F., Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotechnol Bioeng.* 29 (5), 582-589 (1987)
89. Carlson A., Hill C.G., Olson N.F., The Kinetics of Milk Coagulation: IV. The Kinetics of the Gel-Firming Process. *Biotechnol Bioeng.* 29 (5), 612-624 (1987)
90. Müller-Newen G., Petrides P.E., Blut - Bestandteile und Blutplasma. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.* 9. Auflage, Kapitel 67, Springer-Verlag Berlin, S. 857-862 (2014)

91. Klinker R., Pape H.-C., Kurtz A., Silbernagl S., Blut - Ein flüssiges Organsystem. *Physiologie*. 6. Auflage, Kapitel 7, Thieme Verlag Stuttgart, S. 224-256 (2010)
92. Müller-Newen G., Petrides P.E., Blut - Thrombocyten und Leukocyten. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage, Kapitel 69, Springer Verlag Berlin, S. 877-892 (2014)
93. Jelkmann W., Allgemeine Eigenschaften des Blutes. *Physiologie des Menschen*. 32. Auflage, Kapitel 23, Springer-Verlag Berlin, S. 285-305 (2019)
94. Berg J.M., Tymoczko J.L., Gatto G.J. jr., Stryer L., Viele Enzyme werden durch eine spezifische proteolytische Spaltung aktiviert. *Stryer Biochemie*. 8. Auflage, Kapitel 10.4, Springer Spektrum Berlin, S. 360-363 (2018)
95. Berg J.M., Tymoczko J.L., Gatto G.J. jr., Stryer L., Enzyme sind leistungsstarke und hochspezifische Katalysatoren. *Stryer Biochemie*. 8. Auflage, Kapitel 8.1, Springer Spektrum, S. 256-259 (2018)
96. Jollès P., Henschen A., Comparison between the clotting of blood and milk. *Trends Biochem Sci*. 7 (9), 325-328 (1982)
97. Holmes D.R., Mack M.J., Kaul S. Agnihotri, A., Alexander, K. P., Bailey, S. R., Calhoon, J. H., Carabello, B. A., Desai, M. Y., Edwards, F. H., Francis, G. S., Gardner, T. J., Kappetein, A. P., Linderbaum, J. A., Mukherjee, C., Mukherjee, D., Otto, C. M., Ruiz, C. E., Sacco, R. L., Smith, D., Thomas, J. D., 2012 ACCF/AATS/SCAI/STS Expert - Consensus Document on Transcatheter Aortic Valve Replacement: Developed in collaboration with the American Heart Association, American Society of Echocardiography, European Association for Cardio-Thoracic Surgery, Heart Fa. *J Am Coll Cardiol*. 59 (13), 1222-1254 (2012)
98. Schmitz F., Herz und Herzbeutel. *Duale Reihe Anatomie*. 4. Auflage, Kapitel 3, Thieme Verlag Berlin, S. 578-625 (2017)
99. Ussia G.P., Sarkar K., Cammalleri V., Marchei M., Muscoli S., De Vico P., Rubino D., De Persis F., Macrini M., Romeo F., Clinical results with the 31 mm CoreValve™ in large aortic annuli: the importance of implantation technique. *EuroIntervention*. 10 (9), e1-8 (2015)
100. Figulla H.R., Ferrari M., Carr-Brendel V., Lauten A., The JenaValve Program for Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Transcatheter Aortic Valve Implantation*. 1. Auflage, Kapitel 23, Springer Nature Switzerland, S. 279-286 (2019)
101. Stock S., Scharfschwerdt M., Meyer-Saraei R., Richardt D., Charitos E.I., Sievers H.-

- H., Hanke T., In vitro coronary flow after transcatheter aortic valve-in-valve implantation: A comparison of 2 valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 152 (2), 255-263 (2016)
102. Stock S., Sievers H.-H., Richardt D., Scharfschwerdt M., First ex vivo and preliminary sheep model results of the new TRIBIO aortic valve bioprosthesis in small aortic annuli. *Interact Cardiovasc Thoracic Surg.* 25 (5), 793-798 (2017)
103. Yanagisawa R., Tanaka M., Yashima F., Arai T., Jinzaki M., Shimizu H., Fukuda K., Watanabe Y., Naganuma T., Higashimori A., Mizutani K., Araki M., Tada N., Yamanaka F., Otsuka T., Yamamoto M., Hayashida K., Early and late leaflet thrombosis after transcatheter aortic valve replacement: A multicenter initiative from the OCEAN-TAVI registry. *Circ Cardiovasc Interv.* 12 (2), 1-9 (2019)
104. Vollema E.M., Kong W.K.F., Katsanos S., Kamperidis V., Van Rosendael P.J., Van der Kley F., De Weger A., Marsan N.A., Delgado V., Bax J.J., Transcatheter aortic valve thrombosis: The relation between hypo-attenuated leaflet thickening, abnormal valve haemodynamics, and stroke. *Eur Heart J.* 38 (16), 1207-1217 (2017)
105. De Marchena E., Mesa J., Pomenti S., Marin Y Kall C., Marincic X., Yahagi K., Ladich E., Kutz R., Aga Y., Ragosta M., Chawla A., Ring M.E., Virmani R., Thrombus Formation Following Transcatheter Aortic Valve Replacement. *JACC Cardiovasc Interv.* 8 (5), 728-739 (2015)
106. Dangas G., Lefèvre T., Kaputt C. Tchetché, D., Schäfer, U., Dumonteil, N., Webb, J. G., Colombo, A., Windecker, S., Berg, J. M. ten, Hildick-Smith, D., Mehran, R., Boekstegers, P., Linke, A., Tron, C., Van Belle, E., Asgar, A. W., Fach, A., Jeger, R., Sardella, G., Hink, H. U., Husser, O., Grube, E., Deliargyris, E. N., Lechthaler, I., Bernstein, D., Wijngaard, P., Anthopoulos, P., Hengstenberg, C., Bivalirudin Versus Heparin Anticoagulation in Transcatheter Aortic Valve Replacement. *J Am Coll Cardiol.* 66 (25), 2860-2868 (2015)
107. Abdel-Wahab M., Landt M., Neumann F.J., Massberg S., Frerker C., Kurz T., Kaur J., Toelg R., Sachse S., Jochheim D., Schäfer U., El-Mawardy M., Robinson D.R., Richardt G., 5-Year Outcomes After TAVR With Balloon-Expandable Versus Self-Expanding Valves: Results From the CHOICE Randomized Clinical Trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 11;13 (9), 1071-1082 (2020)
108. R. Virchow, Phlogose und Thrombose im Gefässsystem. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin.* Frankfurt am Main, Meidinger Sohn & Comp.,

- S. 458-636 (1856)
109. Dangas G.D., Tijssen J.G.P., Wöhrle J. Søndergaard, L., Gilard, M., Möllmann, H., Makkar, R. R., Herrmann, H. C., Giustino, G., Baldus, S., De Backer, O., Guimarães, A. H. C., Gullestad, L., Kini, A., Von Lewinski, D., Mack, M., Moreno, R., Schäfer, U., Seeger, J., Tchétché, D., Thomitzek, K., Valgimigli, M., Vranckx, P., Welsh, R. C., Wildgoose, P., Volkl, A. A., Zazula, A., Van Amsterdam, R.G.M., Mehran, R., Windecker, S., A Controlled Trial of Rivaroxaban after Transcatheter Aortic-Valve Replacement. *N Engl J Med.* 382 (2), 120-129 (2020)
110. De Backer O., Dangas G. D., Jilaihawi H., Leipsic, J. A., Terkelsen, C. J., Makkar, R., Kini, A. S., Veien, K. T., Abdel-Wahab, M., Won-Keun, K. , Balan, P., Van Mieghem, N., Mathiassen, O. N., Jeger, R. V., Arnold, M., Mehran, R., Guimarães, A. H. C., Nørgaard, Bjarne L., Kofoed, K. F., Blanke, P., Windecker, S., Søndergaard, L., Reduced Leaflet Motion after Transcatheter Aortic-Valve Replacement. *N Engl J Med.* 382 (2), 130-139 (2020)
111. Bapat V., Attia R., Aziz W., Radia R., Prione F., Challenges in Valve-in-Valve Therapy for Aortic Valves. *Catheter Based Valve and Aortic Surgery.* 1. Auflage, Kapitel 9, Springer Verlag New York, S. 119-138 (2016)

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ansicht von oben auf die Aortenklappe	2
Abbildung 2: Topografie der Aortenklappe	3
Abbildung 3: Der anatomische Aufbau der Aortenwurzel	5
Abbildung 4: Verschiedene mechanische und biologische Klappenprothesen	9
Abbildung 5: Die Wahl einer mechanischen Klappenprothese	11
Abbildung 6: Die Wahl einer Bioklappenprothese	12
Abbildung 7: Verschiedene Transkatheter-Klappenprothesen	13
Abbildung 8: Antegrad transfemoraler venöser Zugang	15
Abbildung 9: Retrograder transfemoraler arterieller Zugang	17
Abbildung 10: Antegrad linksventrikulärer transapikaler Zugang	18
Abbildung 11: Indikationen zur antithrombotischen Therapie	19
Abbildung 12: CoreValve™ nach einem frustran verlaufenden Implantationsversuch	23
Abbildung 13: Lübecker Versuchsaufbau	25
Abbildung 14: Inkubator mit Testkammer	26
Abbildung 15: Testkammer mit Testklappe	27
Abbildung 16: CoreValve™ vor Implantation und expandiert	28
Abbildung 17: JenaValve™ vor Implantation und expandiert	30
Abbildung 18: Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Ease	31
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Milchezusammensetzung	32
Abbildung 20: "Dual-binding"-Modell der Caseinmicelle nach Horne	35
Abbildung 21: Entstehung eines Thrombozytenpfropfes	39
Abbildung 22: Extrinsisches und intrinsisches System der sekundären Hämostase	40
Abbildung 23: Bildung von Fibrinpolymeren	42
Abbildung 24: Definition der Gerinnsellokalisation	44
Abbildung 25: Thrombenbildung im Bereich der linken Kommissur der JenaValve™	46
Abbildung 26: Thrombenbildung im Bereich der rechten Kommissur der JenaValve™	47
Abbildung 27: Thrombenbildung im Bereich des Sinus der CoreValve™	49
Abbildung 28: Verteilung der Milchthromben	51
Abbildung 29: Vergleich von Blutthromben und Milchthromben	57
Abbildung 30: CoreValve™ 26, 1. Versuch	85

Abbildung 31: CoreValve™ 26, 2. Versuch.....	85
Abbildung 32: CoreValve™ 26, 3. Versuch.....	85
Abbildung 33: CoreValve™ 26, 4. Versuch.....	85
Abbildung 34: CoreValve™ 26, 5. Versuch.....	85
Abbildung 35: JenaValve™ 25, 1. Versuch	86
Abbildung 36: JenaValve™ 25, 2. Versuch	86
Abbildung 37: JenaValve™ 25, 3. Versuch	86
Abbildung 38: JenaValve™ 25, 4. Versuch	86
Abbildung 39: JenaValve™ 25, 5. Versuch	86
Abbildung 40: JenaValve™ 23, 1. Versuch	87
Abbildung 41: JenaValve™ 23, 2. Versuch	87
Abbildung 42: JenaValve™ 23, 3. Versuch	87
Abbildung 43: JenaValve™ 23, 4. Versuch	87
Abbildung 44: JenaValve™ 23, 5. Versuch	87

7.2 Tabellarischer Anhang

7.2.1 JenaValve™

Klappenbezeichnung	S	RC	LC	W
01 2016_11_07 JV 23 1	11	11	10	15
02 2016_11_07 JV 23 1	28	6	18	6
03 2016_11_07 JV 23 1	21	14	14	15
01 2016_12_19 JV 23 2	20	15	13	15
02 2016_12_19 JV 23 2	27	15	15	8
03 2016_12_19 JV 23 2	27	20	22	15
01 2016_12_20 JV 23 3	Daten in der Auswertung ausgeschlossen			
02 2016_12_20 JV 23 3				
03 2016_12_20 JV 23 3				
01 2017_01_12 JV 23 4	24	10	21	11
02 2017_01_12 JV 23 4	20	15	11	9
03 2017_01_12 JV 23 4	21	15	13	11
01 2017_02_15 JV 23 5	25	18	20	13
02 2017_02_15 JV 23 5	27	19	18	13
03 2017_02_15 JV 23 5	22	13	19	15
Absolute Thrombenzahl	273	171	194	146
Gesamtthrombenzahl	784			
Prozentualer Anteil	34,82	21,81	24,74	18,62

Tabelle 8: Thrombenbildung der JenaValve™ 23 in Sinus (S), Kommissur rechts (CR), Kommissur links (CL) und an der Wand (W)

Klappenbezeichnung	S	RC	LC	W
01 2017_02_16 JV 25 1	20	14	12	18
02 2017_02_16 JV 25 1	21	19	12	18
03 2017_02_16 JV 25 1	30	22	19	18
01 2017_02_17 JV 25 2	46	35	26	14
02 2017_02_17 JV 25 2	38	20	28	12
03 2017_02_17 JV 25 2	47	24	21	13
01 2017_02_28 JV 25 3	43	24	27	18
02 2017_02_28 JV 25 3	41	22	26	14
03 2017_02_28 JV 25 3	52	23	22	17
01 2017_03_01 JV 25 4	51	27	20	14
02 2017_03_01 JV 25 4	47	33	31	20
03 2017_03_01 JV 25 4	53	33	32	15
01 2017_03_02 JV 25 5	56	40	29	17
02 2017_03_02 JV 25 5	59	34	22	19
03 2017_03_02 JV 25 5	61	29	34	23
Absolute Thrombenzahl	665	399	361	250
Gesamtthrombenzahl			1675	
Prozentualer Anteil	39,7	23,82	21,56	14,93

Tabelle 9: Thrombenbildung der JenaValve™ 25 in Sinus (S), Kommissur rechts (CR), Kommissur links (CL) und an der Wand (W)

7.2.2 CoreValve™

Klappenbezeichnung	S	RC	LC	W
01 2017_03_03 CV 26 1	36	10	14	8
02 2017_03_03 CV 26 1	32	16	13	10
03 2017_03_03 CV 26 1	34	11	12	13
01 2017_03_14 CV 26 2	41	18	20	11
02 2017_03_14 CV 26 2	49	17	22	15
03 2017_03_14 CV 26 2	61	31	23	16
01 2017_03_15 CV 26 3	52	-	22	11
02 2017_03_15 CV 26 3	55	17	19	10
03 2017_03_15 CV 26 3	67	21	15	10
01 2017_03_16 CV 26 4	68	37	32	15
02 2017_03_16 CV 26 4	43	21	32	11
03 2017_03_16 CV 26 4	-	-	25	-
01 2017_03_17 CV 26 5	43	20	15	12
02 2017_03_17 CV 26 5	56	23	22	10
03 2017_03_17 CV 26 5	59	23	27	14
Absolute Thrombenzahl	696	265	313	166
Gesamtthrombenzahl			1440	
Prozentualer Anteil	48,33	18,4	21,74	11,53

Tabelle 10: Thrombenbildung der CoreValve™ 26 in Sinus (S), Kommissur rechts (CR), Kommissur links (CL) und an der Wand (W)

7.3 Bildanhang

7.3.1 CoreValve™



Abbildung 30: CoreValve™ 26, 1. Versuch



Abbildung 31: CoreValve™ 26, 2. Versuch

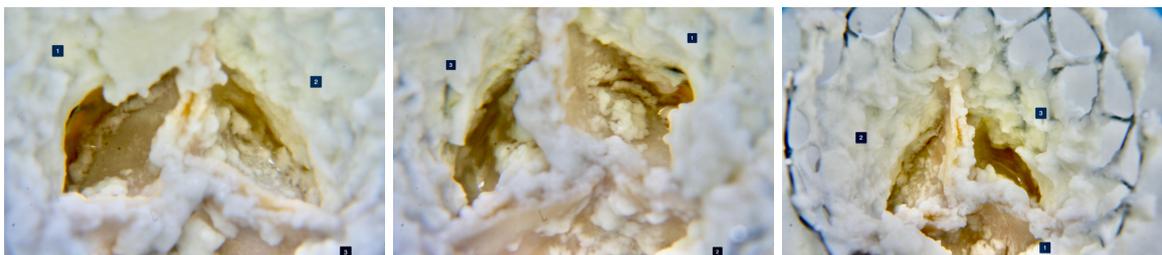


Abbildung 32: CoreValve™ 26, 3. Versuch



Abbildung 33: CoreValve™ 26, 4. Versuch



Abbildung 34: CoreValve™ 26, 5. Versuch

7.3.2 JenaValve™

JenaValve™ 25

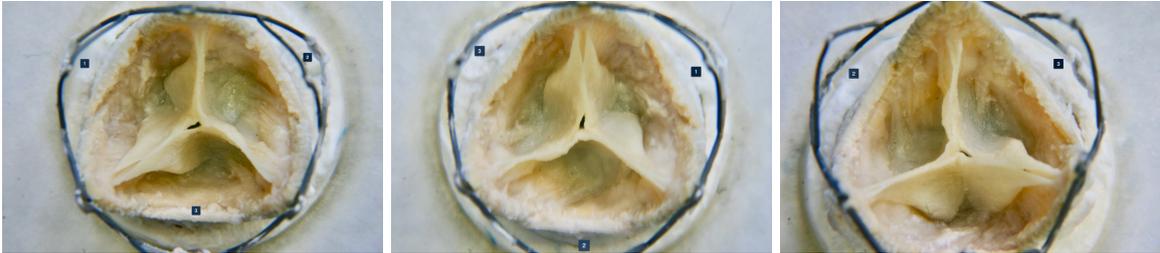


Abbildung 35: JenaValve™ 25, 1. Versuch



Abbildung 36: JenaValve™ 25, 2. Versuch

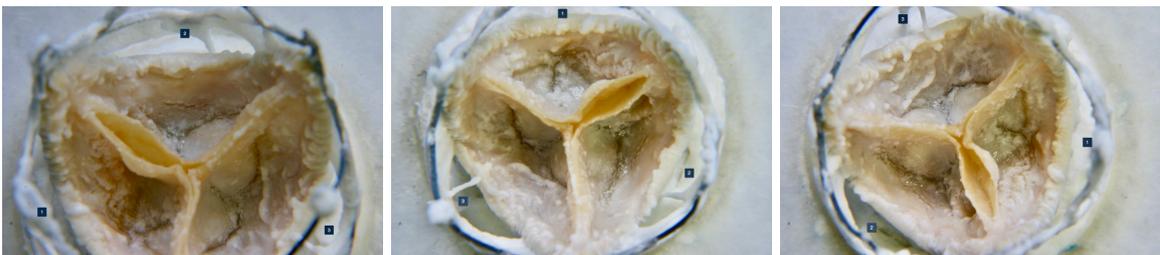


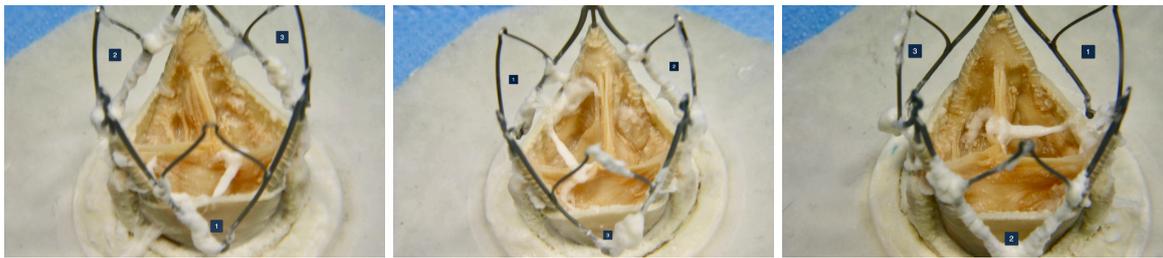
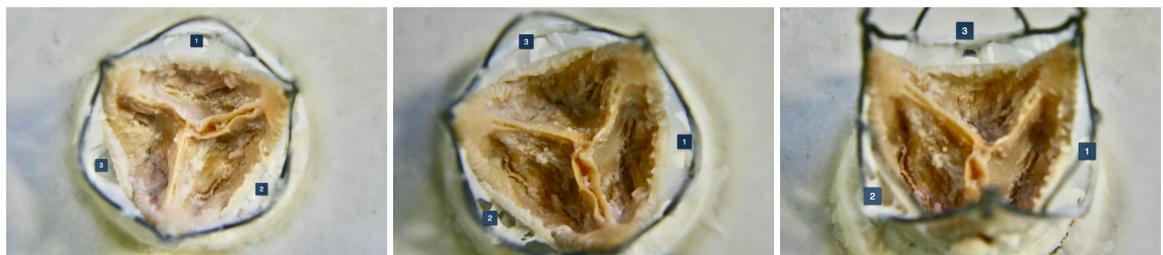
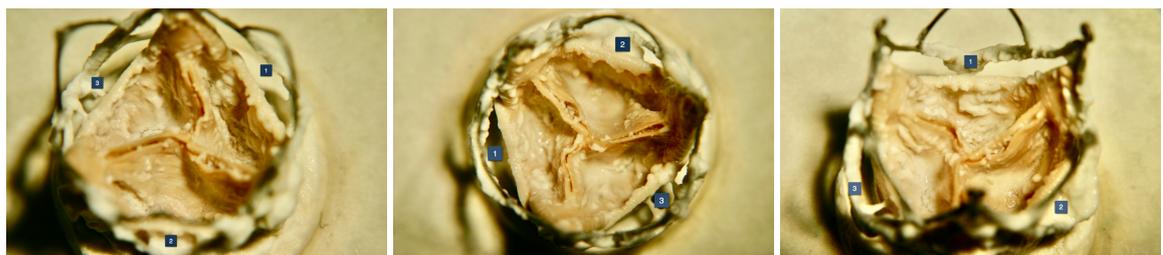
Abbildung 37: JenaValve™ 25, 3. Versuch



Abbildung 38: JenaValve™ 25, 4. Versuch



Abbildung 39: JenaValve™ 25, 5. Versuch

JenaValve™ 23**Abbildung 40: JenaValve™ 23, 1. Versuch****Abbildung 41: JenaValve™ 23, 2. Versuch****Abbildung 42: JenaValve™ 23, 3. Versuch (nicht mit in die Auswertung geflossen)****Abbildung 43: JenaValve™ 23, 4. Versuch****Abbildung 44: JenaValve™ 23, 5. Versuch**

8. Danksagungen

Ich möchte zunächst Herrn Professor Dr. med. Hans-Heinrich Sievers, ehemaliger Direktor der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die Möglichkeit der Nutzung des Labors und das Überlassen der Materialien danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. habil. Doreen Richardt für das interessante Thema und ihre bedingungslose Unterstützung während der gesamten Zeit der Dissertation. Ihre wertvollen Ratschläge, die konstruktiven fachlichen Gespräche und ihre langjährige Erfahrung in der Herz- und thorakalen Gefäßchirurgie haben maßgeblich zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. rer. hum. biol. Michael Scharfschwerdt und Kathrin Schubert für die Einarbeitung im Labor und die technische Expertise bei den experimentellen Durchführungen.

Ich danke Herr Michael Diwocky für seine freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Im Rahmen der experimentellen Durchführung, möchte ich dem landwirtschaftlichen Betrieb der Familie Falkenhusen in Lübeck für die morgendliche Bereitstellung großer Mengen Milch danken.

Danken möchte ich außerdem meiner Familie und Freunden, die mich während des Studiums begleitet haben und ohne deren uneingeschränkte Unterstützung diese Dissertation nicht realisierbar gewesen wäre.