

Vitalität und Kalzifizierungsneigung porciner Aortenklappen: In-vitro-Untersuchungen

Der Fakultät für Maschinenbau
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieurin

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Ing. Tanja Samira Büschenfeld, geb. Wadouh
geboren am 27. Dezember 1980 in Hannover

2012

1. Referentin: Prof. Dr.-Ing. B. Glasmacher
 2. Referent: Prof. Dr.-Ing. B.-A. Behrens
 3. Referent: Prof. Dr.-Ing. Dr. rer. biol. hum. habil. K. D. Jürgens
- Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr.-Ing. G. Poll

Tag der Promotion: 14. Dezember 2012

Vorwort

“Das Herz der Lebewesen ist der Grundstock ihres Lebens, der Fürst ihrer aller, der kleinen Welt Sonne, von der alles Leben abhängt, alle Frische und Kraft ausstrahlt.”

William Harvey

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mehrphasenprozesse der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Mein besonderer Dank gilt der Institutsleiterin Frau Professor Dr.-Ing. Birgit Glasmacher, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit durchzuführen.

Herrn Professor Dr.-Ing. Bernd-Arno Behrens und Herrn Professor Dr.-Ing. Dr. rer. biol. hum. habil. Klaus Dieter Jürgens danke ich für die Übernahme der Koreferate.

Herrn Professor Dr.-Ing. Gerhard Poll danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie dem gesamten Kollegium, die mich in meiner Zeit am Institut begleitet haben. Bedanken möchte ich mich auch bei den zahlreichen Studierenden, die stets mit sehr großem Engagement zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Familie gilt besonderer Dank für die Korrekturlesung der Arbeit und für die Unterstützung in allen Lebenslagen, mit der sie mir diesen Weg ermöglicht haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Torsten, der mich stets unterstützt und die nötige Geduld aufgebracht hat.

Hannover, im Dezember 2012

Tanja Samira Büschenfeld

Inhaltsverzeichnis

Formelzeichen	III
Kurzfassung	V
Abstract	VI
1 Einleitung	1
2 Ziele und Gliederung der Arbeit	3
3 Physiologische Grundlagen	5
3.1 Herzklappen in vivo	5
3.2 Herzklappenersatz	9
3.3 Kalzifizierung	13
4 Stand der Forschung und Technik zur Herzklappenkalzifizierung	16
4.1 Bioreaktoren am Institut für Mehrphasenprozesse	16
4.2 In vivo Aortenklappenkalzifizierung	19
4.3 In-vitro-gezüchtete Herzklappenbioprothesen	24
4.4 Untersuchungsmethoden von Kalzifizierungsablagerungen - von Kossa Färbung, Strömungsvermessung, numerische Modellierung	26
4.4.1 Von Kossa Färbung und Graustufenbereichbestimmung	26
4.4.2 Strömungsvermessung mittels Particle Image Velocimetry (PIV) . .	28
4.4.3 Numerische Modelle der Herzklappensimulation	29
5 Bioreaktor zur Aufrechterhaltung der Vitalität einer porcinen Aortenklappe	32
5.1 Material und Methoden	32
5.2 Versuchsdurchführung	41
5.3 Ergebnisse	43

6	Untersuchungsmethoden von Kalzifizierungen	48
6.1	Visueller Nachweis von Kalziumphosphatablagerungen an Herzklappenbioprothesen	48
6.1.1	Material und Methoden	50
6.1.2	Ergebnisse	54
6.2	Experimentelle Strömungsvermessung an Herzklappen mittels Particle Image Velocimetry (PIV)	60
6.2.1	Material und Methoden	61
6.2.2	Ergebnisse	64
6.3	Simulation der Herzklappenöffnung mittels Fluid Structure Interaction (FSI) und Finite Elemente Methode (FEM)	73
6.3.1	Material und Methoden der FSI	74
6.3.2	Ergebnisse der FSI	81
6.3.3	Material und Methoden der FEM-Simulation	83
6.3.4	Ergebnisse der FEM	89
7	Diskussion	93
8	Zusammenfassung und Ausblick	99
	Literaturverzeichnis	103
A	Anhang	118
A.1	Bioreaktor	118
A.2	Von Kossa Färbung	121
A.3	Particle Image Velocimetry (PIV)	126
A.4	FSI- und FEM-Simulation	129

Formelzeichen

Lateinisch

Formelzeichen	Einheit	Bedeutung
A	m^2	Fläche
$Ampl$	mmHg	maximale Druckamplitude
d	mm	Rohrdurchmesser
d_G	mm	Gefäßdurchmesser
d_S	mm	Konduitdurchmesser
E	Nm^{-2}	Elastizitätsmodul
F	N	Kraft
FEM	–	Finite Elemente Methode
FSI	–	Fluid Structure Interaction
g	$kgms^{-2}$	Beschleunigung
h	mm	Höhe
h_{Bauch}	mm	Bauchbereichshöhe (Höhe des Sinus der Herzklappe)
h_K	mm	Klappenhöhe
$h_{Kontakt}$	mm	Kontaktflächenhöhe
h_+	mm	Zylinderhöhe +
h_-	mm	Zylinderhöhe –
i,j	mm	Pixelposition
l_{dicke}	mm	Klappendicke
M,N	mm	Größe des Analysefeldes
m,n	m	Längenschritte des Analysefeldes
PIV	–	Particle Image Velocimetry
$P_{verl_{sinus}}(t)$	mmHg	sinusförmiger Druckverlauf
Δp	mmHg	Druckdifferenz
r	mm	Radius Haltescheibe
R	mm	Radius Membran
$r_{Rundung}$	mm	Rundungsradius

Formelzeichen	Einheit	Bedeutung
t	s	Zeit
t_0	s	Zeitpunkt des ersten Laserpulses
τ	s	Gesamtzeit
t_{step}	s	Zeitschritt
T_{abschn}	s	Dauer eines Druckabschnittes
T_{ges}	s	Gesamtzeit
\vec{u}	ms^{-1}	Geschwindigkeitsvektor
V	cm^3	Volumen
ν	—	Poisson-Zahl
v_n	ms^{-1}	Geschwindigkeit für den n. Zeitschritt
v_{max}	ms^{-1}	maximale Geschwindigkeit
\vec{z}	m	Ortsvektor

Griechisch

Formelzeichen	Einheit	Bedeutung
α_{Luecke}	°	Lückenwinkel
α_T	°	Taschenwinkel
α_{oben}	°	Taschenwinkel oben
α_{unten}	°	Taschenwinkel unten
ϵ	—	Dehnung
η	$kg(ms)^{-1}$	dynamische Viskosität
λ	nm	Wellenlänge
ρ	kgm^{-3}	Dichte
σ	MPa	Spannung

Kurzfassung

Büschendorf, Tanja Samira

Vitalität und Kalzifizierungsneigung porciner Aortenklappen: In-vitro-Untersuchungen

Die limitierenden Faktoren bei der Verwendung von biologischen Herzklappenprothesen als Ersatzmaterial sind sowohl die vorzeitige Degeneration aufgrund von Kalzifizierung der Klappentaschen als auch deren fehlendes Mitwachsen bei infantilen Patienten. Aus lebenden Zellen gezüchtete Herzklappen stellen eine Möglichkeit dar, diese Probleme zu umgehen und neuartiges Ersatzgewebe herzustellen, das das Potential zum Mitwachsen besitzt. Diese neuartigen Herzklappen werden in Bioreaktoren gezüchtet und kultiviert. Die Reaktoren bieten optimale Prozessbedingungen für die Züchtung vitaler Herzklappen. Zusätzlich können mit einem Bioreaktor Untersuchungen hinsichtlich der Kalzifizierungsneigung einer Herzklappe durchgeführt werden.

Der Schwerpunkt dieser Dissertation liegt in der Konstruktion und Validierung eines Bioreaktors, mit dessen Hilfe vitale Herzklappen kultiviert und kalzifiziert werden können. Für die Versuche werden porcine Herzklappen über 14 Tage bei einem physiologischen Druck vital gehalten.

Um Kalzifizierungsablagerungen visualisieren und quantifizieren zu können, werden nicht-invasive Methoden wie das Röntgen- oder Computertomographieverfahren angewendet. Hierbei wird die Hounsfield Unit (HU) als Auswertung benutzt. Es findet, abweichend von Beschreibungen in der Literatur, eine genaue Eingrenzung der HU-Werte statt. Diese wird mit der Schleif- und von Kossa-Färbemethode durchgeführt. Weiterhin werden numerische Methoden für Untersuchungen hinsichtlich einer Optimierung der Herzklappe und Quantifizierung einer Kalzifizierung eingesetzt. Spannungsverteilung und Lokalisation der Kalzifizierung können so definiert werden. Ein Zusammenhang zwischen numerischer Strömungsmechanik (Computational Fluid Dynamics (CFD)) hinsichtlich der theoretischen Spannungsverteilung sowie dem Öffnungsverhalten und dem praktischen Vergleich der unterschiedlichen Strömungsformen, die mittels der Particle Image Velocimetry (PIV) gemessen werden, wird festgestellt. Dabei wird die Strömung durch sowohl native und fixierte als auch durch wöchentlich kalzifizierte Herzklappen untersucht.

Mit dem verifizierten Bioreaktor und den etablierten Untersuchungsmethoden können in Zukunft Kalzifizierungsversuche bei gezüchteten Herzklappen durchgeführt werden.

Schlagwörter: Kalzifizierung, PIV, CFD

Abstract

Büschendorf, Tanja Samira

Vitality and propensity to calcification of porcine aortic heart valves: in vitro studies

The limiting factors in the use of biological heart valve prostheses as a substitute material are both the premature degeneration caused by calcification of the valve leaflets, as well as their deficiency of nurturing in infantile patients. Heart valves grown from living cells provide an opportunity to make new replacement tissues that have the potential to nurture. The heart valves are grown and cultured in bioreactors. The reactors are used to ensure optimum process conditions for the cultivation of vital heart valves. In addition, such a heart valve can be tested with a bioreactor in consideration of the tendency to calcify.

The focus of this dissertation is the construction and validation of a bioreactor that cultivates vital heart valves. For the experiments, porcine heart valves are kept vital for 14 days at a physiological pressure.

To define calcification deposits, non-invasive methods such as X-ray or computer tomography examinations are used. Here, the Hounsfield unit (HU) is used as an evaluation. Differently to the literature, an exact localization of the HU-values is defined. This is performed with the grinding and von Kossa staining method. Furthermore, numerical methods for studies concerning the optimization of the heart valve and quantification of calcification are applied. Stress distribution within a heart valve and site of calcification can be defined. A correlation between numerical calculations with computational fluid dynamics (CFD) with respect to the theoretical stress distribution and the opening behavior and the practical comparison of different flow patterns, which is measured using particle image velocimetry (PIV), can be found. Here, the flow through both, native and fixed as well as by weekly calcified heart valves is examined.

With the verified bioreactor and the examination methods calcification experiments with living heart valves can be carried out in future.

Keywords: Calcification, PIV, CFD

1 Einleitung

Fast die Hälfte aller in Europa auftretenden Todesfälle sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen und Funktionsstörungen des Herzens zurückzuführen. Häufig sind dabei die Herzklappen betroffen. Dies gilt insbesondere für die Aortenklappe, die sich zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta befindet. Die Häufigkeit dieser Erkrankungen liegt nicht nur an der älter werdenden Bevölkerung. Auch Lebenswandel und Lebensstandard haben einen bedeutenden Einfluss auf die pathologische Entwicklung der Herzklappen. Die meisten erkrankten Menschen sind abhängig von der modernen Chirurgie, die mittels Implantation von Herzklappenprothesen das Leiden lindern und die Lebensqualität verbessern soll. Der Bedarf an Ersatzteilen übersteigt jedoch bei Weitem die Anzahl der verfügbaren Organspenden. Deshalb ist die Entwicklung geeigneter Alternativen nicht nur in der Medizin und Biologie, sondern auch in den Ingenieurwissenschaften ein bedeutendes Thema [1–5].

Herzklappenprothesen, bestehend aus Carbon (mechanische) oder xenogenem Gewebe (biologische), sind auf dem Implantationsmarkt weit verbreitet. Die erste künstliche Herzklappe aus Carbon wurde in den 50er Jahren erfolgreich einem Menschen eingesetzt. Mittlerweile ist die Implantation einer mechanischen Herzklappe in der Chirurgie ein Routineeingriff und wird bei 30 % aller Herzklappenimplantationen durchgeführt. Die heutigen mechanischen Herzklappen weisen im Labor eine Lebensdauer von mehr als 150 Jahren auf [6]. Die Inzidenz von Komplikationen nach einer Implantation ist jedoch relativ hoch. Thrombenbildung und Ablagerungen werden mit einer lebenslangen Einnahme von Antikoagulantien reduziert. Bei der Implantation von biologischen Herzklappenprothesen konnten bislang thromboembolische Ereignisse weitgehend ausgeschlossen werden. Dieser bedeutende Vorteil ist auch der Grund, warum sie die Implantationshäufigkeit mit 70 % anführen [7]. Die aus porcinem oder bovinem Gewebe bestehenden Bioprothesen weisen gute hämodynamische Eigenschaften auf, haben jedoch den großen Nachteil einer geringen Haltbarkeit von 7 bis 15 Jahren aufgrund frühzeitiger Alterungsprozesse [8,9]. Eine solche Alterung manifestiert sich nicht nur in einer Degeneration des Gewebes, sondern auch in einer unvorhersagbaren Kalzifizierung der Herzklappentaschen. Durch diese Kalzifizierung kann es zu Funktionsstörungen der Klappen (Stenose und/oder

Insuffizienz) bzw. zum völligen Versagen der Herzklappenprothese kommen, sodass eine erneute Operation notwendig wird [10, 11]. Kalzifizierung ist die Hauptursache für das Versagen einer Herzklappenbioprothese.

Eine neue Technik ist das Züchten von Herzklappen mit vitalen Zellen (Tissue Engineering von Herzklappen). Bei dem Klappengerüst für eine Tissue Engineerte Herzklappe handelt es sich entweder um eine dezellularisierte Spenderklappe oder um einen polymeren Scaffold. Auf das Klappengerüst werden im Labor patienteneigene Zellen angesiedelt und nach erfolgreicher Züchtung dem Patienten implantiert. Vorteile der gezüchteten, vitalen Klappen sollen in ihrem Mitwachsen bei infantilen Patienten sowie in ihrem nicht-antigenen Verhalten liegen. Abstoßungsreaktionen sind ausgeschlossen, da die Klappen aus autologen Zellen hergestellt sind.

Tissue Engineerte Herzklappen werden in Bioreaktoren gezüchtet und erforscht. Hierbei wird zwischen dynamischer und mechanischer Reaktortechnik unterschieden. Dynamische Bioreaktoren dienen zur Besiedelung und Kultivierung von unterschiedlichen Geweben, während bei der mechanischen Technik verschiedene Eigenschaften, wie z. B. Vitalität oder Öffnungsverhalten der Herzklappe, geprüft und untersucht werden können. Des Weiteren dienen Bioreaktoren zur Untersuchung der Kalzifizierungsneigung vitaler Herzklappen. Diese Betrachtungsweise ist neu und noch nicht eingehend erforscht.

Da nachweislich sowohl natürliche als auch xenogene Herzklappen zu einer Kalzifizierung neigen, kann davon ausgegangen werden, dass auch eine Herzklappe, die mittels natürlicher Zellen und künstlichem Gerüst hergestellt wird, ein ähnliches Verhalten hinsichtlich der Kalzifizierung aufweisen wird.

2 Ziele und Gliederung der Arbeit

Das Ausmaß, ob und wie stark eine Herzklappe kalzifiziert, ist nicht nur vom Alter, Gesundheitszustand oder Geschlecht der Patientin bzw. des Patienten abhängig, sondern auch die genetische Prädisposition hat einen Einfluss darauf [12, 13]. Tissue Engineerte Herzklappen werden erst seit kurzem in tierexperimentellen bzw. klinischen Studien eingesetzt [14]. Eine Langzeitprognose bezüglich ihrer Lebensdauer bzw. einer Kalzifizierungsneigung ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Nicht nur künstliche, sondern auch körpereigene Klappen können eine Kalzifizierungsneigung besitzen. Die Frage, inwieweit eine Tissue Engineerte Herzklappe kalzifiziert, ist noch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit soll ein Grundstein für experimentelle Untersuchungsmethoden hinsichtlich der Kalzifizierung vitaler Herzklappen gelegt werden.

Hierfür wird in einem ersten Schritt ein Bioreaktor für eine vitale Herzklappe konstruiert und verifiziert (siehe Kapitel 5). Der Bioreaktor soll später dazu dienen, die sich noch in der Entwicklung befindlichen Tissue Engineerten Herzklappen vital zu halten, um weiterführende Untersuchungen durchführen zu können. Hierzu zählen Untersuchungen bezüglich der Kalzifizierung sowie des Langzeitverhaltens der Tissue Engineerten Klappenprothese. In den vorliegenden Versuchen werden vitale Aortenklappen aus dem Schlachthof präpariert und bis zu 14 Tage vital gehalten. Wichtige Aspekte wie z. B. Sterilität, Vitalität und Handhabung des Reaktors werden beachtet.

In den darauf folgenden Kapiteln wird auf verschiedene Untersuchungsmethoden eingegangen, die eine auftretende Kalzifizierung visualisieren und quantifizieren. Die Untersuchungen werden mit sowohl zerstörungsfreien als auch mit zerstörenden Methoden durchgeführt. Zu den zerstörungsfreien Verfahren zählen das Röntgen und die Computertomographie (CT). Diese Untersuchungen sind notwendig, um den kalzifizierten Bereich genau eingrenzen zu können. In der Literatur lassen sich verschiedene Angaben mittels der Graustufenverteilung nach Hounsfield (HU) und deren dazugehörigen Kalzifizierungen finden. Hier werden häufig Graustufen als Kalzifizierung definiert, die durch die Überlagerung von mehreren Gewebsschichten resultieren. Dadurch entsteht der Eindruck einer Kalzifizierung, die real nicht vorliegt. Röntgen- und CT-Bilder werden hinsichtlich der Hounsfield Units ausgewertet. Die Herzklappe wird anschließend getrocknet und in Epoxidharz einge-

bettet, um schichtweise mit der von Kossa Methode gefärbt und analysiert zu werden. Die von Kossa Methode eignet sich aufgrund ihrer chemischen Bindung an Calciumionen für diese Untersuchungen. Die Schichtbilder werden mit den Röntgen- und CT-Schnittbildern verglichen (siehe Kapitel 6.1).

Eine weitere zerstörungsfreie Methode zur Untersuchung der Kalzifizierung stellt die Particle Image Velocimetry (PIV) dar. Hierbei wird der Einfluss des veränderten Öffnungsquerschnitts auf das Ausströmverhalten der Herzklappen mit unterschiedlichen Kalzifizierungsgraden untersucht und beurteilt. In dem seit Jahren verifizierten Fatigue Accelerated Calcification Tester (FACT) werden hierfür Aortenklappen unterschiedlich kalzifiziert und strömungstechnisch betrachtet [15] (siehe Kapitel 6.2).

Untersuchungen hinsichtlich der von Mises-Spannungsverteilung oder des Öffnungsverhaltens innerhalb einer Klappe werden zusätzlich mit Hilfe von CFD-Simulationen durchgeführt. Der Fokus hierbei liegt auf der Erstellung geeigneter Geometrien einer natürlichen Herzklappe (siehe Kapitel 6.3). Durch die Simulation lassen sich sowohl die Versuchsanzahl als auch eine potentielle Kalzifizierung und deren Auswirkung auf das Klappenverhalten darstellen. Zum Einen soll das theoretische Bewegungsverhalten einer Herzklappe bei Forcierung der Herzklappe aufgrund des strömenden Blutes erörtert werden. Zum Anderen wird das Öffnungsverhalten der Herzklappe nur aufgrund der herrschenden Druckunterschiede untersucht. Ein letztes theoretisches Modell beschreibt die Auswirkung einer kalzifizierten Herzklappe auf die Spannungsverteilung innerhalb der Herzklappentaschen.

3 Physiologische Grundlagen

3.1 Herzklappen in vivo

Das Herz besitzt vier Herzklappen, die für einen gerichteten und pulsatilen Blutfluss im Körper sorgen [16, 17]. Sie wirken als Rückschlagventile, die den Durchgang des Blutes entgegen der gewünschten Strömungsrichtung sperren [18]. Es wird zwischen Segel- und Taschenklappen unterschieden. Die Segelklappen, auch Einlassventile genannt, befinden sich zwischen Vorhof (Atrium) und Kammer (Ventrikel). In der rechten Herzhälfte befindet sich die Trikuspidalklappe, in der linken Herzhälfte die Bikuspidalklappe (siehe Abbildung 3.1).

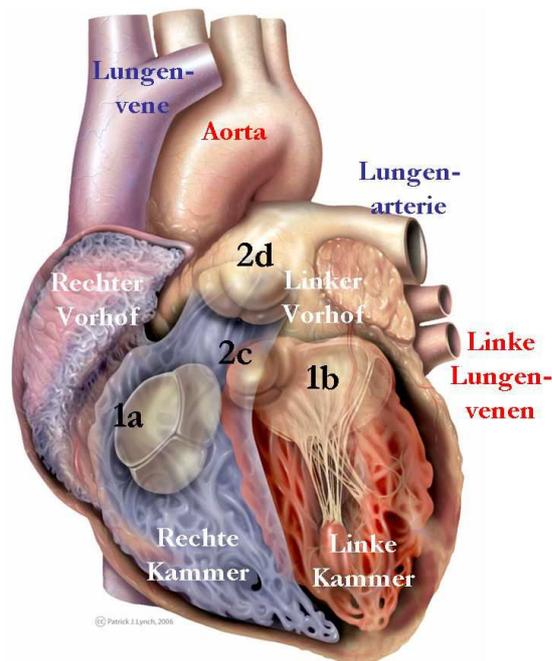


Abbildung 3.1: Schnittansicht des humanen Herzens. (1) Einlassventile mit (a) Trikuspidalklappe und (b) Mitralklappe (auch Bikuspidalklappe genannt) und (2) Auslassventile mit (c) Aortenklappe und (d) Pulmonalklappe. Dargestellt sind auch die Kammern, Vorhöfe und großen Gefäße [19].

Die zwei Auslassventile des Herzens sind die Taschenklappen Aorten- bzw. Pulmonalklappe. Sie befinden sich am Übergang zwischen den Ventrikeln und der Aorta bzw. der Pulmonalarterie. Das Öffnen und Schließen der Klappen ist unabhängig von jeglicher Muskelarbeit. Die treibende Kraft ist die Druckdifferenz zwischen Ventrikeln und Blutgefäßen. Diese Druckdifferenz führt zur Klappenöffnung und -schließung. Das vollständige Anlegen der Taschen an die Gefäßwand wird sowohl durch eine Wirbelbildung zwischen Klappe und Sinus verhindert sowie durch den Bernoulli-Effekt, bei dem ein Unterdruck entsteht, weil das Blut an der Klappe in hoher Geschwindigkeit vorbeiströmt. Die Klappen bleiben in mittlerer Stellung geöffnet und können somit schneller schließen. Dadurch wird zusätzlich ein diastolischer Rückfluss verhindert [16, 17, 20].

Morphologie der Aortenklappe

Gesunde Aortenklappen bestehen aus drei halbmondförmigen Taschen, die durch ihre Befestigung einen Aortenring bilden. Dieser Aortenring trennt die Aorta vom linken Ventrikel. Über diesem Aortenring befindet sich der sogenannte Aortenbauch bzw. -sinus, der drei Ausbuchtungen aufweist. Im Sinus der Aortenklappe entspringen die Herzkranzgefäße, die das Herz mit Blut versorgen. Der sogenannte Nodus sorgt für eine vollständige Dichtung der geschlossenen Aortenklappe. Die Herzklappe ist beidseits mit Endothelzellen auf einer Basalmembran beschichtet, darunter folgt auf der Einflusseite die sogenannte Ventricularis, auf der Ausflusseite die Fibrosa. Die Ventricularis ist reich an lockeren, kollagenhaltigen Fasern, während die Fibrosa straffe Fasern aufweist. Die Kollagenfasern entspringen aus den Kommissuren (Verbindung zwischen Tasche und Aortenwand) und verlaufen in Umfangsrichtung. Diese beiden Schichten sind durch die Spongiosa getrennt. An den Kommissuren der Klappe ist die Tasche sehr breit, zur Mitte hingegen wird sie dünner. Die Aortenklappe wird zu ca. 30 % durch den Herzmuskel gestützt [21, 22]. Diese faserverstärkte Zusammensetzung führt zu einem charakteristischen Spannungs-Dehnungs-Diagramm, das qualitativ in Abbildung 3.2(a) dargestellt ist. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aortenklappe ein nicht-lineares Verhalten aufweist. Der E-Modul steigt mit zunehmender Dehnung an. Der Grund dafür liegt darin, dass während niedriger Belastungen (z. B. Öffnungs- und Schließphase) der Einfluss der Elastinfasern die Mechanik der Aortenklappe bestimmt. Für höhere Belastungen (z. B. stärkste Öffnung oder Diastole) dominieren die Kollagenfasern das Materialverhalten und führen sozusagen zu einer „Versteifung des Materials“ [23].

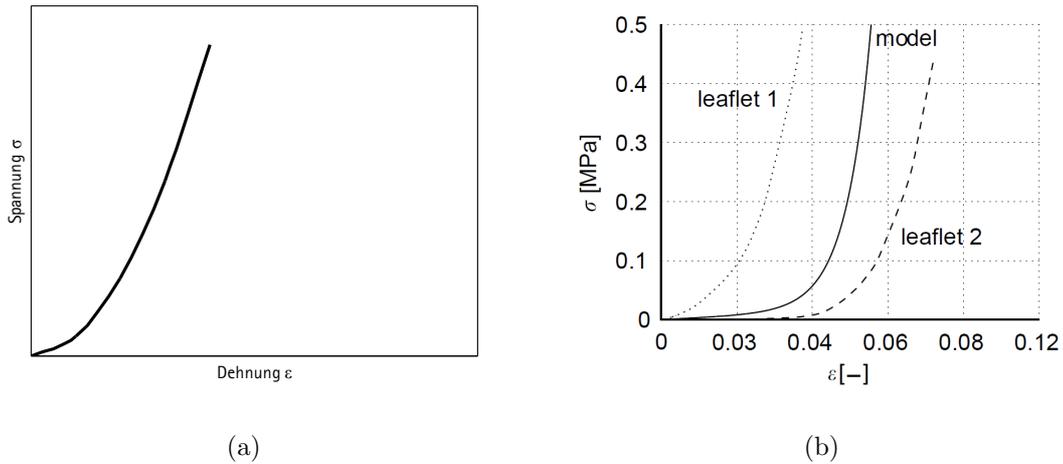


Abbildung 3.2: (a) Qualitatives Spannungs-Dehnungs-Diagramm einer Herzklappentasche mit nicht-linearem Verlauf. (b) Spannungs-Dehnungs-Diagramm mehrerer Taschen ermittelt aus Messungen (zwei Graphen aus Messungen und ein daraus generiertes Modell für die Simulation) [23].

In Abbildung 3.2(b) ist ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm dargestellt, das von Hart et al. [23] mit Hilfe von Messungen erstellt wurde. Neben den nicht-linearen Verläufen zweier unterschiedlicher Proben (Belastung in Umfangsrichtung) wird der Verlauf für eine Tasche dargestellt, dessen Eigenschaften beispielsweise für eine Simulation modelliert werden können. Anhand der beiden unterschiedlichen realen Graphen ist deutlich zu erkennen, dass es zu Abweichungen zwischen den Verläufen kommt. Diese Schwankungen resultieren daraus, dass biologisches Material verwendet wird, dessen Eigenschaften von vielen Faktoren abhängen (z. B. Alter, Größe, Gesundheitszustand des Spenders). Die Klappentaschen weisen neben dem nicht-linearen Verhalten eine Anisotropie auf. Für die verschiedenen Belastungsrichtungen zeigt die Aortenklappe daher unterschiedliches mechanisches Verhalten. Wird die Dicke der Aortenklappe betrachtet, so lässt sich festhalten, dass diese keinen konstanten Wert aufweist. Zusätzlich besteht eine Asymmetrie zwischen den Klappentaschen, die sich in einer unterschiedlichen Verteilung der Dicke niederschlägt. Große Abweichungen bestehen dabei zwischen der Tasche, die zur Herzkammerscheidewand gelegen ist, und den beiden anderen Taschen (linke und rechte), in deren zugehörigen Sinus die Herzkranzgefäße entspringen. In Tabelle 3.1 sind beispielhaft die Werte aufgeführt, die von Nicosia et al. [24] für die Aortengeometrie gewählt werden. In Abbildung 3.3 werden die aufgeführten Klappenregionen dargestellt. Anhand der Daten ist deutlich zu erkennen, dass sich der oben beschriebene Unterschied zwischen den Taschen besonders am Aortenring sowie am Nodulus zeigt.

Klappenregion	Dicke der Taschen [mm]	
	links, rechts	zur Herzkammerscheidewand gelegen
Aortenring	1,16	0,155
Sinus (Bauch)	0,18 – 0,58	0,18 – 0,58
Freier Rand	1,53	1,96
Nodulus	2,06	2,75

Tabelle 3.1: Verteilung der Dicke für die drei Taschen einer humanen Aortenklappe [24]. Die Daten der unterschiedlichen Verteilung der Dicke innerhalb einer Klappe wurden aus Magnetresonanztomographie-(MRT)-Daten ermittelt.

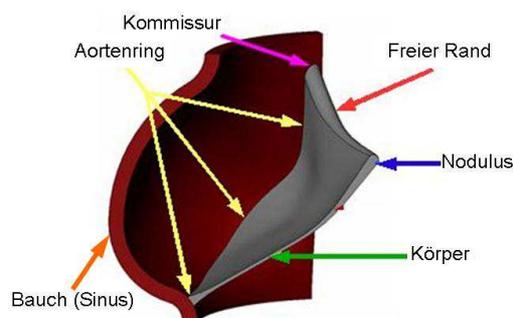


Abbildung 3.3: Darstellung der in Tabelle 3.1 betrachteten Aortenregionen (aus MRT-Daten gewonnen und grafisch vereinfacht) [25]. Es sind vier unterschiedliche Bereiche definiert: der Aortenring, der die Taschen einrahmt, der freie Rand, an dem die Taschen im geschlossenen Zustand anliegen, der Sinus (Bauch) und der Nodulus, eine Art Knötchen am freien Rand. Es lässt sich eine unterschiedliche Verteilung der Dicke der Tasche erkennen. Von der Mitte der Tasche zum freien Rand bzw. zum Aortenring nimmt die Dicke jeweils zu.

Klappendynamik

Zu Beginn der Systole beginnt sich die Aortenklappe als eine Reaktion auf die Kontraktion des linken Ventrikels zu öffnen. Das durchströmende Blut beschleunigt und erreicht nach ca. 0,08 s Systolendauer eine Spitzengeschwindigkeit von $1,35 \pm 0,35$ m/s [26]. Die Klappe ist nun vollständig geöffnet. Es folgt ein Abbremsen des Blutes. Das dadurch entstehende Druckgefälle beeinflusst die Flüssigkeitsdynamik an der Wand der Aorta so stark, dass es zu einem Rückfluss des Blutes in den Sinus kommt. Die Druckdifferenz, die dazu nötig ist,

die Klappe zu öffnen und das Blut durchfließen zu lassen, liegt bei wenigen mmHg, obwohl die diastolische Druckdifferenz (minimaler Ventrikeldruck zu diastolischem Aortendruck) üblicherweise 80 mmHg erreicht. Die Klappe schließt sich, sobald die Diastole einsetzt und der Ventrikel sich entspannt. Während des Herzzyklus dehnt sich die Klappe entlang der vertikalen Achse aus. Es kann zu einer Erweiterung der Öffnungsfläche von 20 % kommen [27]. Während der Systole entstehen Wirbel in den Sinus, die zusätzlich für eine schnelle Schließung der Klappe sorgen. Dadurch entsteht ein Rückflussvolumen von lediglich $< 5\%$ [28].

Herzklappenerkrankungen

Es wird zwischen angeborenen und im Laufe des Lebens erworbenen Funktionsstörungen der Herzklappen, wie z. B. einer häufig auftretenden Endokarditis, unterschieden. Eine Endokarditis kann zu einer Endzündung des Klappengewebes und dessen Zerstörung führen. Auch Ablagerungen, die im Alterungsprozess auftreten können, schränken die Flexibilität und damit die Funktion der Herzklappen ein [29–31]. Stenose (Verengung) und Insuffizienz (unvollständiges Schließen) der Klappe sind die häufigsten Ursachen für einen Herzklappendefekt. Der Öffnungsquerschnitt verringert sich und das adäquate Öffnen und/oder Schließen der Klappe ist nicht mehr möglich. Dies bewirkt einen Rückfluss des Blutes in die Kammer. Stenose und Insuffizienz treten häufig gleichzeitig als kombiniertes Vitium auf. Diese Funktionsstörungen können grundsätzlich jede der vier Herzklappen betreffen. Allerdings sind die Klappen der linken Herzhälfte aufgrund des höheren Druckes des Körperkreislaufes deutlich häufiger betroffen als die der rechten Herzhälfte [32]. Eine Herzklappenstenose oder -insuffizienz medikamentös zu behandeln, ist nur möglich, wenn eine Entzündung (z. B. Endokarditis) vorhanden ist. Oft ist eine Operation und damit ein vollständiger Austausch der betroffenen Klappe durch eine mechanische bzw. biologische Herzklappe oder durch ein Homograft die einzige Behandlungsoption [30, 33].

3.2 Herzklappenersatz

1990 wurden deutschlandweit über 7 000 Herzklappenoperationen durchgeführt, 2010 waren es bereits über 25 000 [34, 35]. Es stehen verschiedene Prothesenarten für einen künstlichen Herzklappenersatz zur Verfügung, sowohl biologischen als auch mechanischen Ursprungs. Heutzutage werden weit häufiger Bioprothesen eingesetzt [36, 37]. Ihr Anteil beträgt mittlerweile 70 % [35]. Sie werden schon seit den 70er Jahren implantiert. Je nach ihrer Herkunft wird zwischen Homograft und Xenograft unterschieden.

Homografts

Homografts stammen von verstorbenen Spendern oder von Spendern nach einer Herztransplantation. Die Transplantate werden chirurgisch entfernt, mit Antibiotika behandelt und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Auf diese Art können sie über viele Jahre gelagert werden [38]. Bei Homografts treten thromboembolische Ereignisse oder Blutungskomplikationen nicht auf [36]. Sie sind jedoch nur begrenzt verfügbar. 2005 wurden in Deutschland 55 Herzklappenoperationen mit Homografts durchgeführt [39], 2010 standen 106 zur Verfügung, von denen jedoch lediglich 36 transplantiert werden konnten [4].



Abbildung 3.4: Homografts menschlicher Spender. (a) Aortenhomograft (Klappe und Konduit dargestellt). (b) Mitralklappe, die je nach Bedarf ebenfalls als Homograft implantiert wird [40].

Xenografts

Xenografts bzw. Bioprothesen werden fremden Spezies entnommen [37]. Es können entweder komplette Aortenklappen von Schweinen (porcin) verwendet oder aus geeignetem Gewebe, z. B. dem Rinderperikard (bovin), biologische Herzklappenprothesen hergestellt werden [15]. Zum Einsatz kommen sowohl ungestentete, die nur aus Gewebe bestehen (siehe Abbildung 3.5(a)), als auch gestentete Herzklappenprothesen (siehe Abbildung 3.5(b)). Laut Bakhtyary et al. eignen sich bovine Herzklappenprothesen für aktive Patienten, da die systolische Funktion optimaler ausgeführt wird, während die porcinen Prothesen bessere Klappenschlusszeiten aufweisen [41]. Biologische Herzklappenprothesen zeichnen sich durch optimale Strömungseigenschaften aus. Dadurch kommt es nicht zu einer erhöhten Blutschädigung, was die Einnahme von gerinnungshemmenden Medikamenten nur in vergleichsweise niedriger Dosierung oder nur kurzfristig nötig macht [37]. Sie werden che-

misch behandelt, um die körperfremden Zellen abzutöten und damit eine antigene Reaktion zu verhindern. Dies wird mit einer 0,6 %igen bzw. 0,2 %igen Glutaraldehydlösung (GA) durchgeführt (Fixierung mit 0,6 % GA, Konservierung mit 0,2 % GA). Bei der Fixation bilden die Kollagenfasern Quervernetzungen. Der Anteil an Kollagen innerhalb einer Herzklappe beträgt ca. 50 - 70 %. Durch die Fixierung wird die Kollagenmatrix der Herzklappen vernetzt, stabilisiert und haltbar gemacht. Die Vernetzung reduziert außerdem die antigene Wirkung des körperfremden Materials. Glutaraldehyd ist bei der Fixierung von Herzklappenprothesen die am häufigsten eingesetzte Lösung [42]. Aldehyde und Aminogruppen sind hierbei beteiligt. Diese Art von Fixierung wird auch für die Kalzifizierungsneigung einer Herzklappenprothese verantwortlich gemacht.

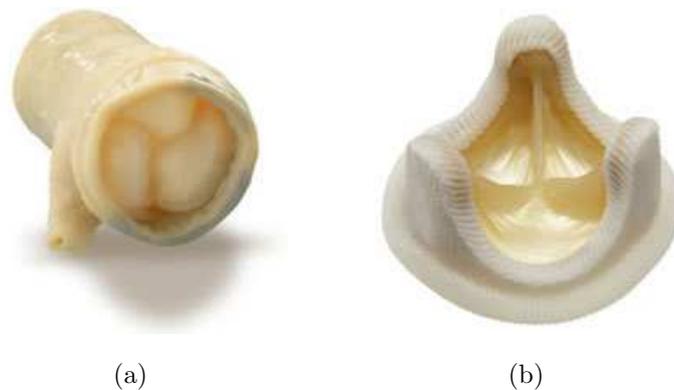


Abbildung 3.5: Xenografts porcinen Ursprungs. (a) Ungestentete biologische Herzklappenprothese. Die Klappe wird komplett implantiert. (b) Gestentete biologische Herzklappenprothese. Die Klappe ist auf einem Gerüst fixiert und wird mittels des Gerüststrings an die betroffene Stelle genäht [23].

Kathetergestützte Herzklappen

Neuere Entwicklungen haben zu einer minimalinvasiven Form des Herzklappenersatzes geführt. Dabei handelt es sich um eine kathetergestützt eingesetzte biologische Herzklappe, die in einem Stent befestigt ist. Dieser Stent sitzt zusammengefaltet auf einem Ballonkatheter. Der Ballon wird aufgeblasen und der Stent entfaltet die Herzklappe. Das Entfernen der erkrankten Klappe ist nicht nötig, da der Stent die erkrankte Klappe an die Aortenwand drückt. Diese Methode ist für Patienten mit einem hohen operativen Risiko am besten geeignet [43]. 2010 wurden über 3 600 kathetergestützt eingesetzte Herzklappen implantiert [35]. In Abbildung 3.6 ist eine solche Herzklappenprothese dargestellt. Auch bei diesen Herzklappen kann von einer vorzeitigen Kalzifizierung ausgegangen werden, da das Klappengewebe mittels Glutaraldehyd chemisch fixiert wird.



Abbildung 3.6: Kathetergestützt eingesetzte Herzklappe. Die Klappe ist auf einen Stent aufgebracht, der zusammengefaltet entweder transapikal (durch die Herzspitze) oder transfemorale (durch die Oberschenkelarterie) in die Aorta eingeführt wird [44].

Tissue Engineerte Herzklappen

Zur Herstellung von Tissue Engineerten Herzklappen wird dem Patienten körpereigenes Gewebe entnommen und dessen Zellen isoliert. Diese Zellen werden nach ihrer Kultivierung zur Vermehrung auf eine Matrix ausgesiedelt. Innerhalb eines Bioreaktors, wo mechanische Reize auf das Konstrukt ausgeübt werden und eine ausreichende Nähr- und Sauerstoffversorgung sichergestellt ist, siedeln sich die Zellen an. Nach erfolgreicher Kultivierung kann diese Herzklappe implantiert werden. Abstoßungsreaktionen sind aufgrund der Autologie der Zellen ausgeschlossen. Die Züchtung und Kultivierung wird in speziell dafür ausgelegten Bioreaktoren durchgeführt. Temperatur, Kohlenstoffdioxid- und Sauerstoffzufuhr, pH-Wert sowie Nährstoffkonzentration werden kontrolliert, um optimale Bedingungen zu ermöglichen.

3.3 Kalzifizierung

Löslichkeitsprodukt

Das Löslichkeitsprodukt beschreibt die Ionenkonzentration einer gesättigten Lösung. Bei überhöhtem Löslichkeitsprodukt kommt es zur Ausfällung des Salzes und zu dessen Ablagerung. Zur Bestimmung des Löslichkeitsproduktes wird das in der Medizin übliche Löslichkeitsprodukt nach folgender Formel berechnet. Es setzt sich aus den Gesamtkonzentrationen von Ca- und PO₄-Ionen zusammen.

$$L = [\text{Ca}^{2+}][\text{PO}_4^{3-}] \quad (3.1)$$

[Ca²⁺]: Ca-Ionen-Konzentration in mmol/l oder mg/dl

[PO₄³⁻]: PO₄-Ionen-Konzentration in mmol/l oder mg/dl

Bei der Gesamtkonzentration sind nur die frei in Lösung befindlichen Ionen von Bedeutung. Im Blutplasma liegen ca. 55 % (1,1 – 1,65 mmol/l) gelöste Calciumionen vor. Die Gesamtkonzentration beträgt demnach 2 – 3 mmol/l. Blut ist metastabil hinsichtlich Hydroxylapatit. Bei Anwesenheit von Kristallisationskeimen entstehen dort weitere Agglomerationen und es bilden sich Ablagerungen. Zusätzlich ist das Löslichkeitsprodukt L abhängig vom pH-Wert und der Temperatur der Lösung bzw. des Blutplasmas. Mit steigender Temperatur und mit steigendem pH-Wert nimmt es monoton ab [45]. Nach Schmidt et al. liegt im Blut ein Löslichkeitsprodukt von 18,84 – 56,52 (mg/dl)² vor [46]. In experimentellen Versuchen wurde ein Löslichkeitsprodukt von 15 (mg/dl)² berechnet [47], was bestätigt, dass eine Kalzifizierung bei implantierten Bioprothesen stattfinden kann [48].

Physiologische Kalzifizierung

Die physiologische Kalzifizierung tritt ausschließlich innerhalb des Knochens auf. Sie ist ein aktiver, energieerforderner Prozess. Dabei lagern sich unlösliche Calciumsalze im Gewebe ab, die letztendlich den Knochenaufbau bewirken. In die Proteinmatrix des Knochens lagern sich Mineralien an, die eine wichtige Rolle im Calcium- und Phosphatstoffwechsel spielen. Laut Buddeke werden permanent ca. 0,3 % der Mineralien mit denen im Blut vorhandenen ausgetauscht [49]. Mehrere Prozesse beeinflussen eine Mineralisierung. Nicht nur eine lokale Erhöhung von PO₄³⁻-Ionen und eine pH-Wertänderung, sondern die Adsorption von Ca²⁺-Ionen haben Einfluss auf den Kalzifizierungsprozess. Damit Knochen gebildet wird, muss das Löslichkeitsprodukt überschritten werden. Dies geschieht, indem Phosphat aus organischen Bindungen gelöst und dadurch das Löslichkeitsprodukt überschritten

wird. Da der Körper einen Gleichgewichtszustand anstrebt, wird Calciumphosphat als eine Reaktion auf die Ausfällung freigesetzt. Eine pH-Werterhöhung begünstigt die Calciumphosphatablagerung durch die pH-Wertabhängigkeit des Löslichkeitsprodukts [49].

Pathologische Kalzifizierung

Die pathologische Kalzifizierung ist ein krankhafter Prozess. Sie wird in metastatische und dystrophische Kalzifizierung unterteilt. Bei der metastatischen Kalzifizierung ist der Calcium- und Phosphatspiegel systemisch erhöht. Dies bewirkt eine Erhöhung des Löslichkeitsproduktes und führt somit zu einer Ablagerung von Salzen im normalen Gewebe. Die metastatische Kalzifizierung spielt bei der Herzklappenprothesenkalzifizierung eine untergeordnete Rolle.

Bioprothesen kalzifizieren dystrophisch. Dabei treten Calciumphosphatablagerung meist als eine Reaktion auf Gewebeerkrankungen und ohne das Vorliegen eines systemisch erhöhten Gehalts an Calcium- oder Phosphationen auf. Dies ist die Hauptursache für das Versagen einer biologischen Herzklappenprothese [50].

Kalzifizierung von Herzklappenbioprothesen

Beim mineralischen Anteil der Ablagerungen in und an Bioprothesen handelt es sich um verschiedene Formen von Calciumphosphat. Unterschiedliche Studien belegen, dass es sich dabei unter anderem um Dicalciumphosphat-Dihydrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCP), Octacalciumphosphat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, OCP) oder Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, HA [51–55]) handelt. DCP und OCP gelten wegen ihrer geringeren thermischen Stabilität als Vorläufer für stabilere Mineralisationsformen wie HA [56, 57].

Die Mechanismen, die zur Kalzifizierung biologischer Implantate führen, sind noch nicht endgültig geklärt. Als mögliche Auslöser werden die Fixierung des Gewebes mit Glutaraldehyd, die Zusammensetzung der organischen Matrix, die mechanische Belastung sowie der Einfluss von Zellschäden genannt [58, 59]. Für die Entstehung unerwünschter Kalzifizierungsvorgänge an Bioprothesen wurden verschiedene Thesen aufgestellt und Einflussmöglichkeiten diskutiert. Untersuchungen von Schoen et al. ergaben, dass an mechanisch stark beanspruchten Bereichen eine erhöhte Kalzifizierung auftritt. Mechanische Belastungen können unterschiedlichen Ursprungs sein. Hierbei ist der Fertigungsprozess neben der Fixation des biologischen Gewebes an der Prothese von Bedeutung. Es wird vermutet, dass durch die mechanische Beanspruchung Risse in der Tasche und im Klap-pengewebe entstehen, wo sich bevorzugt Kristallisationskeime anlagern [60–64]. Der Grad der Kalzifizierung hängt von Faktoren wie z. B. der Bauart und dem biologischen Material

der Klappen ab. Gerüstlose Herzklappen kalzifizieren weniger als gestützte [65], bovine schneller und stärker als porcine [31, 66, 67]. Herzklappen bestehen aus 50 bis 70 % Kollagen sowie Zellen, welche sehr stark zur Degeneration neigen. Um eine Degeneration zu verhindern, werden die Herzklappen meist mit Glutaraldehyd fixiert. Durch die Fixation mit Glutaraldehyd wird ein hoher Grad an Quervernetzung erreicht [68]. Die Klappe weist eine höhere Stabilität auf, Nähte können angebracht werden und die hämodynamischen Eigenschaften sind dem der nativen Klappe ähnlich. Nachteilig ist jedoch die durch die Fixierung entstandene Kalzifizierungsneigung der Klappe. Der Grad einer Kalzifizierung wurde zwar mit unterschiedlichen Methoden reduziert. Das Problem wurde jedoch noch nicht endgültig gelöst [15, 58, 69, 70].

4 Stand der Forschung und Technik zur Herzklappenkalzifizierung

4.1 Bioreaktoren am Institut für Mehrphasenprozesse

Am Institut für Mehrphasenprozesse werden verschiedene Reaktoren zur Kalzifizierungsuntersuchung eingesetzt. Aufgrund seiner Verifikation wird der sogenannte Fatigue Accelerated Calcification Tester (FACT) schon seit vielen Jahren für Versuche mit biologischen Herzklappenprothesen benutzt (siehe Abbildung 4.1 a und b) [15, 63, 71, 72]. Eine Taumelscheibe wird durch einen Elektromotor bewegt. Auf der Scheibe befinden sich zwölf voneinander getrennte Kompartments mit jeweils einer Herzklappe. Durch die Taumelbewegung wird ein Kalzifizierungsfluid mit einer physiologischen Druckdifferenz (Differenz des minimalen Ventrikeldrucks zu diastolischem Aortendruck) von $\Delta p = 90$ mmHg und einer Schlagfrequenz von 5 Hz (300 Umin^{-1}) durch die Herzklappe befördert. Die 5fach erhöhte Schlagfrequenz und das Kalzifizierungsfluid bewirken eine beschleunigte Kalzifizierung. Herzklappen nach 5 Monaten Testdauer weisen eine Degeneration und Kalzifizierung auf, die einer natürlich kalzifizierten Klappe nach über 2 Jahren ähneln. Dieses Verfahren hat sich seit vielen Jahren bewährt. Als Kalzifizierungsfluid dient das Simulated Body Fluid (SBF [73]). Es wurde erstmalig am Institut für Mehrphasenprozesse erfolgreich als Kalzifizierungsfluid eingesetzt. Es wird generell für die Knochenkalzifizierung benutzt [74] (Zusammensetzung siehe A.3). Das in dieser Arbeit verwendete Fluid entsprach dem 1.5 Simulated Body Fluid (1.5SBF) und hat eine Calciumkonzentration von 3,8 mmol/l und eine Phosphatkonzentration von 1,5 mmol/l. Diese erhöhten Calcium- und Phosphatkonzentrationen bewirken eine beschleunigte Kalzifizierung. Bei einer weiteren Erhöhung dieser Konzentrationen fällt die Lösung aus und wird somit als Kalzifizierungsfluid unbrauchbar.



(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 4.1: (a) Fatigue Accelerated Calcification Tester (FACT) zur beschleunigten in vitro Kalzifizierung biologischer Herzklappenprothesen, (b) Detailfoto eines Kompartments. (c) Solo-Herzklappentester zur Beurteilung der Bewegung der Herzklappentaschen (technische Zeichnung), (d) Fotoaufnahme des Solo-Herzklappentesters mit integrierter Herzklappe.

Ein weiterer Reaktor zur Untersuchung von Bioprothesen ist der sogenannte Solo-Herzklappentester (siehe Abbildung 4.1 c und d). Hier wird eine Herzklappe semi physiologisch in einem einzelnen Kompartiment kalzifiziert. Die Konstruktion wurde so gewählt, dass die Beobachtung der Öffnungsbewegung der Herzklappe in jedem Kalzifizierungszustand im Fokus der Auswertung steht. Ein Elektromagnet unterhalb des Kompartiments lenkt eine Membran aus, die Fluid durch die Herzklappe befördert. Ein Bypass sorgt für das richtige Rückflussvolumen und die somit physiologische Druckdifferenz von $\Delta p = 90 \text{ mmHg}$ für Aortenklappen. Die Bewegung der Herzklappe kann von oben mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen werden.

In abgewandelter Form wird der Solo-Herzklappentester auch in Kapitel 6.2 für die Strömungsuntersuchungen mittels der Particle Image Velocimetry benutzt. Es handelt sich hierbei um einen Quader mit einer zylindrischen Bohrung für die Platzierung der Herzklappe. Die quadratische Form bewirkt, dass der Laserstrahl den Quader ebenmäßig durchleuchten kann, ohne durch runde Flächen abgelenkt zu werden (siehe Abbildung 4.2).



Abbildung 4.2: Kompartiment für die PIV-Aufnahmen. Das Fluid wird durch eine Membran, die mit einem Permanentmagneten verbunden ist, ausgelenkt, sodass Fluid durch die Herzklappe gepumpt wird. Auf der rechten Seite des Silikonschlauchs ist eine Drossel angebracht, um die richtige Druckdifferenz einstellen zu können (auf dem Bild als Einschnürung im Schlauch ohne Drossel zu erkennen).

4.2 In vivo Aortenklappenkalzifizierung

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Risikofaktoren der Aortenklappenkalzifizierung wie Hypertonie, erhöhter Body-Mass-Index, erhöhtes LDL-Cholesterol, Geschlecht, Alter, Rauchen oder Diabetis mellitus benannt [75–80].

Palta et al. haben herausgefunden, dass bei Patienten mit Aortenklappenstenose (AS) ein erhöhter Serumcholesterin-, Kreatinin- und Calciumspiegel sowie gegenwärtiges Rauchen eine Reduktion der Aortenklappenfläche beschleunigt [77]. Apolipoproteine B und E liegen nach O'Brien et al. sowohl bei früher als auch fortgeschrittener Aortenklappenverletzung, jedoch nicht in normaler Klappenumgebung vor [81]. In einer post-mortem Studie eines verstorbenen Jungen mit vererbter Hypercholesterolämie wurde der Verdacht geäußert, dass ein pathologisches Krankheitsbild in einem solchen Fall den Mechanismus der Aortenklappenerkrankung fördert [82]. Es wurde ein erhöhtes Risiko einer Aortenklappenstenose zwischen erhöhtem Level an Lipoprotein(a) (Lp(a)) und Lipoprotein Cholesterol (LDL) niedriger Dichte festgestellt [75]. Darüber hinaus stellten Cairra et al. [83] die These auf, dass auch bestimmte Mechanismen der Signaltransduktion bei einer Herzklappenkalzifizierung aktiviert werden. Sie wiesen das LDL-Rezeptor-bezogene Protein 5 (Lrp5), Osteocalcin und andere Knochenmarker in kalzifizierten Aortenklappen nach. Bei Hypercholesterinämie wird die Lrp5-Bahn in mesenchymalen Myofibroblastenzellen innerhalb einer Klappe aktiviert, indem sie diese in knochenproduzierende Phänotypen umwandelt. Diese phänotypische Umwandlung erfolgt durch die Bindung von Lrp5 an das Glykoprotein Wnt, das wiederum b-Catenin aktiviert, um die Bildung von Knochen zu induzieren [83].

Andere Studien haben gezeigt, dass Klappen von hypercholesterolämischen Kaninchen eine erhöhte Apoptose in ihrer artherosklerotischen Schicht aufweisen, was wiederum dafür spricht, dass die Apoptose für die Entstehung der Herzklappenkalzifizierung mit verantwortlich ist [84]. Bei Schweinebioprothesen wurde der Einfluss präexistenter Lipide auf ihr Kalzifizierungsverhalten untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass Lipide eine Kalzifizierung beeinflussen [85]. Die Bildung erster Ablagerungen in Form von Hydroxylapatit sind in den Bereichen von Lipidablagerungen, besonders bei oxidierten Lipiden, beobachtet worden [81, 86]. Diese Ablagerungen enthalten Tenascin C [87], ein Glykoprotein, welches im Knochen zu finden ist. In den Bereichen, wo eine Kalzifizierung entsteht, wurden vermehrt oxidierte Lipide festgestellt [88]. Hierbei haben Studien gezeigt, dass oxidiertes Cholesterol zu Kalzifizierungsablagerungen durch Klappenfibroblasten führt [89]. In derselben Studie wurde eine Kalzifizierungsbildung durch die Zugabe von Statinen reduziert [90]. Eine weitere Studie hat gezeigt, dass bei der endothelialen

Dysfunktion oxidative Belastung sowie Entzündungen die Pathogenese von cholesterinierter AS beeinflussen. Diese Studie verfolgte den Effekt von Atorvastatin auf endothelialer Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS), Nitritkonzentration des Serums und Kalzifizierung der Aortenklappe. Es konnte gezeigt werden, dass die Nitritkonzentration niedriger und die Serumkonzentration der entzündungsmarkierenden hochsensiblen C-reaktiven Proteine höher ausfielen als bei Kaninchen mit erhöhter cholesterinhaltiger Diät. Bei diesen Tieren wurde eine Knochenmineralisierung der Aortenklappe festgestellt. Atorvastatin reduzierte die oxidative Belastung, nachgewiesen durch die höhere Nitritserumkonzentration [91]. Um den Einfluss eines Statins auf die Kalzifizierung zu erörtern, wurden Versuche mit Kaninchen durchgeführt, denen unterschiedliche Diäten (normale, cholesterinhaltige und cholesterinhaltige atorvastatine Diät) verabreicht wurden. Es stellte sich heraus, dass bei der cholesterinhaltigen Diät Knochenbildung in kalzifizierten Klappen entstand. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der Lrp5-Rezeptoren, des Osteopontins und dem Indikator der zellulären Proliferation p42/44. Bei der Gruppe mit atorvastatinreicher Diät konnte eine Reduktion der genannten Proteine festgestellt werden. Das würde bedeuten, dass hypercholesterolämische Aortenklappenkalzifizierung von der Aktivierung von Lrp5/b-catenin Signaltransduktionsmechanismen geleitet wird [92]. Statine sind bekannt dafür, entzündungshemmend und lipidreduzierend zu wirken. Sie senken den Serumspiegel von C-reaktivem Protein unabhängig von einer LDL-Reduktion [93]. Eine Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen von Endothelzellen und Makrophagen konnte durch den Einsatz von Statinen erzielt werden [94, 95]. Vergangene klinische Studien stellten einen Rückgang der Aortenklappenstenose bei Patienten fest, denen Statine als Therapie gegeben wurden [96–98]. Der Mechanismus, über den Statine wirken, beruht auf der kompetitiven Hemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (es wird weniger Fett produziert) sowie auf der Hemmung von Apoptose und der Wiederherstellung des Wachstum spezifischen Gen 6 (Gas6)/Axl Signalweges.

Eine weitere Theorie in der Kalzifizierung ist, dass spezielle Signalmechanismen involviert sind. Wird von der Beteiligung von chronischer Entzündung, entzündlicher Zytokine, oxidierten Lipide und RANKL in Läsionen ausgegangen, stellt die NF- κ B Aktivierung einen wichtigen Schritt im Kalzifizierungsprozess dar. Entzündliche Zytokine, oxidative Belastung und Angiotensin II regulieren NF- κ B hoch. Das erfolgt durch den Mitogen aktivierten Protein (MAP) Kinasesignalweg.

Kalzifizierung hervorrufende Faktoren wie oxidierte Lipide [86, 89], TNF- α [99] und Hyperglykämie [76, 100, 101] beruhen alle auf BMP2. Dieses Protein ist im menschlichen Körper bei Herzklappenläsionen zu finden und ein Kalzifizierungsstimulus bei in-vitro

Versuchen [102]. In sowohl minimal als auch schwer kalzifizierten Aortenklappen konnte Osteopontin nachgewiesen werden. Osteopontin ist ein Protein, welches in Knochenmatrizen die Ablagerung von Calcium reguliert [103].

Auch andere Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte Transkription von Genen für Osteopontin, Knochen Sialoprotein, Osteocalcin, knochenspezifischer Transkriptionsfaktor Cbfa1 und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in kalzifizierten Klappen zu finden ist [104]. Osteopontin [81, 103], knochenmorphogene Proteine (BMP2 und BMP4) [102] und Rezeptoraktivator des nukleären Faktors NF- κ B Liganten (RANKL) wurden in kalzifiziertem Gewebe gefunden [105]. Osteopontin scheint eine bedeutendere protektive Rolle bei der Kalzifizierung zu haben, wie durchgeführte Versuche gezeigt haben. Dort wurden glutaraldehydfixierte Klappen subkutan Mäusen eingesetzt, denen es an Osteopontin mangelte. Die Kalzifizierung der Klappen war schlagartig erhöht. Osteopontin ist somit unter Umständen für den Abbau von Hydroxylapatit zuständig [106]. Osteoprotegerin (OPG) verhindert den Mineralabbau in Knochen sowie eine Bindung von RANK zu RANKL. RANK ist in gesunden Herzklappen zu finden, jedoch in geringerer Form in Herzklappenläsionen [105]. Ein osteogener (inklusive des Transkriptionsfaktor Msx2, der Wnt aktiviert) und ein chondro-osteogener Signalweg werden durch BMP2 hochreguliert. Msx2-überexprimierte Mäuse wiesen erhöhte Kalzifizierung auf. Es wurde festgestellt, dass dieses aufgrund der Wnt-Aktivierung ausgelöst wurde [83, 107].

Die primäre Stimulation für eine Kalzifizierung scheint aus einer Kombination von mechanischer Belastung und Entzündung der Klappe zu resultieren. Diese Klappen weisen zunächst aufgrund der Endothelverletzung ein Eindringen von Makrophagen und T-Zellen auf. BMP2 und BMP4 werden daraufhin durch Myofibroblasten und Preosteoblasten neben lymphatischen Infiltraten exprimiert [102]. Herzklappen exprimieren Marker der osteoblastischen Differenzierung wie Cbfa1 und Osteocalcin [104].

Genetische Faktoren sollen jedoch auch eine Rolle bei der Pathogenese der Aortenklappenkalzifizierung spielen. Ein spezielles Vitamin-D-Rezeptor- sowie das Apolipoprotein E4-Allel wurden mit erhöhter Häufigkeit bei Patienten mit Aortenklappenstenose festgestellt [108, 109]. In jüngerer Zeit wurde ein Zusammenhang zwischen Östrogenrezeptoren und TGF- β 1 Polymorphismus mit einem Risiko der Aortenklappenstenose bei postmenopausalen Frauen festgestellt [110]. Mittlerweile liegt der Fokus genetischer Defekte, wie z. B. der bikuspiden Aortenklappe, nicht mehr nur auf der Bedeutung des reinen Risikofaktors einer Aortenklappenstenose, sondern darauf, dass ein bestimmter Gendefekt die bikuspidale Aortenklappenmorphogenese bestimmt. Dieser genetische Defekt hat mehr Einfluss bei der Häufigkeit einer AS als bisher angenommen. Durch eine weitere Studie konnte

festgestellt werden, dass die Mutation eines speziellen Transkriptionsfaktors einen Zusammenhang zwischen angeborenen Herzklappenfehlern und einer auftretenden Kalzifizierung aufweist. Der NOTCH1 Transkriptionsfaktor wies in zwei Familien mit autosomal dominanter Vererbung von Herzfehlern und Aortenwandabnormalitäten Mutationen auf [111]. Angeborene bikuspidale Klappen weisen Kalzifizierungen bei Patienten bis 30 Jahren aus. Dies ist sicherlich wegen der erhöhten Belastung der Fall, der die Klappen aufgrund ihrer Missbildung ausgesetzt sind [112]. Dadurch wurde der Grund für die Neigung zur Kalzifizierung bei bikuspiden Klappen festgestellt. Mutationen des Transkriptorregulator NOTCH1 führen zu Klappenanomalien und zu -kalzifizierung wegen eingeschränkter Repression des Osteoblastenstimulators Runx2 [111]. In der Entwicklung der Aortenklappe ist das murin homologe NOTCH1 hoch exprimiert und für die Hemmung von Runx2/Cbfa1 zuständig. Runx2/Cbfa1 spielt sowohl bei der frühen Entwicklung von Herzklappen als auch bei einem chondroosteogenischen Differenzierungsweg eine Rolle. Eine Förderung aufgrund der Mutation des Gens NOTCH1 innerhalb der Auswirkung von Runx2/Cbfa1 erhöht somit die Osteoblastendifferenzierung, was eine erhöhte Neigung zur Kalzifizierung bei Patienten mit bikuspidaler Aortenklappe zur Folge haben kann [111]. In kalzifizierten Herzklappen von Menschen wurden osteoblastähnliche Zellen nachgewiesen, die dem Transkriptionsfaktor Runx2/Cbfa1 entsprachen. Außerdem enthielt eine Gruppe untersuchter humaner Aortenklappen heterotropischen Knochen, was die Theorie eines dysregulierten Verhaltens der Herzklappenkalzifizierung bestätigt [102].

In einer klinischen Studie konnten Charest et al. nachgewiesen, dass eine endotheliale Dysfunktion auf humaner Ebene zu degenerierter AS führt. Sie verglichen 30 AS- mit 20 normalen Klappen und konnten bei den AS-Klappen in bestimmten Bereichen Blutgefäße nachweisen. Darüber hinaus haben sie ein Protein nachgewiesen, welches bei der Ossifikation, der Angiogenese und der Metalloproteinaseproduktion beteiligt ist. Dieses Protein konnten sie in AS Klappen, in ausgebildeten Blutgefäßen und in Makrophagen nachweisen [113]. Makrophagen [30, 114] und T-Lymphozyten [30, 88, 114] wurden bei Untersuchungen von lädierten Aortenklappen gefunden. Zusätzlich konnte das Interleukin (IL)-2 sowie Klasse 2 humanes Leukozytenantigen (HLA-DR) [88] bei diesen Klappen festgestellt werden. Diese letztgenannten bedeuten das Vorhandensein einer chronischen Entzündung. Außerdem wurden Mastzellen [115] und entzündungsfördernde Zytokine, IL-1b [116] und der Tumor-Nekrose-Faktor TNF- α [99] innerhalb der Aortenklappen identifiziert. Verschiedene extrazelluläre Matrixkomponenten werden von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) abgebaut, die in verletzten Aortenklappen zu finden sind. Hierbei wird die These aufgestellt, dass MMP nicht nur eine regulierende Funktion bei der vaskulären Kalzifizierung spielt, sondern auch ent-

scheidend beim Abbau der extrazellulären Matrix sowie bei der Plaueinstabilität beteiligt ist [117–119]. Die Rolle von MMP in der Kalzifizierung ist bis heute nicht endgültig geklärt.

Eine Erhöhung des Phosphatspiegels im Blut führt zu einer Anreicherung von Kalzifizierungen in Myoblasten [120]. Eine bestehende Hypothese der Kalzifizierung besteht in der aktiven Knochenbildung in situ durch osteblasttypische Zellen. Das Endprodukt der phänotypischen Veränderung von vaskulären glatten Muskelzellen beruht auf der Anwesenheit von osteoblastischen Zellen, wobei eine weitere Theorie auf die Aktivierung und Differenzierung von vorhandenen aufkeimenden Perizyten verweist. Perizyten sollen nach Aktivierung in der Aortenwand zur Kalzifizierung neigen [121, 122]. Untersuchungen stenotischer Herzklappen ergaben eine Ansammlung von T-Lymphozyten, was für eine Kalzifizierung aufgrund von Inflammation sprechen würde [102]. Auch Hyaluron kommt stark im Interstitium und in normalen Herzklappen vor. In kalzifizierten Herzklappen ist der Hyalurongehalt jedoch geringer. Es besteht die Annahme, dass es im pathophysiologischen Prozess der degenerativen Aortenklappenstenose involviert ist [123].

Die oben genannten Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Kalzifizierung von Aortenklappen ein aktiv regulierter Prozess ist. Ansätze, wie z. B. lipid-reduzierte, lipoprotein/proteoglycane Retention, entzündliche und fibrotische Zytokine und spezifische Zellsignalwege, die vaskuläre Kalzifizierung regulieren, werden als Therapieform genannt.

Der Kalzifizierungsvorgang bzw. die Kalzifizierungsneigung scheint ein Prozess zu sein, der sich unabhängig vom Gewebetyp bildet. Das heißt, dass er sowohl bei natürlichen als auch bei im Bioreaktor gezüchteten Klappen auftreten kann.

Abbildung 4.3 stellt die Ergebnisse zusammenfassend dar.

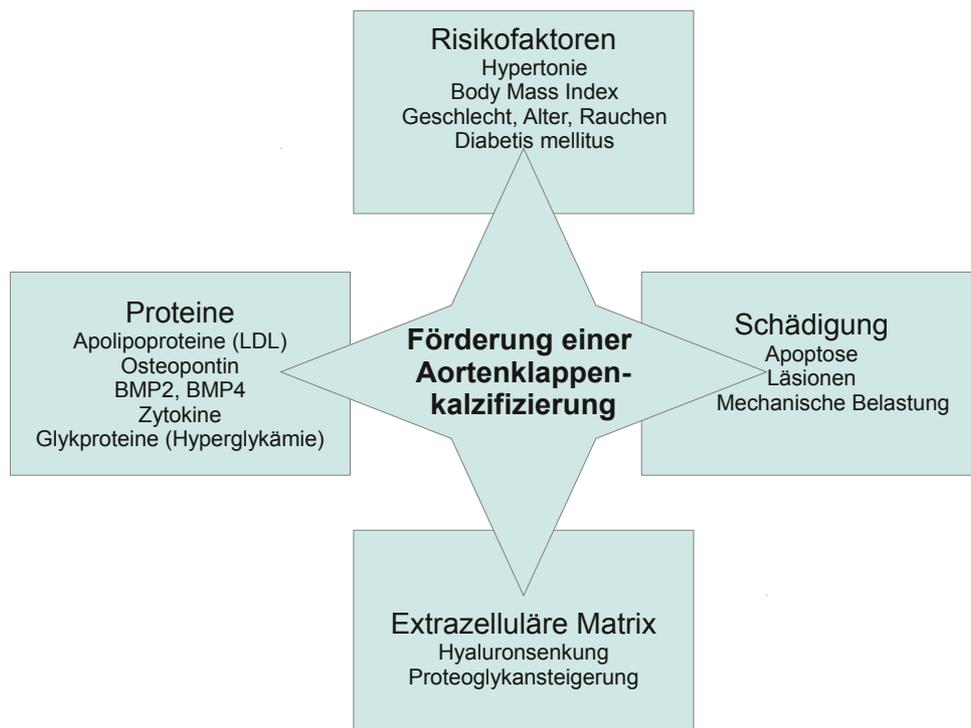


Abbildung 4.3: Einflussfaktoren einer Aortenklappenkalzifizierung

4.3 In-vitro-gezüchtete Herzklappenbioprothesen

Mechanische und biologische Herzklappenprothesen sind heutzutage trotz ihrer Nachteile führend auf dem Implantationsmarkt. Von Tissue Engineerten Klappen wird erhofft, den steigenden Bedarf an geeignetem und langfristigem Ersatzgewebe decken zu können. Herzklappen zu „Tissue Engineeren“ bedeutet, eine vitale Herzklappe zu züchten und dem Patienten anstelle seiner erkrankten einzusetzen. Ein Bioreaktor, in dem eine Tissue Engineerte Klappe kultiviert wird, muss spezielle Anforderungen an seine Sterilisierbarkeit erfüllen. Es handelt sich dabei um ein geschlossenes System, das vor Versuchsbeginn frei von lebenden Mikroorganismen gemacht werden muss. Hoerstrup et al. züchten bereits autologe Ersatzklappen und Arterien im Bioreaktor. Sie besiedelten ein Herzklappengerüst aus Kunststoff mit körpereigenen Zellen unter kontrollierten Prozessbedingungen und einem pulsatilen Flüssigkeitsstrom. Nach der darauf folgenden tierexperimentellen Studie konnten sie belegen, dass die Klappen das Potential zum Mitwachsen hatten [124].

Patienten im Kindesalter müssen mehrfach an den Herzklappen operiert werden, da künstliche Herzklappen sich in ihrer Größe nicht verändern können. Dementsprechend liegt der Fokus auf der Züchtung von Herzklappen, die ein Potential zum Mitwachsen aufweisen und somit eine Reoperation unnötig machen. Hierzu verwenden Cebotari et al. [125]

ein Gerüst aus biodegradierbarem Polymer, welches mit peripheren mononuklearen Zellen aus dem Blut besiedelt wird. Die Immunkompatibilität ist bei diesem Verfahren durch autologe Zellen gegeben. Rothenburger et al. besiedelten ein Kollagen-I-Scaffold mit Myofibroblasten und Endothelzellen. Die Myoblasten siedelten sich in mehreren Lagen in und an das Scaffold an und wurden von den Endothelzellen überzogen [126, 127]. Um einen idealen Herzklappenersatz mit autologen Herzklappenzellen nachzuzüchten, müssten Zellen der erkrankten Herzklappe isoliert und kultiviert werden. Dies ist beim heutigen Stand der Forschung nicht möglich. Liv et al. ist es gelungen, vaskuläre Zellen aus der Nabelschnur Neugeborener zu gewinnen, die über einen gewissen Zeitraum eingefroren gelagert und im Bedarfsfall zur Züchtung einer Herzklappe herangezogen werden können [128]. Für ältere Patienten, von denen keine Zellen aus der Nabelschnur vorliegen, werden Zellen aus dem Knochenmark verwendet, allerdings bedarf diese Methode der Zellgewinnung einen zusätzlichen Eingriff [129]. Das Ziel von Cornelissen ist, optimale Kulturbedingungen für gezüchtete Herzklappen zu schaffen. Er stellt hierzu ein Herzklappenkonstrukt aus dem Scaffoldmaterial Fibrin her, welches er anschließend mit Endothelzellen besiedelt und jeweils unter verschiedenen sowie wechselnden Bedingungen (Scherstress, Schlagfrequenzvariation, Zellzahlunterschiede auf dem Scaffoldmaterial etc.) im Bioreaktor kultiviert. Die Auswirkung unterschiedlicher Zellzahlen bei der Besiedlung sowie die Herzschlagfrequenz und das Herzschlagvolumen während der Kultivierung im Bioreaktor auf die Gewebeentwicklung wird hierbei untersucht [130]. Mit Hilfe seiner beobachteten Bedingungen, eine Herzklappe optimal zu züchten, ist ein anschließender dreimonatiger Tierversuch positiv ausgefallen. Auf Grund des Mangels an Organspenden verfolgen Ott et al. den Ansatz, ein komplettes Herz im Bioreaktor zu züchten. Erfolgsversprechend war die Züchtung von Rattenherzen. Sie befreiten das Herz von Zellen und besiedelten das Gerüst mit Zellen neugeborener Ratten. Sie schafften mit Druckveränderungen und elektrischen Reizen eine Herzumgebung, die der der nativen sehr ähnlich war [131]. Das Herz begann nach vier Tagen zu schlagen.

Zellbesiedlung ist aus verschiedenen Gründen kostenintensiv. Kultivierungsdauer, Materialverbrauch, Infektionsrisiko und somit Verlust der Herzklappe während der Kultivierung sind hoch. Diese Nachteile versuchen Schleicher et al. zu umgehen, indem sie Herzklappen in-vivo züchten. Dem Patienten sollen dezellularisierte porcine Herzklappen eingesetzt werden. Durch die im Blut vorkommenden Zellen und den physikalischen Stimuli soll eine Besiedlung und Differenzierung in Herzzellen erreicht werden. Obwohl schon Erfolge im Tierexperiment erzielt wurden, wurde eine Versuchsreihe zur Besiedlung mit dezellularisierten, porcinen Herzklappen im Menschen noch nicht durchgeführt [132].

Forschungen hinsichtlich des Tissue Engineering befinden sich noch in ihrem Anfangsstadium. Langzeitergebnisse hinsichtlich der Kalzifizierung von Tissue Engineerten Herzklappen liegen noch nicht vor. Vorausschauend werden in der vorliegenden Arbeit Methoden etabliert, die eine zerstörungsfreie Untersuchung und Erforschung der Kalzifizierung von vitalen Herzklappen zulassen.

4.4 Untersuchungsmethoden von Kalzifizierungsablagerungen - von Kossa Färbung, Strömungsvermessung, numerische Modellierung

4.4.1 Von Kossa Färbung und Graustufenbereichbestimmung

Lin untersuchte den Einfluss des pH-Wertes als eine der physikalisch-chemischen Ursachen auf das Kalzifizierungsverhalten bioprothetischer Materialien. Sie verwendete sowohl Rinderperikard als auch verschiedene Polyurethan-Werkstoffe, um in Einlagerungsversuchen eine Kalzifizierung in physiologischer Flüssigkeit bei 37°C hervorzurufen. Für die Einstellung des pH-Wertes im Rinderplasma auf 7,0, 7,2, 7,4, 7,6 und 7,8 wurden HEPES- und TRIS-Pufferlösungen verwendet. Eine anschließende von Kossa Färbung sollten die Ablagerungen im Gewebe bzw. an der Oberfläche differenzieren und anschließend die Kalzifizierung lichtmikroskopisch bzw. morphometrisch auswerten (siehe Abbildung 4.4). Das Perikard färbte sich mit der von Kossa Methode an den kalzifizierten Bereichen je nach pH-Wert schwarz. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigendem pH-Wert die Ablagerungen größer wurden [133]. Der pH-Wert ist ein Faktor, der die Kalzifizierungsneigung mitbestimmt. Dies wurde auch in anderen Studien belegt [71, 72].

Kalzifizierungsablagerungen können zudem mit verschiedenen bildgebenden Verfahren, wie z. B. der Computertomographie, visualisiert werden. Hierfür wird ein sogenannter Graustufenbereich (HU-Fenster) festgelegt, in dem sich die Kalzifizierung befindet.

Nikolaou et al. führten eine Studie durch, die sich mit dem Potenzial der Multi Detektor Computer Tomographie (MDCT) zur Detektion und Charakterisierung verschiedener Plaquekomponenten an einem ex-vivo-Modell beschäftigte [134]. Unbehandelte menschliche Herzen wurden mit Kontrastmittel gefüllt, sodass die Koronararterien untersucht werden konnten. Nach diesen Untersuchungen erfolgte die histopathologische Analyse der Koronararterien. Die Arterien wurden aufgeschnitten und in Stücke eingeteilt. Eine anschließende Färbung mit Hämatoxilin-Eosin- und Elastica-van-Gieson-Färbung konnte artherosklerotisches Gewebe aufdecken. Hämatoxilin-Eosin-Färbung dient zur Unterschei-

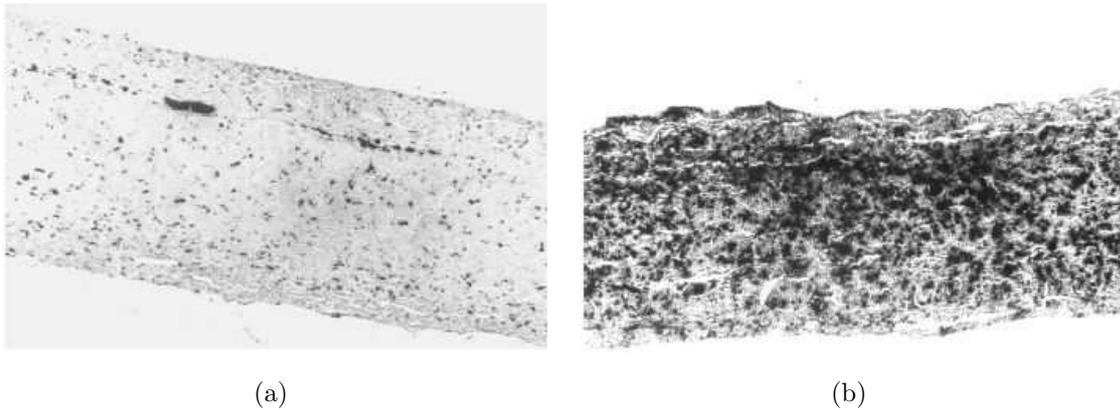


Abbildung 4.4: (a) Rinderperikard in 0,5 % Glutaraldehyd, pH-Wert 7,4, gefärbt nach von Kossa nach vierwöchiger Kalzifizierung. Es sind kleine kalzifizierte Bereiche zu erkennen (schwarze Punkte). (b) Von Kossa gefärbtes Perikard, pH-Wert 7,8, nach vierwöchiger Kalzifizierung. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kalzifizierung (schwarze Bereiche) mit steigendem pH-Wert größer wird [133].

derung unterschiedlicher Gewebestrukturen, Elastica-van-Gieson zur Differenzierung von nicht-zellulären Gewebekomponenten. Durch einen Vergleich der Ergebnisse der MDCT und der Histopathologie wurde ein HU-Fenster für fetthaltige, fibröse und kalzifizierte Plaquekomponenten ermittelt (siehe Tabelle 4.1) [134].

Histopathologie (Morphologie)	MDCT (HU)
Präatherom/Atherom	45 ± 16
Fibroatherom	54 ± 16
Fibrokalzifizierter Plaque	Fibrose: 97 ± 31, Kalzifizierung: 387 ± 125
Fibrotischer Plaque	97 ± 31

Tabelle 4.1: Klassifikation des in der ex-vivo-Studie detektierten Plaques [134].

Die Untersuchung der unterschiedlichen Gewebetypen und deren vorkommender lipidreicher und fibröser Plaque hat ergeben, dass die räumliche Auflösung der MDCT nicht ausreicht, um verschiedene Plaqueanteile ohne Partialvolumeneffekte darzustellen. Außerdem ist eine Beeinflussung der HU-Werte durch die Aufnahmeparameter sowie Kontrastmittelprotokolle zu erwarten. Das bedeutet, dass eine Ablagerung in zwei aufeinander folgenden Untersuchungen verschiedene HU-Werte aufweist, abhängig von der Kontrastmittelkonzentration im Gefäßlumen. Ein genauer Graustufenbereich für kalzifizierte Herzklappen

ist demnach noch nicht eindeutig bestimmt. Diese genaue Graustufenbestimmung wird in Kapitel 6.1 vorgenommen.

4.4.2 Strömungsvermessung mittels Particle Image Velocimetry

(PIV)

Die Kalzifizierung an Herzklappen bzw. Herzklappenprothesen zu untersuchen, kann mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden. Hierbei können Rückschlüsse auf Einflussfaktoren wie z. B. Strömungseigenschaften oder Lokalisation einer beginnenden Kalzifizierung gezogen werden. Um vitale Herzklappen züchten und kultivieren zu können, sind diese Erkenntnisse von großer Bedeutung. Die Strömung kann mittels der Particle Image Velocimetry (PIV) evaluiert werden. Das Verfahren ist ein berührungsloses Messverfahren und kann ein ganzes Vektorfeld der Geschwindigkeiten messen. Es wurde zur Messung des Geschwindigkeitsfeldes an Herzklappen und für die Verifizierung und Validierung neuer mechanischer Herzklappenprothesen schon häufig eingesetzt [135].

Zellschädigung und Stagnation von Blut mit Thrombenformierung ist bei der Implantation von Herzklappenprothesen ein weit verbreitetes Problem. Stagnations- und Rezirkulationszonen sind für ein solches Auftreten prädestiniert. Auch Turbulenzen werden mit den Problemen in Verbindung gebracht. In einer Arbeit von Lim et al. wurden die unterschiedlichen Strömungsprofile von Herzklappen untersucht. Dabei handelte es sich um eine porcine Bioprothese, eine mechanische Kugelkäfigprothese und eine mechanische zweiflügelige Herzklappe mit zwei unterschiedlichen Öffnungswinkeln. Die Untersuchungen wurden in einer nachgebildeten Aortenwurzel aus PMMA unter konstantem Fluidfluss durchgeführt. Das Fluid bestand aus einer Glycerin/Wassermischung und war mit polykristallinem Puder geimpft. Strömungsprofile, Reynoldsche Spannungen und Druckmessungen wurden jeweils hinter der Klappe zum Zeitpunkt der Öffnung untersucht. Es stellte sich heraus, dass die porcine Bioprothese sowohl die höchsten Axialgeschwindigkeiten und die höchsten Geschwindigkeitsgradienten als auch die größte Turbulenzintensität aufwies. Es herrschten Rezirkulationszonen an den Seiten vor und es wurden die größten Reynold-schen Spannungen gemessen, die mit dem Auftreten von vermehrter Kalzifizierung genannt werden [136]. In einer weiteren Studie, durchgeführt von derselben Forschergruppe, wurden Geschwindigkeitsvektorfelder und Reynoldsche Spannungen in der Aorta untersucht. Es wurde ein Vergleich zwischen Aorta mit gestenteter Herzklappenprothese, ohne Stent und komplett ohne Herzklappe gezogen. Die aortale Öffnungsfläche wurde durch den Montagering kleiner, was eine zentrale axiale Strömung mit Rezirkulationsregionen hervorruft (siehe Abbildung 4.5). Die gemischten Zonen zwischen zentraler Strömung und

Rezirkulationszone ergeben eine hochbelastete Region. Es wird davon ausgegangen, dass in einer solchen Region eine Kalzifizierung vermehrt stattfindet [137].

Für die Untersuchungen des Belastungslevels auf die Thrombozyten und Erythrozyten über die Zeit wurden das Strömungsprofil und die Reynoldschen Spannungen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten des Öffnungs- und Schließvorganges einer porcinen Bioprothese gemessen. Ein weiterer Vergleich wurde zwischen konstantem und pulsatilem Fluidfluss gezogen. Es resultierten höhere Spannungen bei pulsatiler Strömung [138]. Wirbelbildung und deren Einfluss beim Öffnen und Schließen einer Klappe wurde von Kadem et al. geprüft. Ein bedeutendes Ergebnis ist, dass der Prozess des Herzklappenschließens bereits vor der Druckumkehr beginnt. Dadurch wird die Strömung hinter der Klappe beeinflusst [139].

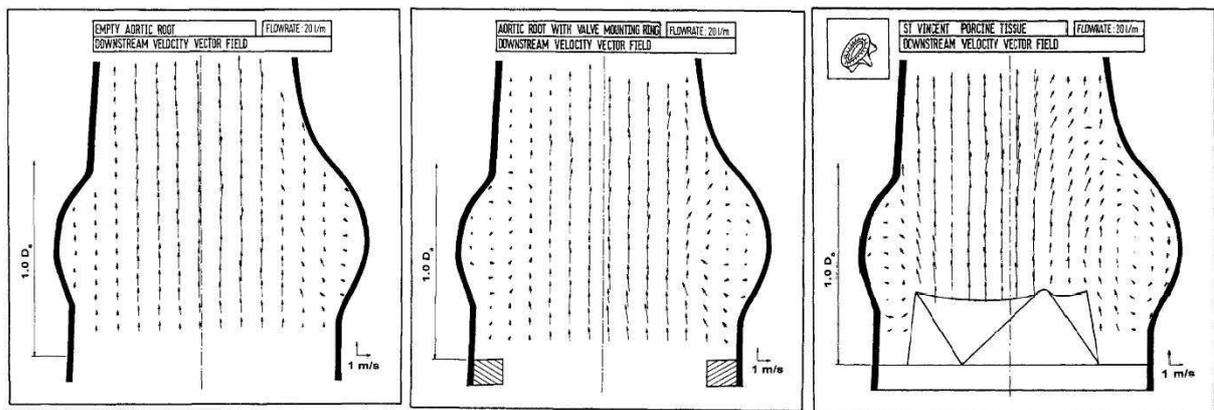


Abbildung 4.5: Links: Strömungsprofil in Aortenwurzel ohne Taschen (keine Rezirkulation erkennbar). Mitte: Aortenwurzel mit Montagering (Öffnungsfläche der Klappe wird kleiner, Rezirkulation verstärkt sich). Rechts: Aortenwurzel mit Bioprothese (Rezirkulationszone stark ausgeprägt). Diese Untersuchungen wurden durch Lim et al. mittels der Particle Image Velocimetry durchgeführt, um den Einfluss unterschiedlicher Herzklappen zu erörtern [137].

4.4.3 Numerische Modelle der Herzklappensimulation

Nicht nur in praktischen Untersuchungen mittels der PIV, sondern auch in der Herzklappensimulation sind Untersuchungen hinsichtlich Öffnungsbewegung und Spannungsverteilungen innerhalb einer Klappe von Bedeutung. Kosten und Zeit für die Züchtung und Untersuchung von vitalen Herzklappen sind bis jetzt ein großer Nachteil. Schon minimale Änderungen innerhalb der Kultivierungsdauer können eine Herzklappe unbrauchbar

machen. Untersuchungen an vitalen Herzklappen liegen dementsprechend nur vereinzelt vor. Zur Absicherung und Erlangung erster Erkenntnisse kann auf numerische Methoden zurückgegriffen werden. Somit kann die Herzklappenbewegung und eine auftretende Kalzifizierung auch theoretisch simuliert werden, sofern verschiedene Parameter wie z. B. Durchflussgeschwindigkeit, Materialdaten des Gewebes oder auch Druckangaben bekannt sind.

Es beschäftigen sich einige Forschergruppen mit der numerischen Analyse der Aortenklappenbewegung, die in zwei unterschiedliche Ansätze unterteilt wird. Dies ist zum Einen die Fluid Structure Interaction (FSI), die die Wechselwirkung zwischen Festkörperphase (Aortenklappe) und Fluidphase (Blutstrom) berücksichtigt, zum Anderen die Finite Elemente Methode (FEM), die lediglich das Öffnungsverhalten der Aortenklappe aufgrund von Druckdifferenzen sowie Spannungsverteilung innerhalb der Herzklappe simuliert.

Grundsätzlich werden FSI-Modelle dazu genutzt, Kenntnisse über den Strömungsverlauf der Fluidphase zu erlangen und FEM-Modelle, um die Materialbeanspruchung in den Herzklappen zu ermitteln. Weiterhin lässt sich eine Einteilung aufgrund der verwendeten Geometrien vornehmen. Dabei wird zwischen einem realen Modell und einem Modell mit den geometrischen Eigenschaften einer Prothese unterschieden.

Weitere Unterschiede der einzelnen Untersuchungen liegen nicht nur in der verwendeten Software bzw. Kopplung, sondern auch in der Modellierung der Aortenklappe. Hart et al., Nicosia et al. und Morsi et al. definierten einfache Modelle einer Aortenklappe. Sie modellierten die mechanischen Klappeneigenschaften als linear elastisch und isotrop. Diese verwendeten Eigenschaften waren eine sehr grobe Annäherung an die reale Aortenklappe [23, 24, 140].

Der Sinus einer Herzklappe wird in den meisten Fällen bei einer solchen Modellierung nicht berücksichtigt. Es konnte festgestellt werden, dass ohne den Einbezug des Sinus die Spannungen ansteigen, was in der Gewährleistung von höheren Materialanforderungen resultiert. Konvergent sind diese Modelle für Simulationen von Klappenimplantaten, da jene mit den genannten Vereinfachungen hergestellt werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass linear elastische und isotrope Modelle mit einem E-Modul von 200 kPa eine gute Annäherung an die realen mechanischen Eigenschaften liefern.

In vielen Veröffentlichungen, bis auf die von Nicosia et al. [24], ist eine ähnliche Vorgehensweise aufzufinden. Es wird ein vollkommen symmetrisches Modell der Herzklappe angenommen. Nicosia et al. [24] hingegen setzten für die Simulation eine reale Aortengeometrie ein, die mittels MRT-Daten erstellt wurde. Sie berücksichtigten somit die Variabilität der Klappendicke sowie die Asymmetrie der Klappen.

Alle Veröffentlichungen verwendeten für die Modellierung der Fluidphase dieselbe Annäherung. Das Blut wurde als newtonsches Fluid angesehen. Unterschiede zeigten sich nur in den Stoffwerten für die Dichte ρ sowie für die dynamische Viskosität η .

Simulationen, in denen die Materialeigenschaften als anisotrop und nicht linear elastisch generiert wurden, wiesen die beste Näherung an die reale Klappe auf. In den Veröffentlichungen wurde die Wechselwirkung aufgrund des zeitabhängigen hydrostatischen Drucks berücksichtigt. Das Blut, das die Klappen durchströmt, wurde vernachlässigt. Eine Wirkung der Wirbelbildung im Sinus auf das Schließ- und Öffnungsverhalten der Klappen wurde nicht berücksichtigt. Trotz dieser Einschränkung zeigten die Simulationen korrekte Klappenkinematiken entsprechend mit in-vivo-Messungen.

Die größte Herausforderung bei der Simulation der Klappen stellen die Modellierung der Kollagenfasern sowie die Beschreibung der Anisotropie des biologischen Materials dar.

Aufgrund der Tatsache, dass eine Validierung der Ergebnisse mittels einer realen Messung der Spannungsverläufe mit aktueller Technik nicht möglich ist, kann nicht abgeschätzt werden, wie sehr die eingesetzten Vereinfachungen die Ergebnisse beeinflussen.

Bei dem Modell von Carmody et al. [141] wurden die Eigenschaften der Klappe als nicht-linear definiert, allerdings weiterhin isotropes Verhalten vorausgesetzt. Hart et al. [23] und Weinberg et al. [25, 142] generierten ein faserverstärktes Modell, das die Anisotropie des Aortengewebes und die beste Näherung an reale mechanische Eigenschaften beinhaltete. Allerdings wiesen die Ergebnisse mit den einfachsten Annahmen bereits eine gute Annäherung auf.

Mikrorisse und Spannungen innerhalb der Herzklappe sollen bevorzugte Orte für eine beginnende Kalzifizierung sein. Eine Betrachtungsweise dieser Spannungsverteilung kann mit Hilfe der transienten FEM-Simulation durchgeführt werden. Soncini et al. wiesen nach, dass ohne Berücksichtigung einer Sinusgeometrie die Spannungen in der Klappe ansteigen [143]. Die durchgeführten Untersuchungen haben viele Ergebnisse generiert, die eine realistische Annäherung an die Bewegung der Aortenklappe darstellen. Dennoch wurden diese Ergebnisse bis jetzt nicht für weitere Untersuchungen oder Optimierungen verwendet. Eine Ausnahme sind hierbei die Ergebnisse von Hart et al. [23, 144], die mit Hilfe des generierten Modells das Wash-Out Verhalten der Aortenklappe simulierten, sowie die von Weinberg et al. [25, 142], die die Alterung und den Krankheitsverlauf einer Herzklappe darstellten. Trotz dieser Weiterführung bedarf es für diese Modelle noch Erweiterungen im Bezug auf eine realistische Modellierung.

5 Bioreaktor zur Aufrechterhaltung der Vitalität einer porcinen Aortenklappe

In der Medizintechnik dienen Bioreaktoren dazu, möglichst optimale Bedingungen für die Kultivierung und Vermehrung von Zellen bereitzustellen, um die Vitalität der Zellen garantieren zu können. Prozessparameter wie Temperatur, Kohlenstoffdioxid- und Sauerstoffgehalt, pH-Wert sowie die richtige Nährstoffkonzentration sind wichtige Faktoren, die ständig kontrolliert und gegebenenfalls nachgeregelt werden müssen. Auch die Sterilisierbarkeit der mit den Zellen bzw. dem Nährmedium in Kontakt kommenden Bauteile muss gewährleistet sein [145–147]. Die Aufgabe des in diesem Kapitel beschriebenen Bioreaktors ist es, die Zellen einer porcinen Aortenklappe zu versorgen, damit die Vitalität der Zellen bis zu 14 Tage nachgewiesen werden kann. Im Folgenden ist das Lastenheft eines derartigen Bioreaktors definiert. Anhand dieser Vorgaben wird im Anschluss die Konstruktion des Reaktors vorgenommen. Alle im Bioreaktor befindlichen Volumina der Bauräume werden physiologisch ausgelegt. Das heißt, dass nicht nur der Herzschlag mit 60 Schlägen pro Minute durch die Pneumatikeinheit vorgegeben wird, sondern auch das zu fördernde Schlagvolumen eingestellt werden kann.

5.1 Material und Methoden

Konstruktion des Bioreaktors

Anforderungen an den Bioreaktor

Zur Untersuchung von Herzklappenbioprothesen gelten die DIN/EN 12006-3 und die ISO-5840, die auch für den Bioreaktor als Standard genommen werden. Diese Richtlinien beinhalten folgende Voraussetzungen:

- Verlauf der Testvorgänge unter ähnlichen Bedingungen wie im späteren klinischen Einsatz einschließlich der Sterilität,
- Führung eines detaillierten Testprotokolls (auch beim Versagen eines Tests),

- Identität der durchgeführten Versuche, d. h. gleiche Testbedingungen (Fluidzusammensetzung, Temperatur, Druckunterschied etc.),
- Blut oder blutähnliches Testfluid,
- vollständiges Öffnen und Schließen der Herzklappen während des Tests,
- Testtemperatur 37 °C, mit tolerierbarer Abweichung von 5 %,
- keine Verfälschung der Messergebnisse durch verwendete Materialien im Tester,
- keine Veränderung der Testverhältnisse während des Versuchs aufgrund von Verschleißerscheinungen.

An die Konstruktion des Bioreaktors bestehen zusätzliche Anforderungen:

- Kultivierung einer Herzklappe bis zu 14 Tage,
- Wechseln des Mediums mittels definierter Zu- und Abläufe,
- Antrieb über druckgesteuerte Pneumatikeinheit,
- Beobachtung der Öffnungsbewegung der Herzklappe,
- Sterilisierbarkeit der mit dem Fluid oder der Herzklappe in Kontakt kommenden Bauteile und Resistenz gegenüber 70 Vol. % Ethanol,
- Einstellung des Differenzdrucks von $\Delta p = 90^{+20/-0}$ mmHg (minimaler Ventrikel-
druck zu diastolischem Aortendruck) und der aortalen Blutdruckamplitude von 30 –
40 mmHg,
- Betrieb in einem Inkubator,
- keine Beeinträchtigung des Versuchs durch auftretende Schaumbildung des
Nährmediums,
- Sterilisierbarkeit des gesamten Systems,
- Einstellung der Temperatur auf 37 °C +/- 5 %.

Konstruktion des Kompartments

Das Kompartiment ist der Teil des Bioreaktors, in dem sich die Herzklappe befinden wird. Durch das Kompartiment wird Flüssigkeit gepumpt, die eine physiologische Umgebung für die Herzklappe bereitstellen soll. An die Konstruktion des Kompartiments werden spezielle Anforderungen gestellt:

- es sollen unterschiedliche Herzklappen eingesetzt werden können (vitale porcine Aorten- oder Pulmonalklappen, Tissue Engineerte, gerüstlose oder gestentete Herzklappen),
- die Bewegung der Herzklappe soll beobachtet werden können,

- eine vollständige Öffnung und Schließung der Klappe muss gewährleistet sein,
- die Klappen müssen in geeigneter Position fixiert werden,
- Sterilisierbarkeit der Komponenten,
- Luftschläuche müssen mit einem Filter gesichert sein.

Das Kompartiment des Bioreaktors besteht aus einem Gestell und vier Hauptteilen. In dem Gestell ist eine Halterung für das Magnetventil vorgesehen.

Auf die Bodenplatte des Gestells wird eine Membran gelegt. Die Membran besteht aus biokompatiblen Silikon (Elastosil E40, Wacker) mit einem Durchmesser von 134 mm und einer Dicke von 1,5 mm. Sie wird außen mit acht Bohrungen und mittig mit einer Bohrung versehen. Die Membran wird zwischen dem unteren Kompartimentteil und der Membranhalterung gelegt und mit Schrauben fixiert, wodurch sie gleichzeitig gegen Flüssigkeit abdichtet. Zum Auslenken der Membran werden oberhalb und unterhalb Haltescheiben (Durchmesser 50 mm) angebracht, die die Membran mit dem Kolben des Magnetventils verbindet. Das Magnetventil (5/2-Wege-Druckluft-Baureihe SF3000-G1/8“, vPC) wird in das Gestell eingefügt und an die Druckluft angeschlossen. Das Fluid wird mit Hilfe der ausgelenkten Membran durch die Herzklappe gepumpt. Beim Betreiben des Reaktors ist eine realitätsnahe Flüssigkeitsbewegung (pulsatil mit 60 bis 80 Schlägen pro Minute und einem Pumpvolumen von 35 – 50 ml) entscheidend. Dies wird mit dem Magnetventil und der auferlegten Druckluft realisiert. Durch Einstellen der Druckluftmenge lässt sich der Druck unterhalb der Herzklappe regulieren. Auch der nötige Hub wird hierdurch eingestellt. Pro Herzschlag werden in vivo maximal zwischen 35 und 50 ml Blut durch die Aortenklappen gepumpt. Der benötigte Hub h wird errechnet zu

$$V = \frac{\pi}{3}(r^2 + rR + R^2)h \quad (5.1)$$

$$\Rightarrow h = \frac{3V}{\pi(r^2 + rR + R^2)} \quad (5.2)$$

mit verdrängtem Volumen $V = 35 - 50 \text{ cm}^3$, Radius der Haltescheibe $r = 25 \text{ mm}$ und Radius der Membran $R = 67 \text{ mm}$. Das ergibt $h = 5$ bis 7 mm .

Eventuelle Unregelmäßigkeiten in der Verteilung der Dicke der Membran, die einen Einfluss auf ihren Widerstand und somit auf die Pumpkraft der Pneumatikeinheit haben, werden mit dem Einbeziehen einer zweifachen Sicherheit berücksichtigt. Damit ergibt sich ein maximaler Hub von 10 bis 14 mm.

Auf die Membran wird das untere Kompartimentteil aufgeschraubt (siehe Abbildung 5.1).

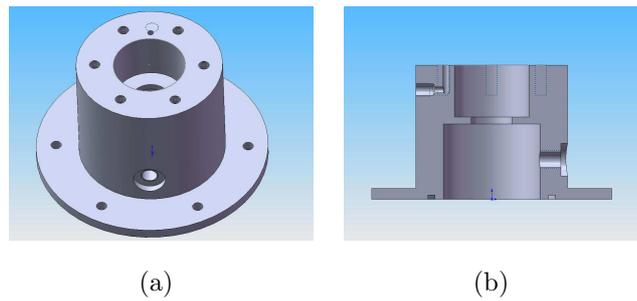


Abbildung 5.1: Unteres Teil des Kompartments. (a) Obere Draufsicht, (b) Schnittansicht.
Das untere Teil ist der Zylinder, in den die Halterung der Herzklappe gelegt wird

In das untere Teil wird die Herzklappe, die auf der Herzklappenhalterung (siehe Abbildung 5.2) fixiert ist, gelegt. Die Herzklappenhalterung ist aus PC gefertigt und dient zur Fixierung der Herzklappe innerhalb des Reaktors.

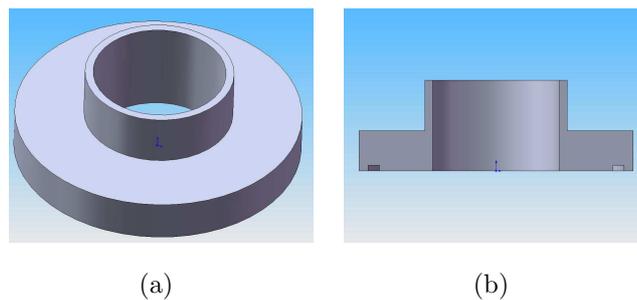


Abbildung 5.2: Herzklappenhalterung. (a) Obere Draufsicht, (b) Schnittansicht. Diese Halterung ist von unten mit einem O-Ring versehen, um keine Leckage zu erzeugen. Das untere Teil ist am unteren Ende mit einer Membran abgedichtet, die durch Flexion Fluid durch den gesamten Reaktor pumpt. Vergrößerung 4:1.

Oberhalb und unterhalb der in der Abbildung dargestellten Herzklappenhalterung wird je ein O-Ring gelegt. Durch Einführen und Formschluss des mittleren Teils dichten die O-Ringe gegen austretende Flüssigkeit und die Herzklappenhalterung ist fixiert (siehe Abbildung 5.3). Der Querschnitt des mittleren Teils ist konstant bei 25 mm gehalten, um keine weiteren Einflüsse aufgrund von Verjüngung bzw. Erweiterung zu erhalten. An das mittlere Teil schließt das obere Bauteil an (siehe Abbildung 5.4). Das obere Bauteil besteht aus einem Reservoir und einer weiteren Membran. Das Reservoir nimmt das durchfließende Fluid auf und führt es durch Schläuche in den Speicher. Das Reservoir ist durch die Membran vom Kompartimentdeckel getrennt. Die Membran soll nicht nur zur Phasentrennung

nung dienen, sondern auch die durch Fluidbewegung und CO_2 -Anreicherung auftretende Schaumbildung reduzieren. Mittig im Reservoir ist ein Stempel eingelassen. Der Stempel dient dazu, den Druck oberhalb der Herzklappe einzustellen. Der Stempel gleitet trocken durch eine Hülse. Seine Aufwärtsbewegung wird durch den Hub der Pumpeinheit bestimmt, das Rückstellen mit Hilfe einer Feder realisiert. Unterhalb des Reservoirs sind zwei Bohrungen für die Zu- und Abluft vorgesehen. Die Druckdifferenz wird durch zwei Druckmessbohrungen unter- und oberhalb der Herzklappe gemessen. Das Kompartiment schließt mit einem Deckel ab. Der gesamte Bioreaktor verfügt über je zwei Zu- und Abläufe. Die zwei Zuläufe befinden sich unterhalb der Herzklappe, die zwei Abläufe am unteren Ende des Reservoirs. Das Kompartiment wird so konstruiert, dass das Fluid die Herzklappe ungehindert durchströmen kann.

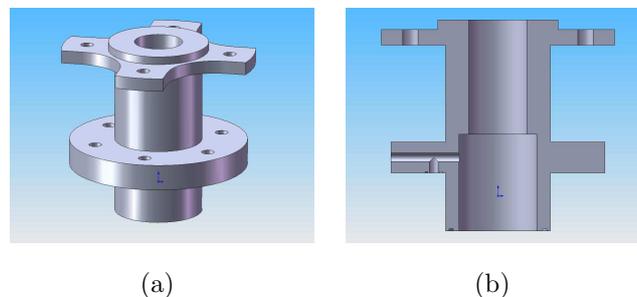


Abbildung 5.3: Mittleres Teil des Kompartiments. Ein O-Ring zwischen Herzklappenhalterung und mittlerem Teil dichtet das Kompartiment. Das mittlere Teil besteht aus einem 114 mm langen Rohr. (a) Obere Draufsicht, (b) Schnittansicht

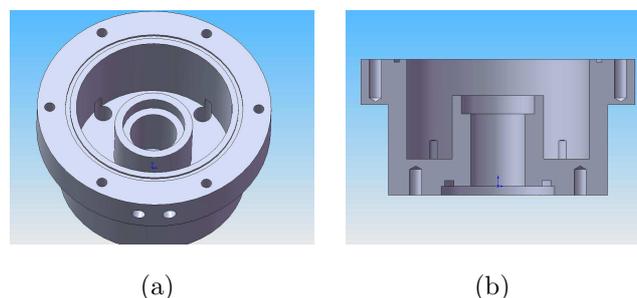


Abbildung 5.4: Reservoir des Kompartiments. (a) Obere Draufsicht, (b) Schnittansicht

Konstruktion des Speichers

Der Speicher des Bioreaktors besteht aus einem Zylinder mit den Abmaßen 165 mm in der Höhe und 116 mm im Durchmesser. Er besitzt am unteren und oberen Ende jeweils zwei Zu- und Abläufe, die mit Schläuchen und Rückschlagventilen mit den Zu- und Abläufen des Kompartments verbunden werden (siehe Abbildung 5.5).

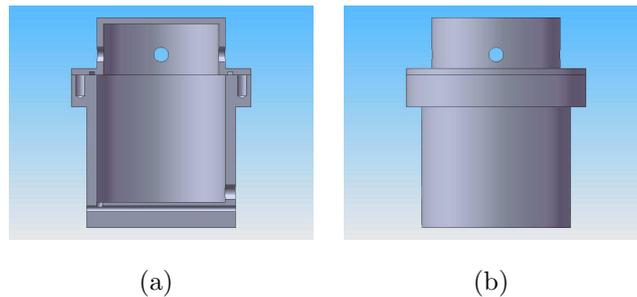


Abbildung 5.5: Speicher des Bioreaktors zur Züchtung und Kultivierung von vitalen Herzklappen. (a) Schnittansicht durch den Speicher mit Zu- und Ablaufbohrung. (b) Seitliche Draufsicht.

Das Kompartiment und der Speicher sind aus Polycarbonat hergestellt, um eine Sterilisierung im Autoklaviergerät möglich zu machen. In Abbildung 5.6 ist der komplette Bioreaktor dargestellt. Eine Trennung zwischen Kompartiment und Speicher kann mit dichten Snapverschlüssen erfolgen. Dabei tritt kein Medium aus und der separate Transport beider Gefäße ist vereinfacht.

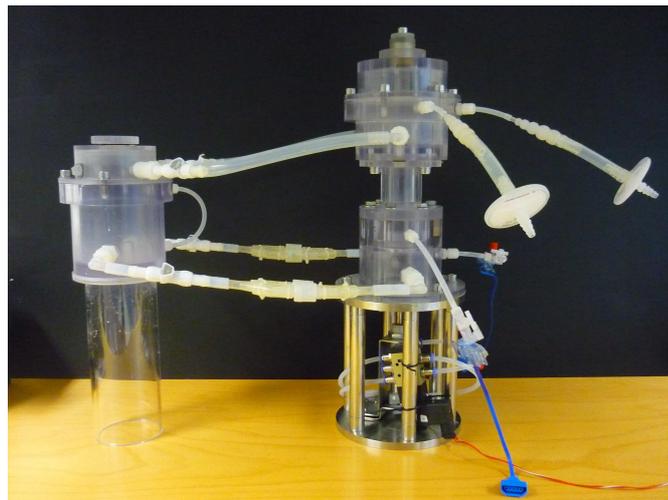


Abbildung 5.6: Kompletter Bioreaktor mit Speicher und Kompartiment. In dem Kompartiment wird die vitale Herzklappe fixiert, die durch den pulsatilem Durchfluss physiologisch versorgt wird.

Drücke im Herzen

Im Herzen herrschen unterschiedliche Drücke. Während des Herzzyklus liegt der Druck im linken Ventrikel zwischen 5 und 120 mmHg. Innerhalb der Aorta lassen sich je nach Zyklus Drücke zwischen 80 und 120 mmHg messen. Der mittlere Aortendruck p_{Aorta} beträgt demnach ca. 100 mmHg. Laut ISO 5840 muss für die Testung von Bioprothesen eine Druckdifferenz von $\Delta p = 90^{+20/-0}$ mmHg für Aortenklappen gewährleistet sein (minimaler Ventrikeldruck zu diastolischem Aortendruck). Während des Herzzyklus wird das Blut mit einer ventrikulären Druckerhöhung von 5 mmHg auf 120 mmHg in die Aorta ($p_{Aorta} = 80$ mmHg) befördert. Die aortale Blutdruckamplitude beträgt somit ca. 40 mmHg. Abbildung 5.7 verdeutlicht das Druckverhältnis in einem gesunden Herzen.

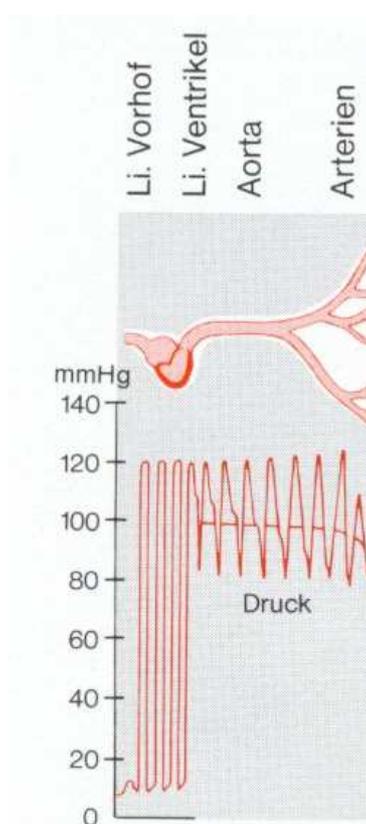


Abbildung 5.7: Blutdruck im Herzen. Hervorzuheben sind der mittlere Aortendruck (100 mmHg) sowie die aortale Blutdruckamplitude (30 – 40 mmHg) [46].

Bei einer pathologischen Blutdruckerhöhung (Hypertonie) können Herzklappen durch den veränderten Druck sowie durch Hypertonie hervorgerufene Kalzifizierungen beeinträchtigt werden. Hypertonie bedeutet eine systolische Blutdruckerhöhung über 140 mmHg innerhalb des linken Ventrikels (diastolischer Druck konstant bei 80 mmHg). Hypertonie ist eine

der entscheidenden Ursachen der Herzklappenkalzifizierungsneigung. Die aortale Blutdruckamplitude in der Systole beträgt in einem solchen Fall ca. 60 mmHg.

Sowohl der geforderte Druck der ISO 5840 ($\Delta p = 90^{+20/-0}$ mmHg) als auch die aortale Blutdruckamplitude (40 mmHg und 60 mmHg) werden auf folgende Weise in der Konstruktion beachtet. Über der Aortenklappe ist der Stempel angebracht, der einen Druck von 90 mmHg einstellt. Der Druck unterhalb der Herzklappe wird durch den Pneumatikzylinder geregelt. Bei der Austreibung beträgt dieser je nach Versuchsart ca. 120 – 140 mmHg, in der Entspannung ca. 0 – 5 mmHg. Dadurch ist ein konstanter Aortendruck gesichert, der für das Schließen der Klappe verantwortlich ist. Der Pneumatikzylinder wird über einen Microcontroller (Atmega32, ATMEL, USA) auf eine Frequenz von 1 Hz eingestellt. Auch der Steuerdruck wird hierüber geregelt. Der Kolben darf zwischen 2,8 und 4,2 mm ausfahren, um physiologisch ausreichend Fluid zu pumpen. Dieses muss mit einer Kraft von ca. 9,2 N durchgeführt werden, die sich mit dem Klappendurchmesser von ca. 25 mm und dem einzustellenden Druck von ca. 120 – 140 mmHg und $A = 530,93 \text{ mm}^3$ ergibt.

Herzklappenpräparation

Die Herzklappen werden aus dem örtlichen Schlachthof bezogen. Um größtmögliche Sterilität zu gewährleisten, werden die Herzen nach der Schlachtung direkt mit 4 °C NaCl (B.Braun, Melsungen) und Pen/Strep 10 ml/l (Biochrom, Berlin) gespült, die Aortenklappen unter sterilen Bedingungen herauspräpariert, erneut gespült und in einem sterilen Gefäß mit 4 °C kalter Ringerlactatlösung (B.Braun, Melsungen) und Pen/Strep 10 ml/l transportiert. Das Gefäß wird zusätzlich mit Eis gekühlt und durch Styropor isoliert. Zur Verhinderung einer Kontamination werden alle folgenden Schritte unter der Sterilbank durchgeführt (siehe Abbildung 5.8).

Die Herzklappe wird 5 mm oberhalb der Kommissuren abgetrennt und der Herzmuskel an der Einflussseite weitestgehend entfernt. Die seitlichen Gefäßausgänge bleiben erhalten, um eine möglichst native Strömung zu erzeugen. Die Herzklappe wird in einen Silikonring genäht. Der Silikonring wurde zuvor aus biokompatiblen Silikon (Elastosil E40, Wacker) mit einem bekannten Verfahren hergestellt. Der Ring wird mit einem Kabelbinder auf der Herzklappenhalterung befestigt.

Während der ganzen Vorbereitung wird die Herzklappe mehrfach in Endothelzellmedium (siehe Anhang A.1) gewaschen. Direkt vor dem Einbau in den Bioreaktor wird sie kurzfristig in 70 Vol. % Ethanol getaucht, mit Phosphate Buffered Solution (PBS, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gespült und in den Reaktor integriert. Für die Versuche werden

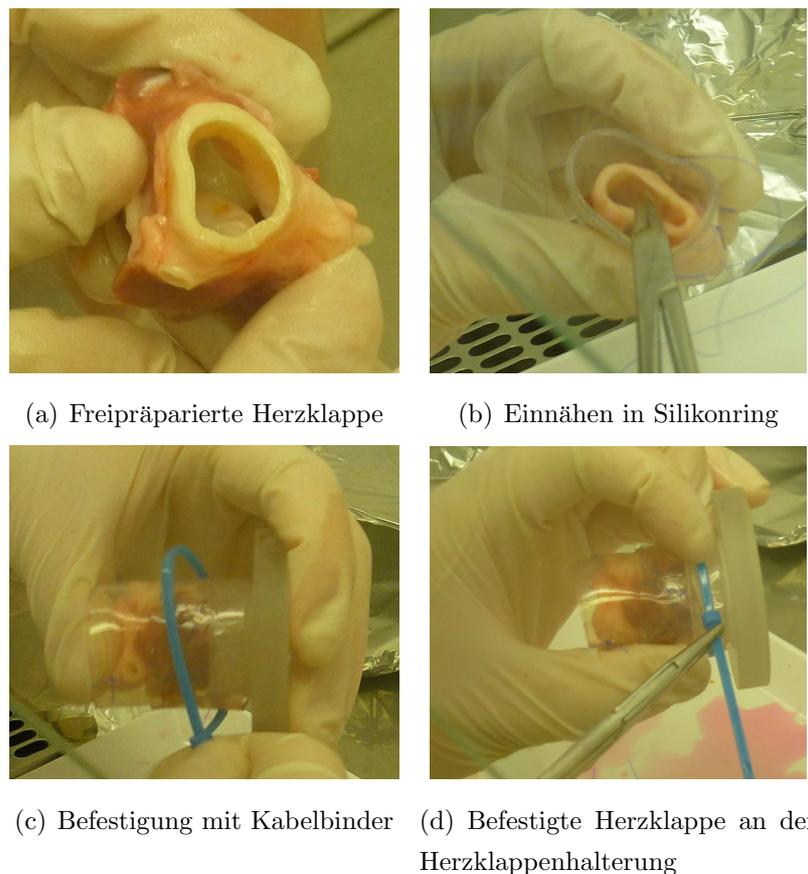


Abbildung 5.8: Präparation der Herzklappe. (a) Abtrennung oberhalb der Kommissuren, (b) Einnähen in Silikonring, (c) Fixierung der Herzklappe mittels Kabelbinder an der Herzklappenhalterung, (d) Fertigstellung für den Bioreaktor.

alle mit dem Fluid oder der Herzklappe in Kontakt kommenden Bauteile autoklaviert und unter der zuvor gereinigten Sterilbank zusammengebaut. Zur Vitalitätsprüfung der Herzklappe wird nach Versuchsende eine Live/Dead-Färbemethode angewendet. Hiermit lassen sich lebende und tote Zellen darstellen. Zum Kennzeichnen von Zellen wird je 1 ml Endothelzellmedium mit $1\ \mu\text{l}$ Calcein AM für lebende Zellen (Biotrend R, Köln, Prod.Nr. 80011) bzw. mit $1\ \mu\text{l}$ Ethidium Homodimer für tote Zellen (Sigma-Aldrich R, St. Louis, Prod.Nr. 46043-1MG-F) verwendet. Die Reihenfolge der Färbung ist im Anhang A.1 beschrieben. Aufgrund der kurzen Fluoreszenzdauer werden sofort Aufnahmen mit dem Laser Scanning Mikroskop (LSM, Carl Zeiss AG, Göttingen) durchgeführt. Die lebenden und toten Zellen werden mit einer Wellenlänge von 488 nm (Argon Laser) angeregt. Die lebenden Zellen emittieren aufgrund ihrer Färbung Licht mit einer Wellenlänge von 517 nm (grün), während tote Zellen mit einer Wellenlänge von 635 nm (rot) Licht emittieren. Für die Auswertung der LSM-Bilder wird das Open-Source-Programm ImageJ

verwendet. Mit diesem Programm ist es möglich, die Aufnahmen in die drei Kanäle (blau, grün, rot) aufzuteilen. Die Bilder haben eine 8-Bit Farbtiefe bei einer Bildgröße von 512×512 Pixel. Nachdem für das Grundrauschen des Detektors ein Farbwert von 20 ermittelt wird, können alle Pixel oberhalb dieses Farbwertes addiert werden. Damit ergibt sich die relative Fläche für die zwei Kanäle (grün, rot). Anschließend kann die relative Fläche der lebenden/toten Zellen mit der relativen Gesamtfläche ins Verhältnis gesetzt werden, um einen prozentualen Anteil an lebenden/toten Zellen zu erhalten.

5.2 Versuchsdurchführung

Zur Verifizierung der Versuche werden Taschenstücke, die direkt nach der Schlachtung präpariert und gefärbt werden, untersucht und dokumentiert. Diese Referenzaufnahme dienen zum direkten Vergleich der aus dem Bioreaktor stammenden Taschenstücke.

Die Herzklappe wird nach dem Einnähen und Fixieren an der Bioreaktorhalterung in den Bioreaktor integriert. Der Bioreaktor wird mit insgesamt 1,0l Endothelzellmedium befüllt. Es werden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, die nach 5, 9 bzw. 14 Tagen beendet werden. Dabei wird bei den 5- und 14-Tage-Versuchen die aortale Blutdruckamplitude bei ca. 30 mmHg eingestellt (Aortendruck ca. 120 mmHg), bei den 5- und 9-Tagen-Versuchen beträgt die aortale Blutdruckamplitude ca. 50 mmHg (systolischer Druck ca. 140 mmHg, siehe Abschnitt 5.1). Die Abbildung A.1 im Anhang A.1 verdeutlicht den jeweiligen Druckunterschied. Der Druck unterliegt Schwankungen, die physiologisch vorkommen können. Das Medium wurde im Abstand von drei Tagen erneuert, um eine konstante Nährstoffversorgung aufrecht zu erhalten. Der pH-Wert wurde regelmäßig kontrolliert. Nach Versuchsende wird die koronare Tasche der Herzklappe herausgeschnitten und in sechs Stücke in der Größe 4×6 mm zur Färbung vorbereitet. Zur Verifizierung werden für jede Versuchsreihe die gleichen Areale betrachtet (siehe Abbildung 5.9).



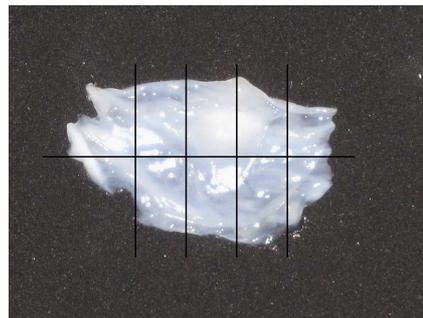
(a) Herzklappe aus dem Bioreaktor



(b) Aufgeklappte Herzklappe



(c) Freipräparation der Herzklappenta-
sche



(d) Schnittführung der Taschenstücke

Abbildung 5.9: (a) Die Herzklappe wird aus dem Bioreaktor entnommen, (b) danach zwischen den Taschen aufgeschnitten, (c) mit einem Skalpell wird die mittlere Tasche entfernt (koronare Tasche) und (d) in ca. 4×6 mm große Stücke geschnitten.

5.3 Ergebnisse

Zu Beginn der Versuche werden Referenzaufnahmen von Taschenstücken, die direkt nach der Schlachtung der Tiere und vor den Tests gefärbt wurden, aufgenommen. Die Referenzaufnahmen in Abbildung 5.10 zeigen eine deutliche Abgrenzung zwischen toten und lebenden Zellen. Der prozentuale Anteil an lebenden Zellen beträgt im Mittel 92 % (siehe Tabelle A.2 im Anhang A.1). Die toten Zellen sind unter anderem deutlich an den Schnittkanten der Herzklappe zu erkennen. Tote Zellen liegen vor, weil die Schlachtung der Tiere mehrere Stunden zurückliegt und die Herzklappe keiner natürlichen dynamischen Beanspruchung ausgesetzt ist. In bestimmten Bereichen ist eine Ausrichtung der Zellen zu erkennen.

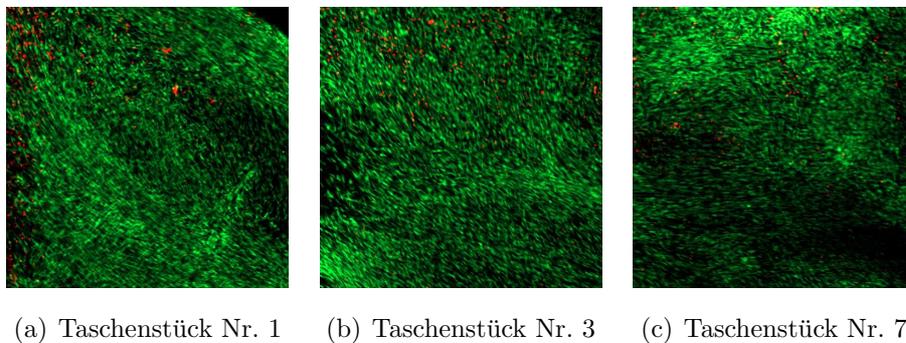


Abbildung 5.10: Referenzaufnahmen der Herzklappentaschenstücke gefärbt direkt nach der Schlachtung. Tote Zellen sind rot, lebende Zellen grün dargestellt.

Die Aufnahmen nach 5 Tagen Versuchsdauer mit einem Druckunterschied von 30 – 40 mmHg sind in Abbildung 5.11 und 5.12 zu sehen. Auch hier überwiegen die lebenden Zellen im Mittel mit 98,5 %.

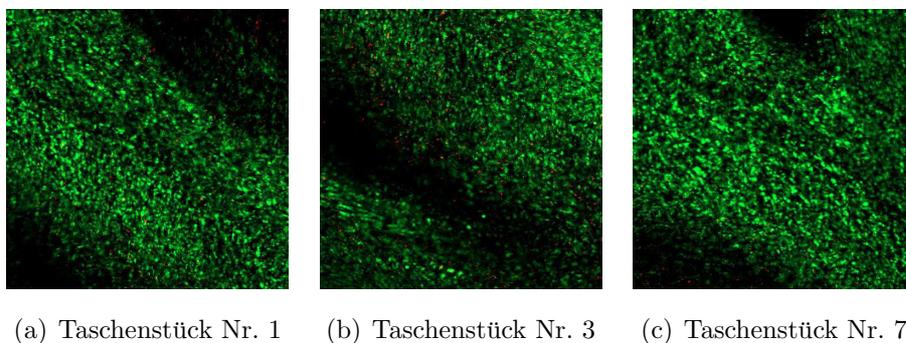


Abbildung 5.11: Aufnahmen der Herzklappentaschenstücke gefärbt nach 5 Tagen Versuchsdauer. Die Anzahl überlebender Zellen beträgt im Mittel 98,5 % bei einer aortalen Blutdruckamplitude von ca. 30 – 40 mmHg.

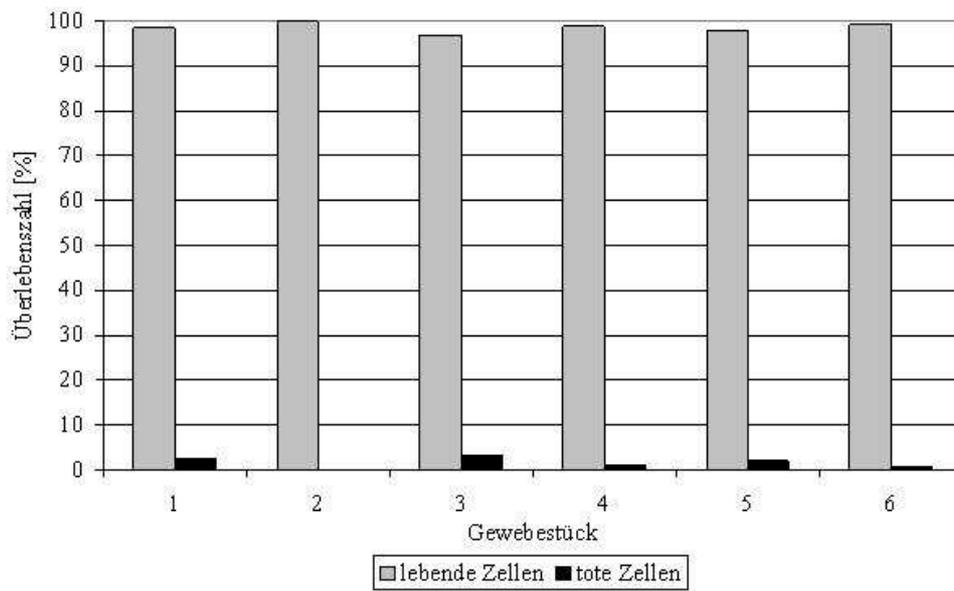
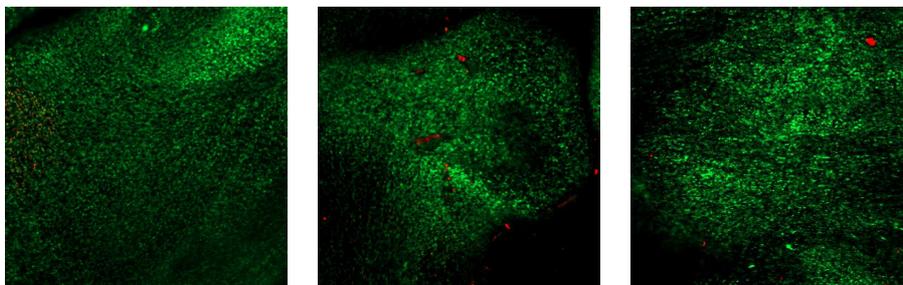


Abbildung 5.12: Prozentuale Verteilung der Zellen nach 5 Tagen Versuchsdauer bei einer aortalen Blutdruckamplitude von ca. 30 – 40 mmHg. Untersucht werden 6 Taschenstücke. Die Überlebensrate beträgt im Mittel mehr als 98 %.

Nach 14 Tagen Versuchsdauer beträgt die Anzahl überlebender Zellen im Mittel 97,8 % (siehe Abbildung 5.13 und Abbildung 5.14).



(a) Taschenstück Nr. 1 (b) Taschenstück Nr. 3 (c) Taschenstück Nr. 7

Abbildung 5.13: Aufnahmen der Herzklappentaschenstücke gefärbt nach 14 Tagen Versuchsdauer im Bioreaktor. Die Anzahl überlebender Zellen beträgt im Mittel 97,8% bei einer aortalen Blutdruckamplitude von ca. 30 – 40 mmHg. Flüssigkeitsbewegungen spülen die toten Zellen ab.

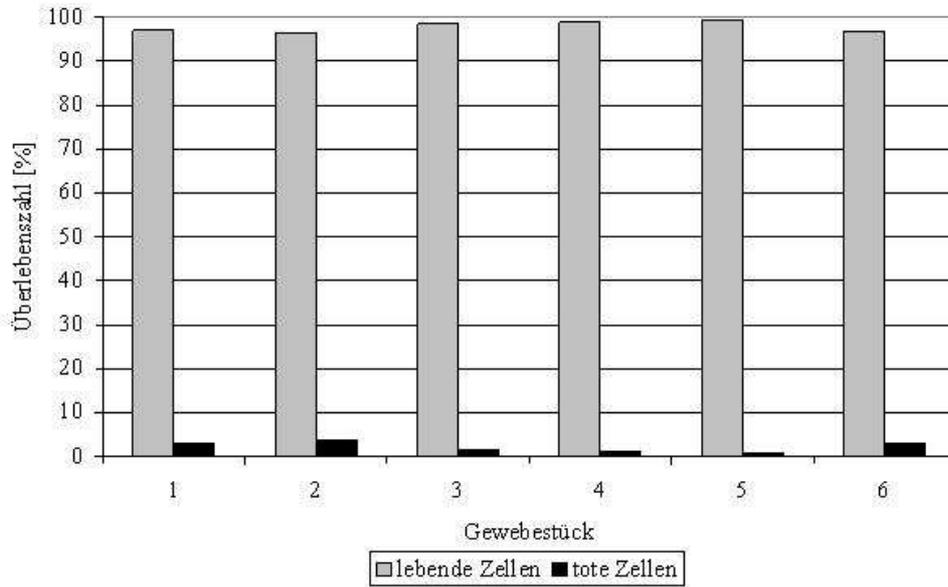
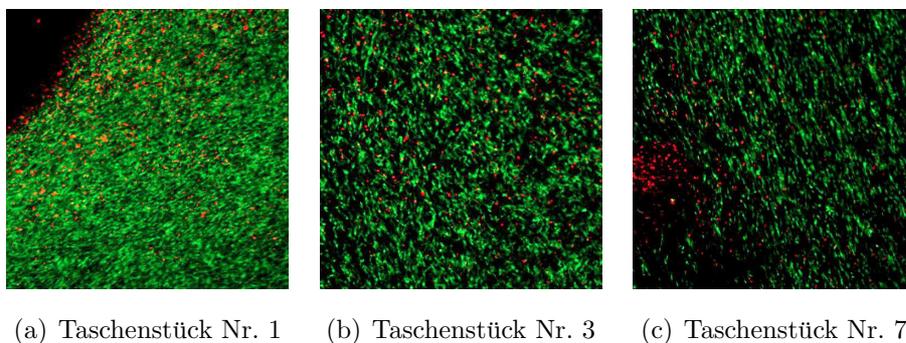


Abbildung 5.14: Prozentuale Verteilung der Zellen nach 14 Tagen Versuchsdauer bei einer aortalen Blutdruckamplitude von ca. 30 – 40 mmHg. Es werden 6 Taschenstücke untersucht. Bei allen untersuchten Stücken kann eine Überlebensrate von über 95 % im Mittel festgestellt werden.

Wird der Druck um ca. 20 mmHg (hypertoner Druck) erhöht, sterben vermehrt Zellen ab, obwohl die Aorta zeitweise einen höheren Druck aushalten sollte. Nach dem 5 Tage-Versuch überleben im Mittel 50 % (siehe Abbildung 5.15 und Abbildung 5.16). Auch die Aufnahme des Farbstoffes durch die Zellen ist abgeschwächt.



(a) Taschenstück Nr. 1 (b) Taschenstück Nr. 3 (c) Taschenstück Nr. 7

Abbildung 5.15: Überlebenszahl nach 5 Tagen mit aortaler Blutdruckamplitude von 50 – 60 mmHg. Die Färbung ist schwächer ausgeprägt als bei den vorangegangenen Versuchen. Hier beträgt die Überlebensrate im Mittel 50 %.

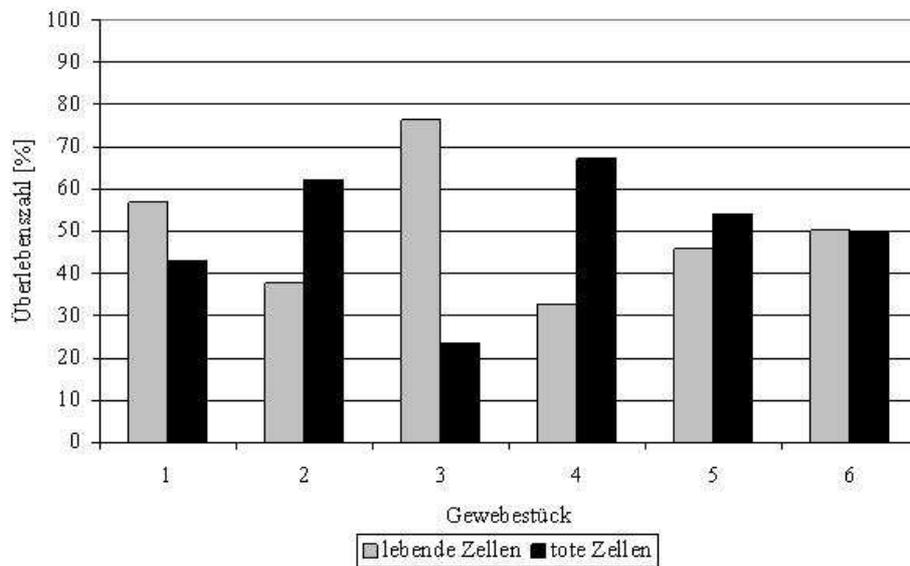


Abbildung 5.16: Prozentuale Verteilung der Zellen nach 5 Tagen bei aortaler Blutdruckamplitude von 50 – 60 mmHg. Es werden 6 Taschenstücke gefärbt und untersucht. Bei allen untersuchten Stücken kann eine Überlebensrate von 50 % im Mittel festgestellt werden.

Nach dem 9 Tage-Versuch überleben im Mittel nur noch 34 % (siehe Abbildung 5.17 und Abbildung 5.18).

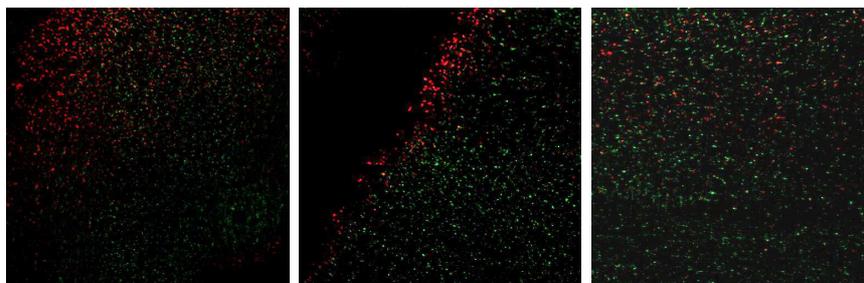


Abbildung 5.17: Überlebenszahl nach 9 Tagen mit aortaler Blutdruckamplitude von 50 – 60 mmHg. Eine Schwächung in der Aufnahme der Färbung ist zu erkennen. Es befinden sich vermehrt tote Zellen auf den Taschenstücken. Die Überlebensrate beträgt im Mittel nur noch 34 % im Mittel.

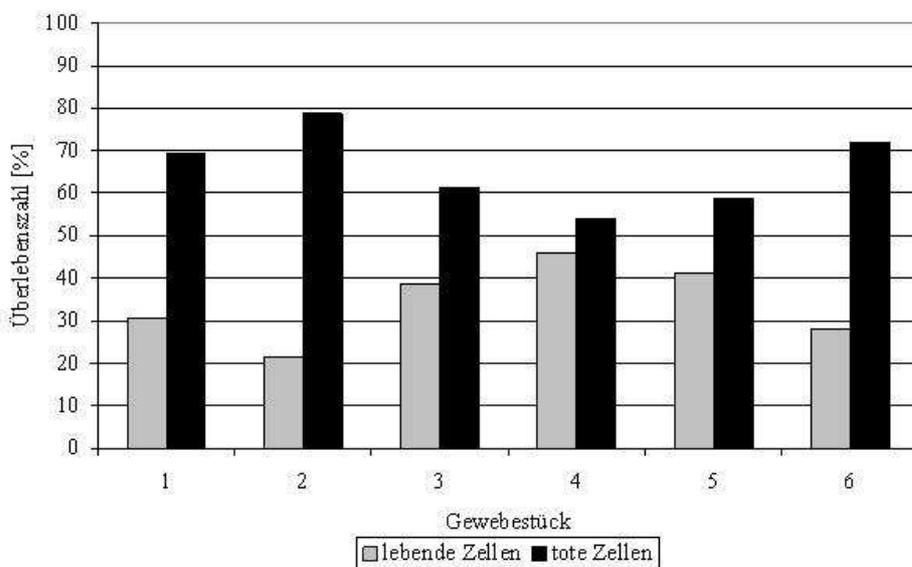


Abbildung 5.18: Prozentuale Verteilung der Zellen nach 9 Tagen bei aortaler Blutdruckamplitude von 50 – 60 mmHg. Es werden 6 Taschenstücke gefärbt und untersucht. Bei allen untersuchten Stücken kann eine Überlebensrate von 34 % im Mittel festgestellt werden.

Der pH-Wert wird nach jeder Versuchsreihe gemessen und dokumentiert (siehe Tabelle 5.1). Der leichte Abfall kann darauf hindeuten, dass tote Zellen im Medium vorhanden sind, da ihre Stoffwechselprodukte den pH-Wert beeinflussen.

Versuchszeitraum	pH-Wert (im Mittel)
vor Versuchsbeginn	7,40
5 Tage ($\Delta p = 30 - 40$ mmHg)	7,40
14 Tage ($\Delta p = 30 - 40$ mmHg)	7,39
5 Tage ($\Delta p = 50 - 70$ mmHg)	7,36
9 Tage ($\Delta p = 50 - 70$ mmHg)	7,33

Tabelle 5.1: Mittelwert des pH-Wertes nach Versuchsende

Mit der physiologischen aortalen Blutdruckamplitude von ca. 30 – 40 mmHg ist es möglich, eine Herzklappe über 14 Tage im Bioreaktor vital zu halten. Hypertonie (aortale Blutdruckamplitude von ca. 50 – 60 mmHg) führt zum Absterben der Zellen und somit zum Absterben der Herzklappe.

6 Untersuchungsmethoden von Kalzifizierungen

6.1 Visueller Nachweis von Kalziumphosphatablagerungen an Herzklappenbioprothesen

Nicht nur die Qualität, sondern auch die Quantität einer Kalzifizierung ist bei deren Untersuchung von großer Bedeutung. Genaue Aussagen über den Ort und das Ausmaß sind notwendig. Es ist noch nicht bekannt, ob eine Tissue Engineerte Herzklappe eine Kalzifizierungsneigung besitzt. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit hinsichtlich Anatomie und Morphologie wird davon ausgegangen, dass nach Jahren der Implantation Degenerationen auftreten werden. Dementsprechend ist es wichtig, nicht nur Strömungsuntersuchungen, sondern auch andere geeignete Methoden zu evaluieren, die eine Kalzifizierung aufdecken können. Kalzifizierungen werden heute mit Hilfe von Röntgen- bzw. Computertomographieverfahren quantifiziert. Jedem aus dem CT kommenden Voxel wird ein Intensitätswert zugeordnet, damit der Schwächungskoeffizient in unterschiedliche Grauwerte (Hounsfield Unit – HU) ausgegeben werden kann. Der Schwächungskoeffizient μ wird mittels der HU auf eine dimensionslose Skala übertragen. Die Skala bewegt sich zwischen -1024 und +3071. Wasser hat den Wert null, Luft -1000. Diese Werte werden zur Umrechnung benötigt. Die Hounsfield Unit berechnet sich wie folgt:

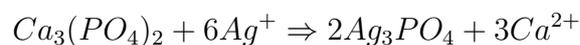
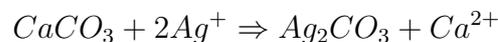
$$\text{CT-Zahl}(\mu) = 1000 \cdot \frac{\mu_{\text{Objekt}} - \mu_{\text{Wasser}}}{\mu_{\text{Wasser}}} \quad (6.1)$$

Je nach Dichte des Gewebes wird ein Grauwert bestimmt und ein HU-Fenster festgelegt. Dieses Fenster hat zwischen 0 und 255 unterschiedliche Grauwerte, durch die Kalzifizierungen sichtbar gemacht werden können. Dichtes Gewebe wie z. B. Knochen wird dadurch in hellen, weniger dichtes wie z. B. Weichgewebe in dunkleren Grautönen dargestellt. In der Literatur wird ein weiterer Bereich für eine Kalzifizierung definiert, in dem sich nicht nur kalkhaltiges, sondern auch dichteres Weichgewebe befindet. Dadurch werden Röntgenbilder hinsichtlich Kalzifizierung oftmals falsch interpretiert. Es manifestiert sich aufgrund von Überlagerung der Gewebeschichten bzw. dichtem Gewebe der Eindruck einer Kalzifizierung, die dort jedoch real nicht vorliegt. Dieses Problem soll im folgenden Kapitel erörtert und eine Methode etabliert werden, die den Grauwertebereich

einer tatsächlichen Kalzifizierung wiedergibt. Die Beurteilung einer tatsächlich kalzifizierten vitalen Herzklappe ist somit zukünftig möglich. Dieses wird anhand einer porcinen Herzklappe mittels hochauflösenden radiologischen und computertomographischen Methoden realisiert und quantitativ analysiert. Es werden μ -CT- und Röntgenaufnahmen an einer mit Hydroxylapatit präparierten Herzklappe durchgeführt. Die kalzifizierten Bereiche werden mit Hilfe eines μ -CT und dessen eingegrenzter Graustufenverteilung bestimmt. Anschließend wird die kalzifizierte Herzklappe in Epoxidharz für eine 2D-Schliffanalytik eingebettet. Die einzelnen 2D-Bilder der geschliffenen Probe werden mittels eines Schleifgerätes hergestellt und für einen besseren Kontrast vor jeder Aufnahme eingefärbt. Somit kann eine genaue Lokalisation der Kalzifizierung nachgewiesen werden. Diese Bilder der geschliffenen Probe werden mit den Schnittbildern des μ -CT verglichen und anhand von Literaturwerten verglichen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen Aufklärung über die genauen Graustufenbereiche in einer μ -CT-Aufnahme geben, in denen sich die Kalzifizierung befindet. Die Anwendung des CT und der μ -CT haben sich schon in anderen Studien bewährt [15]. Dies wird in Kapitel 7 diskutiert.

Färbemethode nach von Kossa und Graustufenbereichbestimmung

Kalzifizierungen können mit unterschiedlichen Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Eine Methode ist die von Kossa Färbung. Die Silberionen aus der Silbernitrat-Färbelösung reagieren mit Carbonat- und Phosphationen im Gewebe und ersetzen die Kalziumionen. Durch anschließende Lichteinstrahlung werden die Silberionen zu metallischem Silber reduziert und die nicht reduzierten Silberionen durch Natriumthiosulfat entfernt. Es resultiert eine einheitliche Schwärzung aller mineralisierten, vor allem kalziumphosphathaltigen, Gewebeteile [148, 149]. Die chemischen Reaktionen dieser Färbemethode sind im Folgenden dargestellt:



Die von Kossa Methode ist eine bevorzugte Färbemethode für viele biologische und medizinische Bereiche. Jedoch liegt der Nachteil der Methode in der Bewertung der Kalzifizierungen. Es gibt eine subjektive Einordnung verschiedener Kalzifizierungsgrade von eins bis sechs. Kalzifizierungsgrad „eins“ bedeutet eine punktförmige, „sechs“ die fast völlige Schwarzfärbung der Probenoberfläche. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass nur die Oberfläche gefärbt wird und eine dreidimensionale Auswertung nicht stattfinden kann.

Dieses Problem kann z. B. mit der Erstellung von Schnittpräparaten mit anschließender Schliffärbung und Schliffanalyse gelöst werden.

6.1.1 Material und Methoden

Aus einem Schweineherzen, das unmittelbar nach der Schlachtung des Tieres erworben wurde, wird die Aortenklappe freipräpariert. Die anschließende Fixierung der Herzklappe wird, wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben, durchgeführt. Die Herzklappe wird mit einem Skalpell aufgeschnitten, sodass taschenförmige Öffnungen in der Aortenwand entstehen. Diese Öffnungen werden mit Hydroxylapatit gefüllt und zugenäht (Nanopuder, < 200 nm Partikelgröße, 97 %, synthetisch, Sigma Aldrich, Steinheim). Hierdurch wird die definierte Lokalisation von Hydroxylapatit sichergestellt. Vor und nach der Einbettung wird die Herzklappe mittels Röntgenanalyse und CT untersucht, um die präparierten Bereiche an der Probe sichtbar zu machen. Die Röntgenuntersuchungen erfolgen an der Medizinischen Hochschule Hannover mit einem Mammographiegerät der Firma GE. Daten hierzu sind im Anhang A.2 aufgelistet.

Röntgenuntersuchung

Es werden vor und nach der Einbettung Röntgenbilder erstellt. Eine qualitative sowie quantitative Untersuchung der kalzifizierten Bereiche kann somit analysiert werden. Die Röntgenaufnahmen werden mit dem Programm syngo fastView bearbeitet, sodass die kalzifizierten Bereiche der Probe sich von dem umgebenden Gewebe farblich absetzen und deutlich sichtbar werden.

Nach der Anpassung der Grauwerte der Röntgenbilder erfolgt die anschließende weitere Bearbeitung mit dem Programm ImageJ. Das Bild wird ausgeschnitten und binarisiert (0 entspricht schwarz, 255 weiß). Somit kann eine genaue Differenzierung zwischen Kalzifizierung (weißer Bereich) und Gewebe (schwarzer Bereich) gemacht werden (siehe Abbildung 6.1). Diese Differenzierung wird anhand der Pixelzahl durchgeführt. Der Grad der Kalzifizierung der Probe wird mit dem Quotienten aus Anzahl der weißen Pixel zu Anzahl aller Pixel in Prozent angegeben [150].

μ -CT-Untersuchung

Die Röntgenanalyse von kalzifiziertem Gewebe wird, wie auch bereits in anderen Arbeiten diskutiert [15, 151, 152], eher bei planaren 2D-Strukturen angewendet. Hier fehlt jedoch die vertikale Information über die Kalzifizierung, die durch einfache Röntgenanalyse nicht

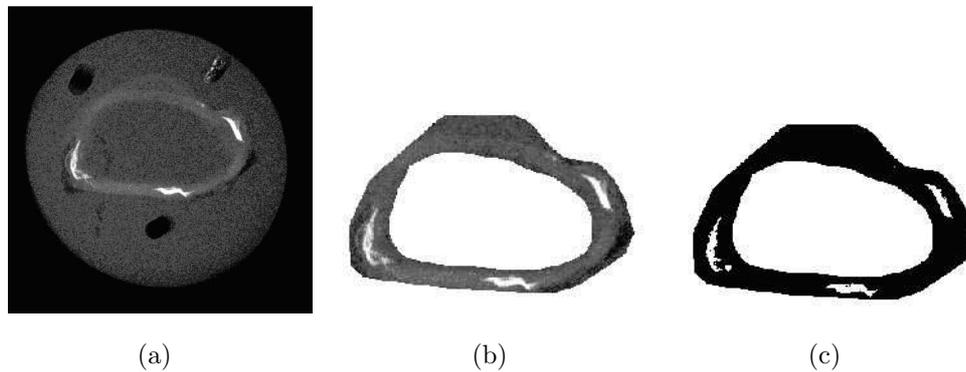


Abbildung 6.1: Vorgehensweise zur Bestimmung des Kalzifizierungsgrades. Abgebildet ist eine Herzklappe ohne Taschen. Aus der Röntgenaufnahme (a) wird der betroffene Bereich ausgeschnitten (b) und binarisiert (c). Somit sind die Kalzifizierungsablagerungen deutlich zu erkennen. Die weißen Pixel (kalzifizierter Bereich) werden nun durch die Gesamtpixelzahl dividiert. Daraus resultiert der Grad der Kalzifizierung.

gegeben ist. Die untersuchte Probe besitzt besonders in der vertikalen Position wichtige Informationen, sodass diese Höhenunterschiede bei der Kalzifizierungsanalyse berücksichtigt werden müssen. Aus diesem Grund ist es vorteilhafter, μ -CT-Aufnahmen für die Kalzifizierungsbestimmung anzuwenden, da die μ -CT die Informationen der gesamten Probe als 3D-Struktur in allen drei Raumrichtungen darstellt. Die CT Untersuchungen werden am Deutschen Institut für Kautschuktechnologie e.V. mit einem nanotom[®] (Phoenix—x-ray, Hannover, Deutschland) durchgeführt. Die Einstellparameter sind dem Anhang A.2 zu entnehmen. Die Bearbeitung der μ -CT-Schnittbilder erfolgt mit dem Programm VG-Studio MAX 2.1. Die Aufnahmen werden für verschiedene HU-Fenster im tif-Format gespeichert. Eine geeignete Bezugsfläche des zu analysierenden Gewebebereiches wird ausgewählt (siehe Abbildung 6.2(a)). Vor der Binarisierung wird ein passendes HU-Fenster gewählt, um die Graustufen zuordnen zu können.

Für die Auswertung der Ergebnisse werden zunächst zwei HU-Fenster bestimmt, wobei die Werte in einem ähnlichen Bereich mit den Literaturwerten liegen [134, 153]. Alle HU-Fenster, die in dieser Arbeit untersucht werden, sind im Anhang aufgelistet.

Schleifen und Färben der Probe

Für die anschließende histologische Untersuchung wird die Probe entwässert und getrocknet. Die Entwässerung erfolgt schrittweise in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Anhang A.2) und anschließender Lufttrocknung für 24 Stunden. Danach wird die Probe in

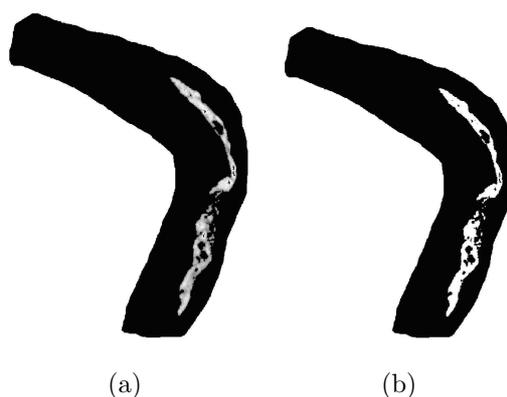


Abbildung 6.2: Aufnahme der eingebetteten, präparierten Herzklappe (Ausschnitt aus Abbildung 6.1) mit einem HU-Fenster 100 – 600 HU, (a) μ -CT Graustufenbild, (b) binarisiertes Bild. Bevor die Aufnahmen binarisiert werden, um anschließend den prozentualen Kalzifizierungsanteil aus Anzahl der weißen Pixel zur Anzahl der Bezugsflächenpixel zu bilden, muss ein passendes HU-Fenster ausgewählt werden, um die Graustufen zuordnen zu können.

Epoxidharz eingebettet. Mit dem Schleif- und Poliergerät 648-PXB-22829 (Buehler GmbH, Düsseldorf, Deutschland) wird die Probe geschliffen. Zunächst wird der Epoxidharzblock unter laufendem Wasser mit SIC-Schleifpapier P2500 geschliffen und anschließend mit SIC-Schleifpapier P4000 poliert. Der Epoxidharzblock wird während der Bearbeitung in den Probenhalter eingespannt und gegen den Schleifteller gepresst. Die Anpresskraft wird mechanisch über den Federdruck eingestellt. In den Bereichen, die stark kalzifiziert sind, werden ca. 20 μ m abgeschliffen, 50 μ m in den Bereichen, die wenig bzw. nicht kalzifiziert sind. Die geschliffene Probe wird nach jedem Schleifvorgang mit einer Mikrometerschraube (Mitutoyo, Neuss, Deutschland) vermessen. Die histologische Färbung wird nach der von Kossa Methode vorgenommen, für die eine 5 % Silbernitratlösung verwendet und eine 5 % Natriumthiosulfatlösung (10 g Natriumthiosulfat in 200 mg Aqua Bidest, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) angesetzt wird. Nach jedem Schleif- und Poliervorgang wird die geschliffene Probe gefärbt. Dabei wird das im Anhang A.2 erwähnte Färbeprotokoll benutzt. Nach dem Schleifen und Färben der Probe werden zur Bilderfassung Aufnahmen mit dem Stereomikroskop Discovery V.12 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) gemacht. Die Probe wird auf eine warme Knetmasse gelegt und mit einem Pressstempel in horizontale Position gepresst.

2D-Schliffanalytik des eingebetteten Herzklappengewebes

In Abbildung 6.3(a) ist eine Lichtmikroskopaufnahme des rechten Herzklappenrandes der präparierten Probe dargestellt. Der längliche, schwarze Bereich im Herzklappenrand stellt den gefärbten, kalzifizierten Bereich dar und wird für die weitere Bestimmung benutzt.

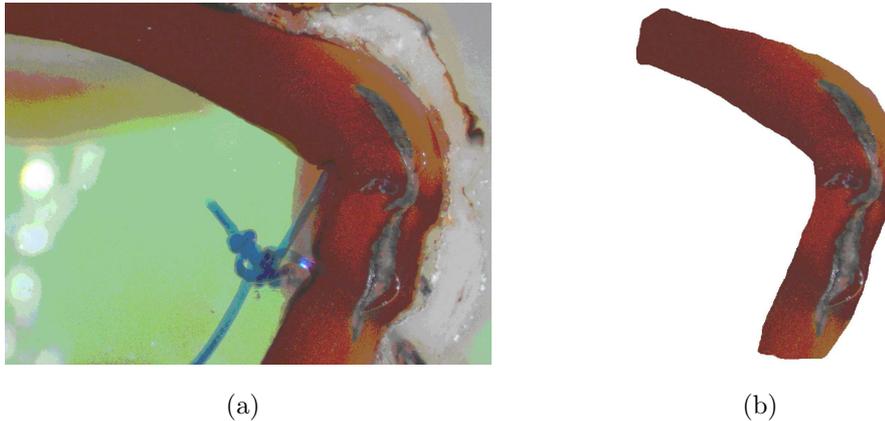


Abbildung 6.3: Ausschnitt aus der Lichtmikroskopaufnahme der präparierten Herzklappe. (a) Originalaufnahme mit schwarzem, kalzifiziertem Bereich (von Kossa färbt Calcium schwarz), (b) Bezugsfläche der kalzifizierten Probe. Mit dieser Methode wird der Bereich der tatsächlichen Kalzifizierung untersucht.

Für die weitere Bildbearbeitung wird eine genau definierte Fläche des Gewebes mit dem Programm GIMP 2.6.11 ausgewählt. Diese Fläche dient als Bezugsfläche für die Kalzifizierungsbestimmung (siehe Abbildung 6.3(b)). Die Bezugsfläche wird bei jeder Aufnahme konstant gehalten, um eine Reproduzierbarkeit der Bilder zu ermöglichen.

Für die jeweilige Zuordnung werden die histologisch gefärbten Strukturen identifiziert und markiert, um den kalzifizierten Bereich wiederum vom umgebenden Gewebe unterscheiden und abgrenzen zu können. Es werden für die schwarz gefärbten Bildbereiche ähnliche Farbwerte und eine maximale Farbdifferenz gewählt (siehe Abbildung 6.4). Bei den Bildern der geschliffenen Probe wird ebenfalls die Methode der Binarisierung gewählt (weiß = Kalzifizierung, schwarz = umliegendes Gewebe) (siehe Abbildung 6.4(b)).



Abbildung 6.4: (a) Bearbeitete Lichtmikroskopaufnahme mit identifizierten Farbwerten, (b) binarisierte Aufnahme (weiß = Kalzifizierung, schwarz = Gewebe). Der kalzifizierte Bereich wird durch die Zählung der einzelnen Pixel bestimmt.

6.1.2 Ergebnisse

Röntgen- und μ -CT-Untersuchungen

Die Röntgenbilder liefern folgende Ergebnisse für die nicht eingebettete und eingebettete Probe (Tabelle 6.1):

Bezeichnung	Anzahl weißer Pixel	Anzahl aller Pixel	Kalzifizierungsgrad
vor Einbettung	3 613	118 189	3,06 %
nach Einbettung	1 627	19 312	8,42 %

Tabelle 6.1: Anzahl der jeweiligen Pixel und der Kalzifizierungsanteil für die nicht eingebettete und eingebettete Herzklappenprobe in den Röntgenaufnahmen.

Die untersuchte Probe besitzt nach der Einbettung einen etwa 3-fach höheren prozentualen Kalzifizierungsanteil als vor der Einbettung. Der Gewebevolumenanteil (Anzahl aller Pixel) hat sich durch die Trocknung der Probe um das 6-fache verkleinert, während die Fläche der kalzifizierten Bereiche nur um den Faktor 2,5 abnimmt. Der Kalzifizierungsanteil für die präparierte Herzklappe, untersucht nach der von Kossa Methode, ist in Tabelle 6.2 dargestellt.

Schliff-Nr.	Anzahl weißer Pixel	Anzahl aller Pixel	Kalzifizierungsgrad
1	9 227	287 917	3,21 %
2	8 567	287 917	2,98 %
3	6 627	287 917	2,95 %
4	10 123	287 917	3,51 %
5	11 163	287 917	3,89 %
6	14 363	287 917	4,98 %
7	11 552	287 917	4,02 %
8	9 833	287 917	3,42 %
9	9 898	287 917	3,43 %
10	10 041	287 917	3,48 %

Tabelle 6.2: Anzahl der jeweiligen Pixel und die Kalzifizierungsanteile für die eingebettete, präparierte Herzklappe nach der von Kossa Färbung.

Bei der Berechnung des prozentualen Kalzifizierungsanteils muss beachtet werden, dass die Auswahl und Zuordnung der schwarz gefärbten bzw. kalzifizierten Flächen nicht eindeutig definiert werden kann. Dies beruht auf den subjektiven Einschätzungen. Der statistisch schwankende Messfehler wird ausgewertet, indem eine Lichtmikroskopaufnahme dreimal unabhängig voneinander ausgewertet wird. Diese Werte inklusive des berechneten Mittelwerts sind in Tabelle 6.3 dargestellt.

Analyse	Anzahl weißer Pixel	Anzahl aller Pixel	Kalzifizierungsgrad
1	9 345	287 917	3,24 %
2	9 746	287 917	3,38 %
3	9 224	287 917	3,21 %
		Mittelwert	3,27 %

Tabelle 6.3: Anzahl der Pixel, Kalzifizierungsanteile und Standardabweichung für eine Aufnahme der geschliffenen, eingebetteten, präparierten Herzklappe

Jedes Bild der geschliffenen Probe besitzt eine genau definierte Schliffprobentiefe von $25 \pm 3 \mu\text{m}$. Somit kann ein Tiefenprofil des kalzifizierten Bereiches dargestellt werden.

Für eine genaue Auswertung der Kalzifizierungsanteile aus Tabelle 6.2 werden diese in Abbildung 6.5 gegen die einzelnen Bilder der geschliffenen Probe aufgetragen.

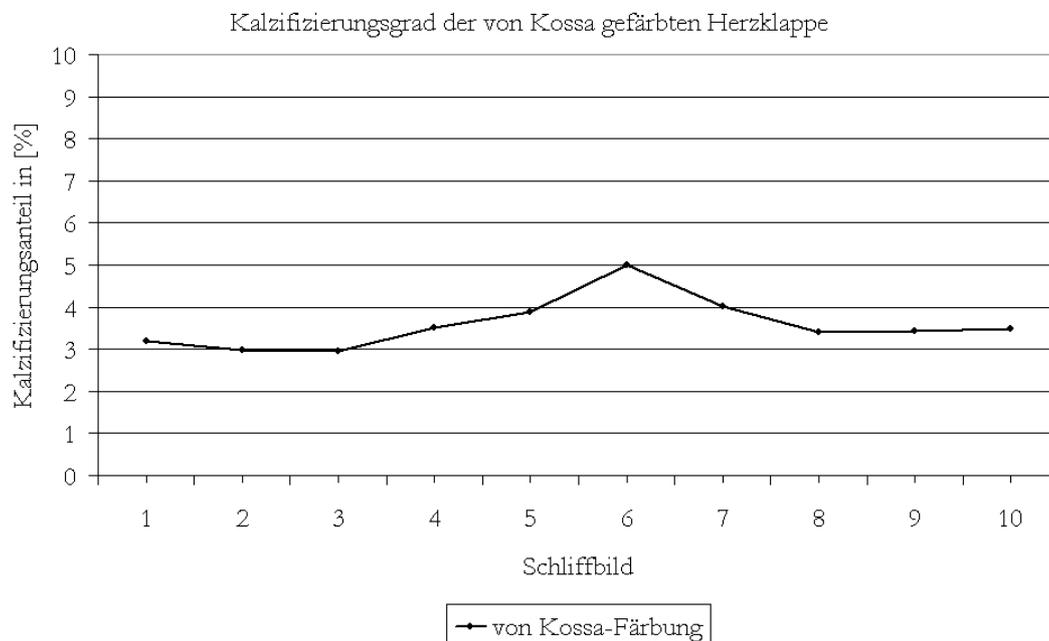


Abbildung 6.5: Auftragung des prozentualen Kalzifizierungsanteils gegen die einzelnen Bilder der geschliffenen Probe zur Erstellung eines Tiefenprofils. Aufgrund der definierten Probentiefe kann aus den von Kossa gefärbten Bildern ein Tiefenprofil erstellt werden.

Abbildung 6.5 weist einen ebenen Verlauf auf, mit einem gleichmäßig ansteigenden Kalzifizierungsanteil, welcher bei der 6. Bildaufnahme ($135 \mu\text{m}$ Tiefe) das Maximum erreicht. Bei der Betrachtung der weiter unten liegenden Bilder der geschliffenen Probe, lässt sich ein stetig abfallender Kalzifizierungsanteil beobachten. Es lassen sich zwischen den einzelnen Bildern keine Unterschiede erkennen. Dies spricht für eine homogene Verteilung des Hydroxylapatits innerhalb der Probe.

Vergleich der Bilder der geschliffenen Probe und der Schnittbilder des $\mu\text{-CT}$

Die im vorherigen Kapitel bestimmten Kalzifizierungsanteile werden mit den Kalzifizierungsanteilen aus den $\mu\text{-CT}$ -Schnittbildern verglichen. Die $\mu\text{-CT}$ -Schnittebenen müssen für einen solchen Vergleich den passenden Bildern der von Kossa gefärbten Herzklappenprobe zugeordnet werden. Das Tiefenprofil der Probe ist durch Aufsummierung der einzelnen Schliffwerte bekannt. Somit können die Schnittebenen der $\mu\text{-CT}$ -Aufnahmen mit den exakten Bildern der geschliffenen Probe verglichen werden. Mit Hilfe einer graphischen Auftra-

gung werden die Kalzifizierungsanteile, die aus je zwei HU-Fenstern der μ -CT-Aufnahmen bestimmt werden, mit den Ergebnissen der Abbildung 6.5 verglichen (siehe Abbildung 6.6 und Tabelle 6.4).

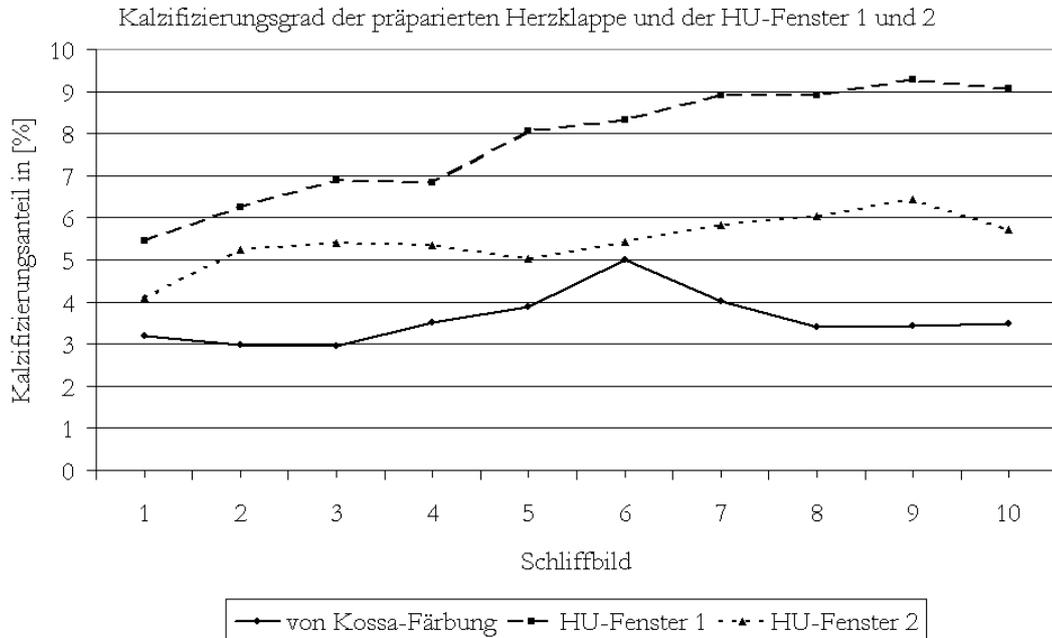


Abbildung 6.6: Vergleich des prozentualen Kalzifizierungsanteils aus der von Kossa Färbung und den analysierten HU-Fenstern 1 und 2 der μ -CT-Bilder gegen die einzelnen Bilder der geschliffenen Probe aufgetragen. HU-Fenster 1: 100 – 600, HU-Fenster 2: 250 – 500. Es ist deutlich zu erkennen, dass die HU-Werte nicht mit den Bildern der geschliffenen Probe korrelieren.

Fensterbezeichnung	HU-Wertebereich
HU-Fenster - Literatur	262 – 512
HU-Fenster 1	100 – 600
HU-Fenster 2	250 – 500

Tabelle 6.4: Unterschiedliche HU-Fensterbereiche

In der Abbildung ist der Verlauf der Kalzifizierungsanteile aus den μ -CT-Bildern der beiden HU-Fenster 1 und 2 sowie aus der von Kossa Färbung dargestellt. Das HU-Fenster 1 (100 – 600 HU) weist etwa doppelt so große Werte für die Kalzifizierung auf, verglichen mit dem von Kossa Ergebnis. Auch das HU-Fenster 2 liefert nur eine grobe Übereinstimmung.

Es werden zwei weitere HU-Fenster für eine genauere Eingrenzung gewählt (siehe Tabelle 6.5). Die prozentualen Kalzifizierungsanteile der präparierten Herzklappenprobe werden mit den neu gewählten HU-Fenstern berechnet und in Abbildung 6.7 dargestellt.

Fensterbezeichnung	HU-Wertebereich
HU-Fenster 3	200 – 450
HU-Fenster 4	250 – 450

Tabelle 6.5: Werte der HU-Fenster für die weitere μ -CT-Auswertung

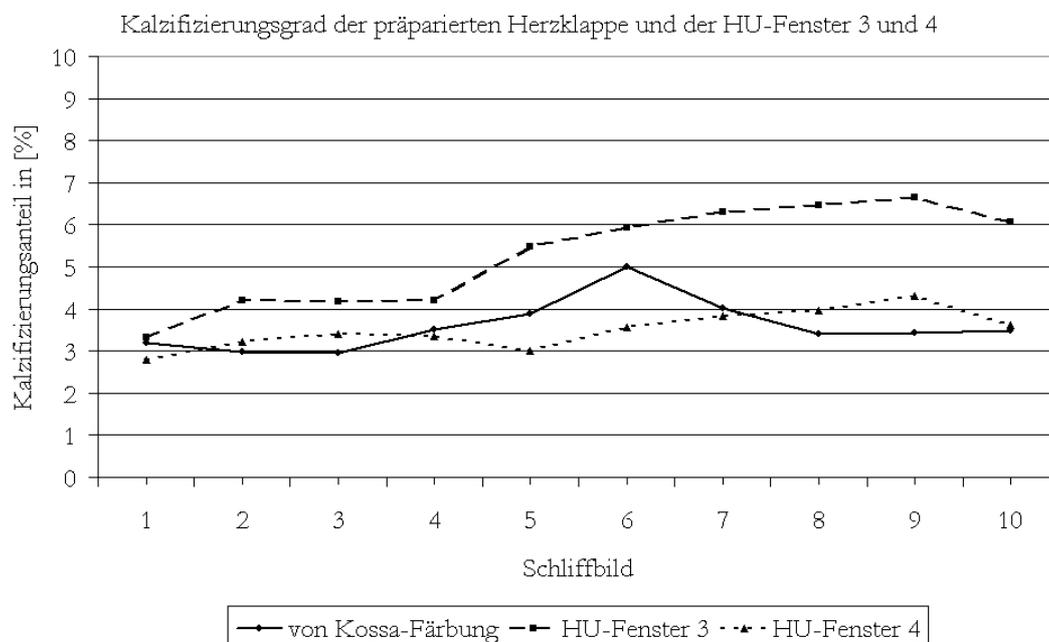


Abbildung 6.7: Vergleich des prozentualen Kalzifizierungsanteils aus der von Kossa Färbung und den analysierten HU-Fenstern 3 und 4 der μ -CT-Bilder gegen die einzelnen Bilder der geschliffenen Probe aufgetragen. HU-Fenster 3: 200 – 450, HU-Fenster 4: 250 – 450. Das HU-Fenster 4 hat eine sehr gute Näherung zu der von Kossa Färbung.

Die Werte der Kalzifizierungsanteile aus der Berechnung mit dem HU-Fenster 4 (250 – 450) nähern sich den Kalzifizierungswerten der von Kossa Färbung, was durch Abbildung 6.7 bestätigt wird. Besonders für die Bilder der geschliffenen Probe zwischen 1 und 4 sowie 7 und 10 kann eine gute Übereinstimmung festgestellt werden.

Für eine weitere Eingrenzung wird das HU-Fenster weiter minimiert. Es wird versucht, deckungsgleiche Ergebnisse für den Kalzifizierungsanteil aus den beiden Methoden zu erhalten. Das HU-Fenster 5 bzw. 6 schließt die HU-Werte von 300 – 450 bzw. 250 – 400 ein. Die entsprechenden Kalzifizierungsanteile werden in Tabelle A.5 berechnet und in Abbildung 6.8 dargestellt.

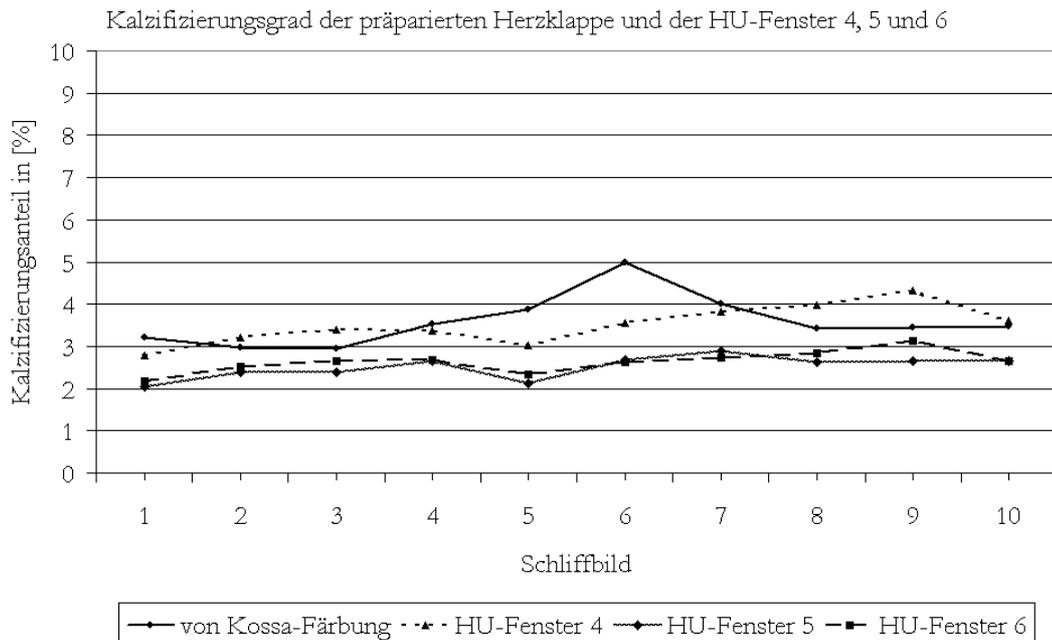


Abbildung 6.8: Vergleich des prozentualen Kalzifizierungsanteils aus der von Kossa Färbung und den analysierten HU-Fenstern 4 bis 6 der μ -CT-Bilder gegen die einzelnen Bilder der geschliffenen Probe aufgetragen. (HU-Fenster 4: 250 – 450, HU-Fenster 5: 300 – 450, HU-Fenster 6: 250 – 400). HU-Fenster 5 und 6 weisen eine Unterschreitung der Bilder der geschliffenen Probe auf.

Eine weitere Eingrenzung der HU-Werte führt zu einer Unterschätzung der Kalzifizierungsanteile. Folglich befindet sich die Kalzifizierung der präparierten Probe in einem HU-Fenster von 250 – 450 HU. Der Verlauf der Kalzifizierungsanteile aus den μ -CT-Bildern aller untersuchten HU-Fenster ist im Anhang A.2 dargestellt. Es kann somit ein genauer Graustufenbereich der μ -CT-Aufnahmen mit Hilfe der von Kossa gefärbten Bilder der präparierten Herzklappe definiert werden. Dieser befindet sich bei 250 – 450 HU und kann zukünftig für Kalzifizierungsuntersuchungen von Tissue Engineerten Herzklappen angewendet werden.

6.2 Experimentelle Strömungsvermessung an Herzklappen mittels Particle Image Velocimetry (PIV)

Strömungsuntersuchungen sind in vielen technischen Bereichen der erste Schritt zu einem neuen Produkt. Kavitationen können ausgeschlossen, Rezirkulationszonen minimiert oder Störfelder aufgedeckt werden. Hochauflösende Messungen von örtlichen Geschwindigkeitsvektoren zur Bestimmung eines Strömungsfeldes werden mit der Particle Image Velocimetry (PIV) durchgeführt. Ein 2D-PIV-System besteht aus einem Laser, der die in der Strömung befindlichen Partikel zum Reflektieren anregt, und einer CCD-Kamera, die die Reflexion mit zwei hintereinander folgenden Bildern aufnimmt. In Abbildung 6.9 ist das Prinzip der Particle Image Velocimetry dargestellt.

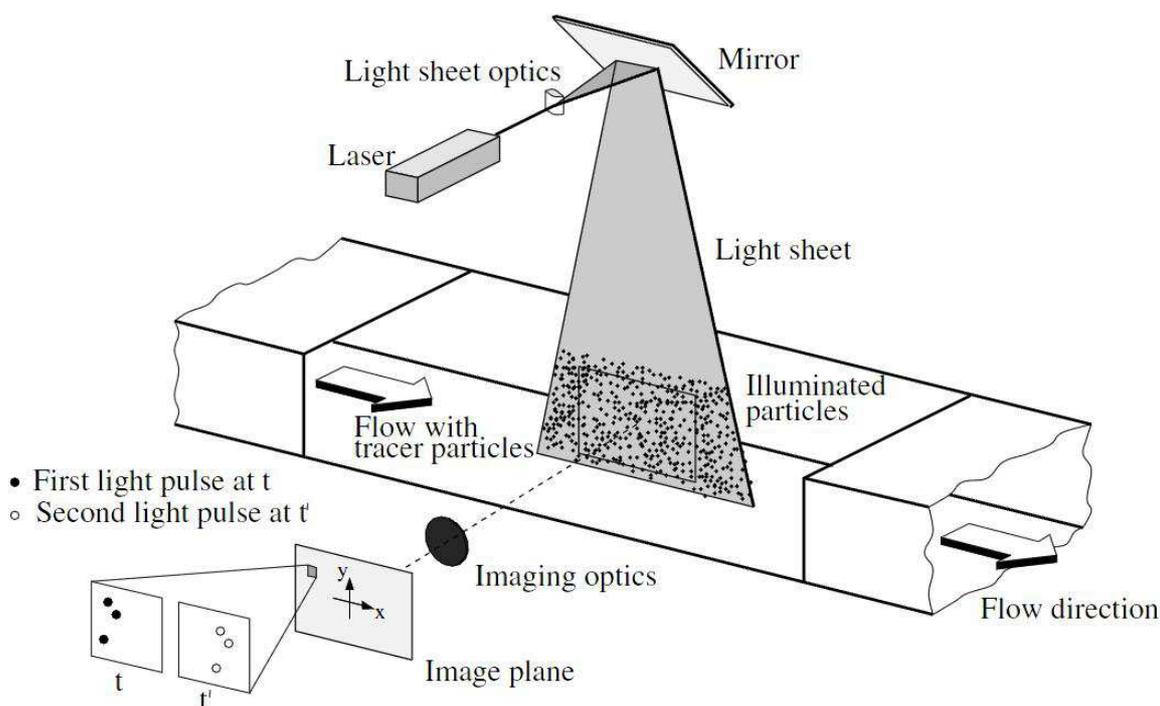


Abbildung 6.9: Prinzip der Particle Image Velocimetry [154]. Der Laser regt mit seinem Licht die Partikel in der Flüssigkeit an. Die Reflexionen der Partikel werden von einer Kamera nacheinander aufgenommen und die Fläche in Abfragefenster unterteilt. Somit kann der Verschiebungsvektor für jedes Fenster lokal berechnet werden.

Die so beleuchtete Ebene wird in mehrere Abfragefenster unterteilt, damit für jedes Fenster der lokale Verschiebungsvektor berechnet werden kann. Der lokale Geschwindigkeitsvektor $\vec{u}(x, y)$ wird zusammen mit dem Zeitversatz Δt zwischen den zwei Beleuchtungen berechnet zu (Gleichung 6.2):

$$\vec{u}(t_0, \vec{z}) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\vec{z}(t_0) - \vec{z}(t_0 + \Delta t)}{M \Delta t} \quad (6.2)$$

mit M als Abbildungsmaßstab, \vec{z} als Ortsvektor eines Tracerpartikels und \vec{u} als Geschwindigkeitsvektor.

Die Berechnung des Geschwindigkeitsfeldes aus den aufgenommenen Bildern stellt das Ziel einer PIV-Berechnung dar. Die einzelnen Geschwindigkeitsvektoren des Strömungsfeldes werden mit Gleichung 6.3 berechnet. Die Bestimmung der örtlichen Verschiebungsvektoren erfolgt mit Hilfe der Kreuzkorrelation. Hierbei werden die Signale der beiden Bilder miteinander verglichen. Die Korrelationsfunktion dafür lautet

$$\Phi_k(m, n) = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} g_1(i, j) g_2(i + m, j + n) \quad (6.3)$$

Für die Herstellung gezüchteter Herzklappen ist eine möglichst physiologische Durchströmung wichtig. Kalzifizierte Klappen weisen andere Strömungsprofile auf als native Klappen. Die Vermessung der Strömung hinter biologischen Herzklappen ist bisher nur von vereinzelt Forschergruppen durchgeführt worden. Das Messen der Strömung durch kalzifizierte Herzklappen stellt hierbei ein neues Gebiet dar, welches unter bestimmten Gesichtspunkten wie z. B. Klappendesign oder Materialauswahl von großem Interesse ist. In den folgenden Versuchen soll der Einfluss der Kalzifizierung auf die Strömung hinter den Herzklappen sichtbar gemacht werden.

6.2.1 Material und Methoden

Herzklappenvorbereitung

Die Herzklappenvorbereitung entspricht der in Kapitel 5.1 beschriebenen. Aufgrund der Versuchsdurchführung muss bei diesen Herzklappen nicht auf die Einhaltung der Sterilität geachtet werden. Außerdem werden die Herzklappen direkt oberhalb der Kommissuren beschnitten und die Gefäßausgänge verschlossen. Somit sind die Klappen in ihrer Höhe identisch, die jeweiligen Durchmesser betragen zwischen 15,5 und 19,5 mm (siehe hierzu Tabelle A.8 im Anhang A.3). Direkt nach der Entnahme aus dem Herzen und der notwendigen Präparation wird die Strömung durch die nativen Aortenklappen mittels der

PIV hinsichtlich ihrer Strömungsformen und Axialgeschwindigkeiten untersucht. Danach werden sie für zwei Stunden in 0,6% Glutaraldehyd fixiert und anschließend für 24 Stunden in 0,2% Glutaraldehyd gelagert (Zusammensetzung siehe Anhang A.3). Nach der Fixierung wird die Strömung erneut mit der PIV vermessen. Anschließend werden sie mit dem Fatigue Accelerated Calcification Tester (FACT), in dem die Klappen mit dem 1.5SBF durchströmt werden, kalzifiziert. Während der Durchströmung der Herzklappen kommt es zur Ablagerung und Ausfällung von Calciumphosphat in und am Klappengewebe. Für eine beschleunigte Kalzifizierung wird das Fluid dreimal täglich im Abstand von sieben bis neun Stunden ausgewechselt. Die Temperatur beträgt konstant 37 °C und der Druck wird auf eine Druckdifferenz von $\Delta p = 90^{+20/-0}$ mmHg eingestellt. Die Kalzifizierungsstudie dauert insgesamt vier Wochen. Nach jeweils sieben Tagen werden die Klappen mit einem Mammographiegerät (General Electrics GE Medical Systems S.A. Model Senographie DMR BJ 2000, Einstellparameter siehe Anhang A.2) geröntgt.

PIV-Einstellparameter

Der Laser der PIV-Anlage ist ein Nd:YAG Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 532$ nm (New Wave Research, Model: Solo II 15 Hz). Für die Messung werden folgende Werte eingestellt:

- Pulsabstand: $\Delta t = 500 \mu s$
- Laserstärke: Highpower 20 %

Die Berechnung der Geschwindigkeitsfelder geschieht unter den folgenden Bedingungen:

- Korrelationsmodus: Kreuzkorrelation
- Teilbereich: inertial 128×128 Pixel (eine Iterationsschleife), final 64×64 Pixel (eine Iterationsschleife)
- Überlappung der Teilbereiche: 50 %
- Korrelationsfunktion: mit Fast Fourier Transformation (FFT)
- Skalierung: m/s

Als Kompartiment dient der in Kapitel 4.1 beschriebene Reaktor. Mit Hilfe des Magneten wird eine Membran ausgelenkt und ein Wasser/Glycerin-Gemisch (Mischungsverhältnis 0,81 zu 0,19) pulsatil durch die Herzklappe befördert. Mit dieser Mischung wird die Viskosität des Blutes in der Aorta bei 37 °C simuliert (4 mPas). SPHERICEL 110P8 Partikel der Firma LaVision werden beigemischt (Partikelgröße: 8 – 11 μm , Partikelmenge 1 mg pro Liter). Die Dichte des Gemisches beträgt $\rho_{gem} = 1040 \text{ kg/m}^3$, die der Partikel

$\rho_{Partikel} = 1100 \text{ kg/m}^3$. Die Lösung wird 15 Minuten in einem Ultraschallbad durchmischt. Ein Rückfluss des Fluides ist durch Silikonschläuche gegeben. Der Druck wird über eine oben angebrachte Drossel auf eine physiologische Druckdifferenz von $\Delta p = 90 \text{ mmHg}$ eingestellt. Die Dicke des Laserschnitts ist auf 1 mm definiert. Die Herzklappen werden bei jeder Messung auf dieselbe Weise in den Tester integriert. Die Stellung der Klappen ist bei jeder Messung identisch (siehe Abbildung 6.10).

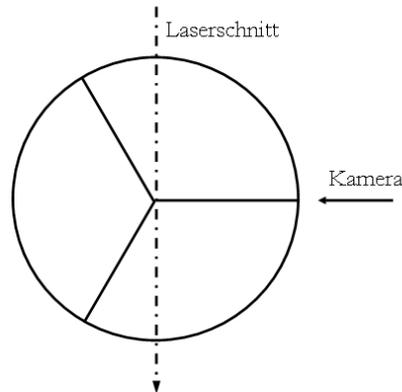


Abbildung 6.10: Laserschnitt durch die Herzklappe. Der Laser wird so gelegt, dass die Strömung der kompletten Taschen aufgenommen wird. Die Klappen werden alle in identischer Position vermessen.

Zusammenfassend gelten folgende Randbedingungen:

- Druckdifferenz (minimaler Ventrikeldruck zu diastolischem Aortendruck):
 $\Delta p = 90 \text{ mmHg}$
- Fluidmischung: 80 % bidestilliertes Wasser + 20 % Glycerin (Gew.%)
- Menge des Gemisches: $V = 500 \text{ ml}$
- Dichte der Partikel: (SPHERICEL 110P8) 1 mg/l .

Zur Untersuchung der Geschwindigkeitsfelder werden die Laserschnittebenen vertikal zur Herzklappe ausgerichtet. Die Geschwindigkeitsfelder werden jeweils zu je vier Zeitpunkten aufgezeichnet. Die Triggerung des Magneten mit dem Laser sorgt für eine einheitliche Messung und für folgende Klappenstellungen (siehe Tabelle 6.6):

Zeitpunkt	Klappenstellung
1	Herzklappe befindet sich im Öffnungsvorgang
2	Herzklappe ist vollständig geöffnet
3	Herzklappe befindet sich im Schließvorgang
4	Herzklappe ist vollständig geschlossen

Tabelle 6.6: Stellung der Klappentaschen zu den Zeitpunkten 1 bis 4

Versuchsdurchführung

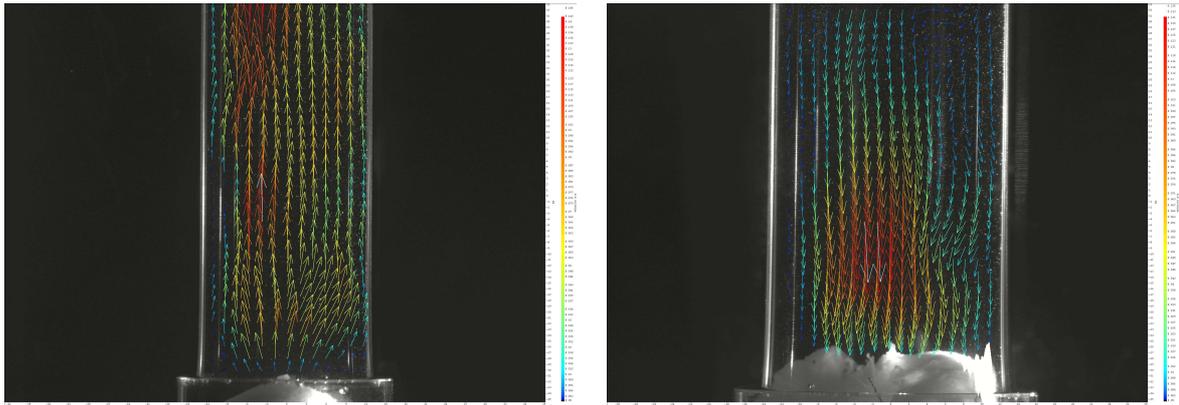
Es werden insgesamt sechs PIV-Versuchsreihen durchgeführt:

- Versuchsreihe 1: Klappen im nativen Zustand kurz nach der Präparation,
- Versuchsreihe 2: Klappen im fixierten Zustand,
- Versuchsreihe 3: Klappen nach einer,
- Versuchsreihe 4: nach zwei,
- Versuchsreihe 5: nach drei und
- Versuchsreihe 6: nach vier Wochen Kalzifizierungsdauer im FACT.

6.2.2 Ergebnisse

Strömungsformen

Beim Öffnungs- und Schließvorgang (Zeitpunkt 1 und 3) der Herzklappen im nativen Zustand ist eine mittige Strömung zu erkennen. Dies lässt sich durch die gleichmäßige ungehinderte Öffnung der Taschen und deren Anlegen an die Aortenwand erklären. Rezirkulationsgebiete treten aufgrund der bauchförmigen Aortenwand nicht auf. Während des vollständig geöffneten und vollständig geschlossenen Zustands wird das Strömungsprofil sowohl abgebremst als auch verwirbelt. Eine Verringerung der Geschwindigkeit an der Wand (Reibungswiderstand) ist eindeutig zu erkennen. In Abbildung 6.11 ist ein typisches Profil der Öffnungs- und Schließphase dargestellt.



(a) Zeitpunkt 1: Öffnungsvorgang der Herzklappe (b) Zeitpunkt 3: Schließvorgang der Herzklappe

Abbildung 6.11: Darstellung typischer Strömungsprofile nativer Herzklappen. Es sind eine breite Strömung in der Mitte und Geschwindigkeitsverringerungen am Rand zu erkennen. (a) Öffnungsphase der Klappe Nr. 6, (b) Schließphase der Klappe Nr. 1.

Während der Phasen der vollständig geöffneten (Zeitpunkt 2) und der vollständig geschlossenen (Zeitpunkt 4) Herzklappe wird eine Vielzahl von unterschiedlichen Strömungsprofilen mit mehr Wirbelbildung detektiert. Abbildung 6.12 verdeutlicht das Verhalten der Strömung bei komplett geschlossener Herzklappe.

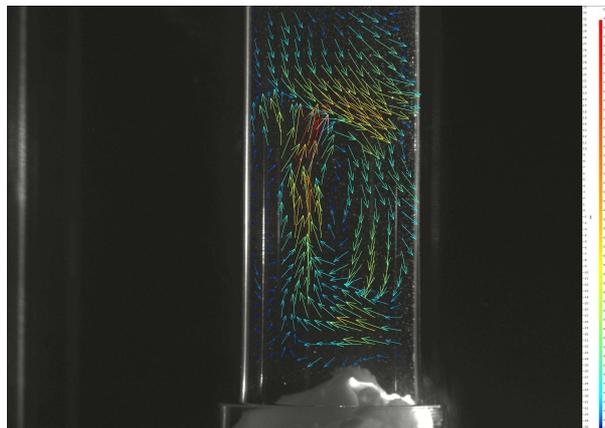


Abbildung 6.12: Typisches Strömungsprofil bei vollständiger Öffnung (Zeitpunkt 2) der nativen Herzklappe Nr. 5. Während der Phasen der vollständig geöffneten oder der vollständig geschlossenen Herzklappe können nur Verwirbelungen festgestellt werden.

Die Wirkung des Kalzifizierungsprozesses auf das Strömungsprofil ist deutlich anhand von Abbildung 6.13 festzustellen. Es entsteht eine kompakte Strömung mit engem Querschnitt.

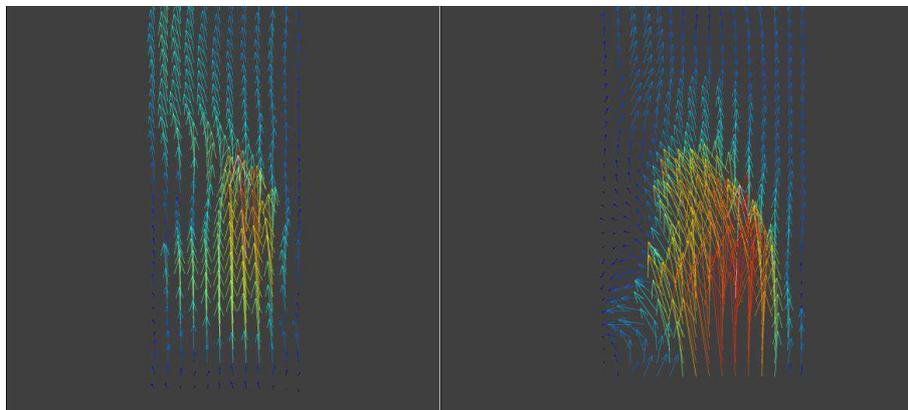


Abbildung 6.13: Herzklappe Nr. 8 nach zweiwöchiger Kalzifizierungsdauer. Die Versteifung der Taschen bewirkt eine signifikante Änderung der Strömungsform.

Nach vierwöchiger Kalzifizierung verändert sich das mittige Strömungsprofil beim Öffnen und Schließen der Herzklappe noch deutlicher. Beispiele dafür sind in den Abbildungen 6.14 und 6.15 zu sehen. Auch hier überwiegt nun eine seitlich gelegene Strömung.

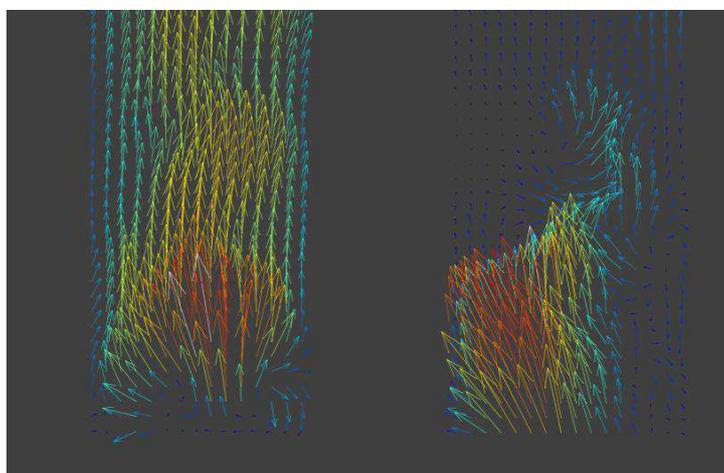


Abbildung 6.14: Herzklappe Nr. 9. Links: nativ, rechts: dritte Kalzifizierungswoche. Im Laufe der Kalzifizierung verändert sich auch die mittige Strömung beim Öffnen und Schließen der Herzklappe. Die Strömung ist beim Öffnen und Schließen der Herzklappen im fortgeschrittenen kalzifizierten Zustand nun nicht mehr mittig, sondern seitlich gelegen.

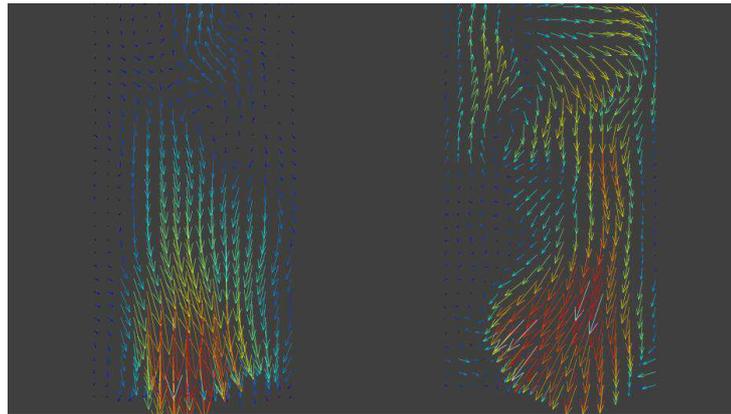


Abbildung 6.15: Herzklappe Nr. 7. Links: nativ, rechts: nach vierter Kalzifizierungswoche. Zu erkennen ist ein deutlich seitlich gelegenes Strömungsprofil.

Röntgenuntersuchung

Nach der vierten Kalzifizierungswoche können deutliche Ablagerungen anhand der Röntgenbilder gezeigt werden. Bevorzugte Regionen für Kalzifizierungsablagerungen sind hier die Kommissuren der Klappentaschen. Beispiele sind in Abbildung 6.16 zu sehen. Weitere Röntgenaufnahmen der vierten Kalzifizierungsstufe sind im Anhang A.3 abgebildet.

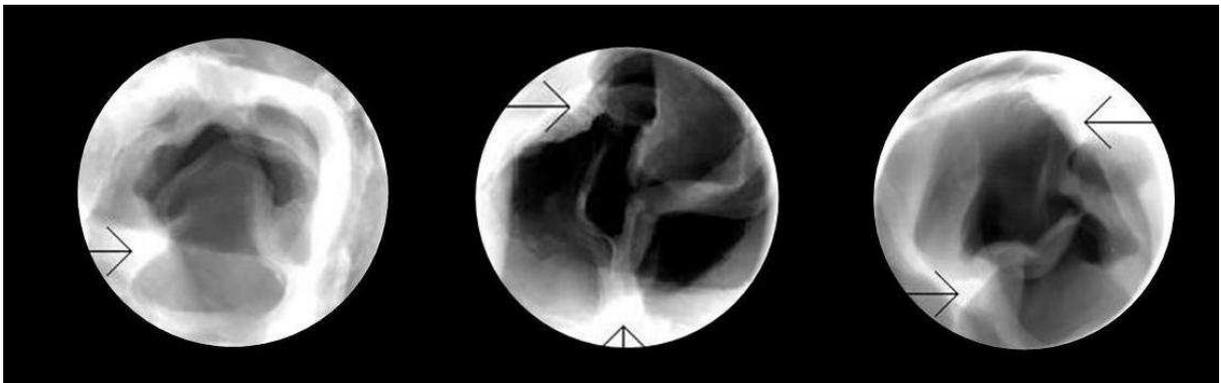


Abbildung 6.16: Beispiele zum Auftreten von Kalzifizierung. Von links nach rechts: Herzklappe Nr. 1, Nr. 6 und Nr. 9 nach der vierten Kalzifizierung. Deutliche Kalzifizierungsbereiche sind an den Kommissuren zu erkennen (Pfeile). Die Kommissuren sind mechanisch belastet, was ein Grund für die frühzeitige Kalzifizierung sein kann. Sie sind der Fixpunkt zwischen Aortenwand und Taschen und dementsprechend Zugbelastungen ausgesetzt.

Geschwindigkeitsverteilung

Im Gegensatz zu den nativen Klappen weist die Strömung durch die fixierten und kalzifizierten Herzklappen deutliche Geschwindigkeitsunterschiede auf. Das Geschwindigkeitsspektrum jedes Strömungsbildes reicht bis auf wenige Tausendstel m/s herunter. Mit der Beurteilung der maximalen Geschwindigkeit jeder Aufnahme werden die unterschiedlichen Herzklappen und Versuchsreihen verglichen. Die maximalen Geschwindigkeiten bewegen sich im Bereich von 0,03 bis 0,35 m/s. Bei der vorhandenen Viskosität von $\eta = 4 \cdot 10^{-3}$ kg/ms, einer Dichte von $\rho = 1040,8$ kg/m³ und einem Rohrdurchmesser von $d = 25$ mm als charakteristische Länge ergeben sich Reynoldszahlen von $Re = 195$ bis $Re = 2276$.

Zur Beurteilung der Veränderung der mittleren maximalen axialen Geschwindigkeitskomponente werden die maximalen Geschwindigkeiten aller Aufnahmen des vertikalen Laserschnittes gemittelt. Tabelle 6.7 beinhaltet die maximale Durchschnittsgeschwindigkeit für alle zehn Herzklappen in jedem Zustand (nativ, fixiert, 1. bis 4. Kalzifizierungswoche).

Klappennr.	nativ	fixiert	1.Woche	2.Woche	3.Woche	4.Woche
1	0,072	0,103	0,102	0,104	0,112	0,117
2	0,108	0,105	0,109	0,122	0,129	0,155
3	0,147	0,153	0,114	0,121	0,126	0,140
4	0,111	0,153	0,115	0,138	0,158	0,167
5	0,112	0,105	0,112	0,115	0,117	0,155
6	0,129	0,157	0,121	0,120	0,126	0,141
7	0,108	0,141	0,122	0,114	0,115	0,141
8	0,105	0,147	0,117	0,118	0,176	0,178
9	0,112	0,123	0,141	0,153	0,155	0,186
10	0,119	0,133	0,124	0,124	0,128	0,171

Tabelle 6.7: Durchschnitt der maximalen Axialgeschwindigkeiten in m/s. Zehn Klappen wurden über 6 Versuchsreihen untersucht. Die Kalzifizierung hat besonders in der vierten Woche einen Einfluss auf die Geschwindigkeiten.

Beim Vergleich sind Unterschiede der Geschwindigkeiten festzustellen. Übereinstimmend bei allen Proben ist der Zusammenhang zwischen einer Zunahme des Kalzifizierungsgrades und dem Ansteigen der Geschwindigkeiten. Anhand der Röntgenbilder lassen sich Öffnungsquerschnittsverringern eindeutig feststellen.

Die Maximalgeschwindigkeit ist in 90 % der Fälle in der 4. Woche größer als im nativen Zustand. Ihr Maximum liegt hier 110 bis 170 % höher als im nativen Zustand (siehe Abbildung 6.17).

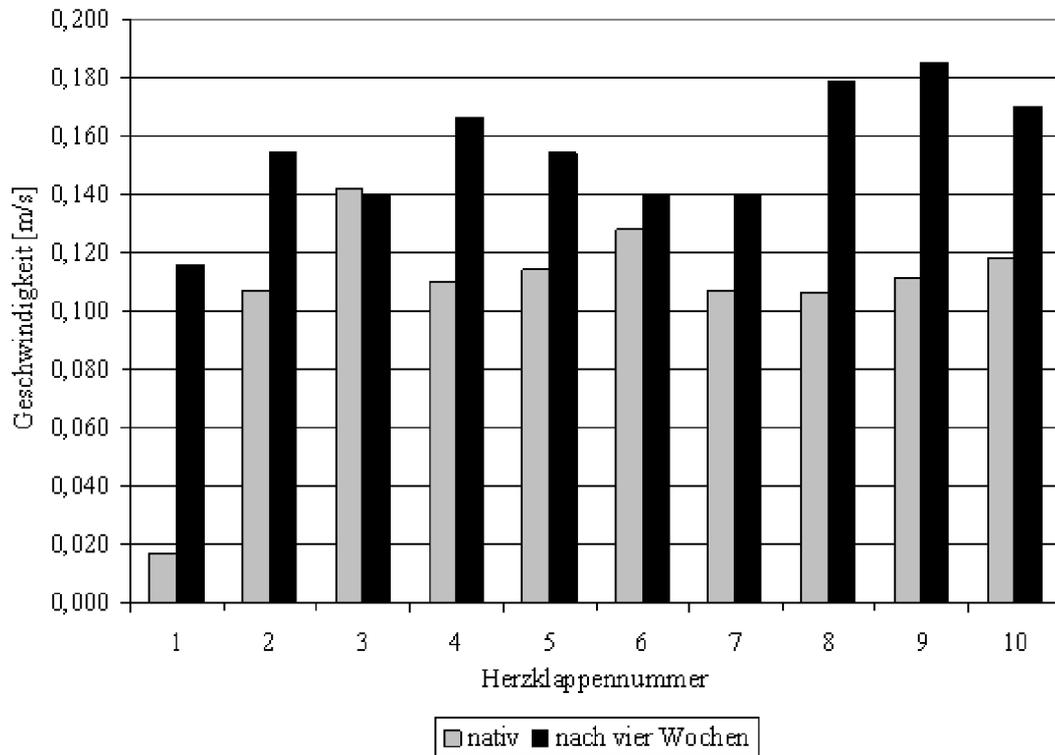


Abbildung 6.17: Mittlere maximale axiale Geschwindigkeit der Herzklappenströmung vom nativen zum Zustand nach 4 Wochen Kalzifizierung. Insgesamt wurden 10 Herzklappen untersucht. Die mittlere maximale axiale Geschwindigkeit wurde aus 10 Messungen gemittelt.

Die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit ist bei 60 % der Herzklappen im nativen Zustand am geringsten. Eine anfängliche Zunahme der Geschwindigkeit tritt nach der Fixierung auf. Es folgt ein Abfall der Geschwindigkeit nach 1-wöchiger Kalzifizierung, worauf ein stetiger Anstieg der Geschwindigkeiten mit ansteigendem Kalzifizierungsgrad sichtbar wird. Anhand der Herzklappen Nr. 4 und 8 in Abbildung 6.18 wird dieses Verhalten verdeutlicht.

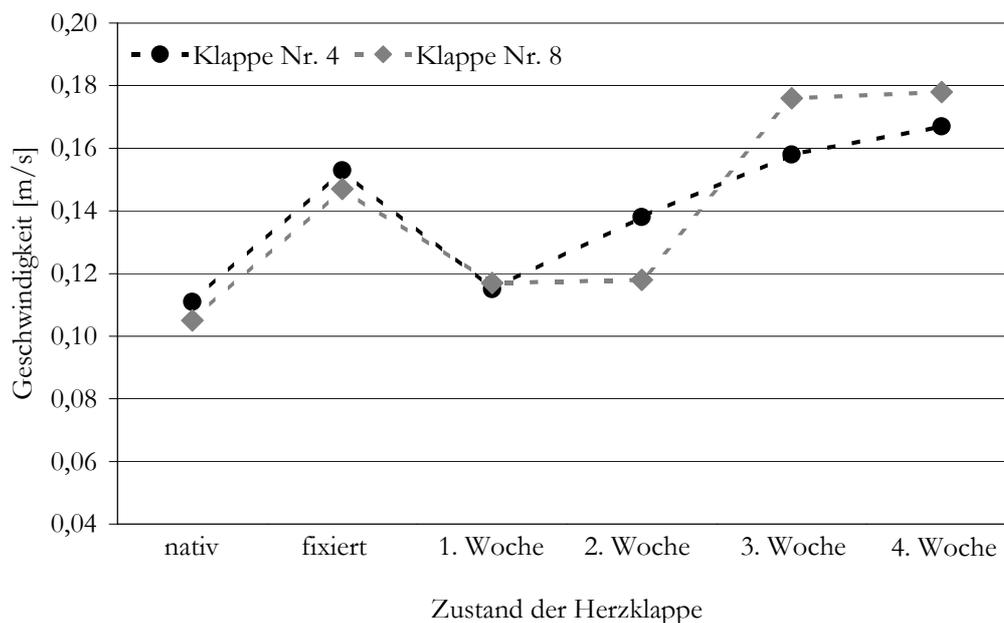


Abbildung 6.18: Typischer Verlauf der durchschnittlichen Axialgeschwindigkeit der Herzklappen Nr. 4 und 8. Nach einem Anstieg (von nativ zu fixiert) erfolgt ein Abfallen (von fixiert zu 1. Woche im FACT). Es ist ein Anstieg (von 1. Woche zu 4. Woche) der Geschwindigkeiten bei zunehmender Kalzifizierungsdauer sichtbar.

40 % der Herzklappen weisen Unterschiede im Zustand der Fixierung auf. Eine Erhöhung der Geschwindigkeiten im Verlauf der Kalzifizierung kann weiterhin festgestellt werden. Insbesondere das Verhalten der axialen Geschwindigkeitskomponente zeigt eine deutliche Veränderung im Laufe der 4-wöchigen Kalzifizierung. Bei 80 % der Herzklappen nimmt die Geschwindigkeit vom nativen zum fixierten Zustand zu (siehe Abbildung 6.19).

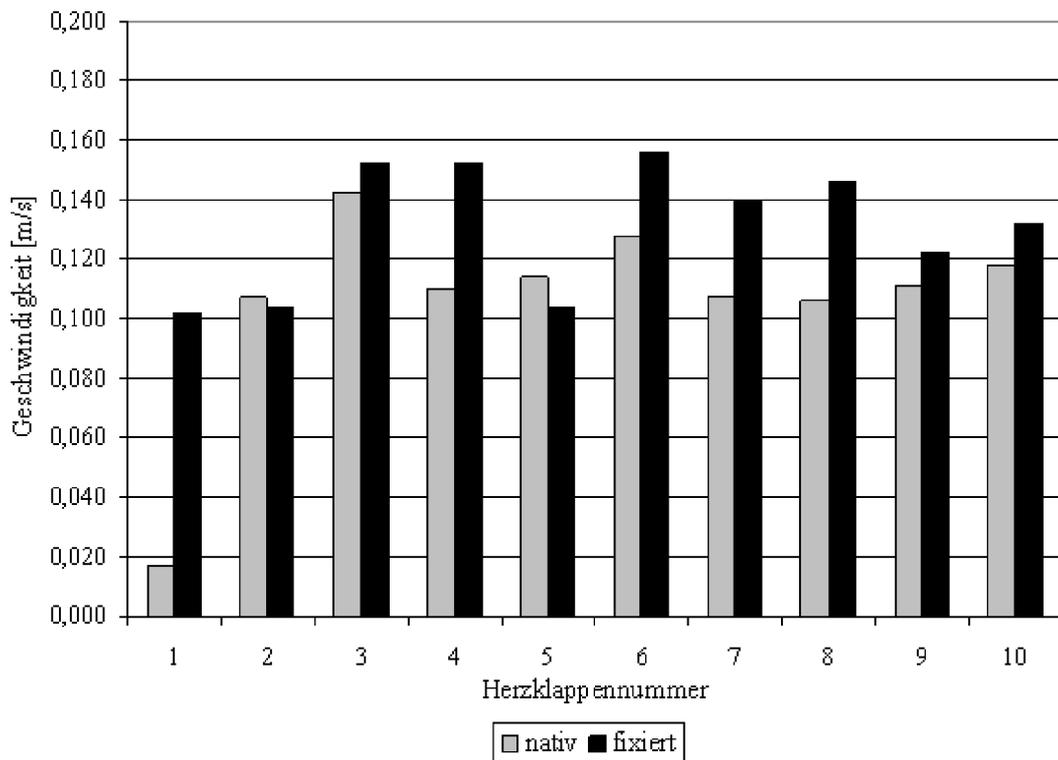


Abbildung 6.19: Mittlere maximale axiale Geschwindigkeit der Herzklappenströmung vom nativen zum fixierten Zustand. Durch mögliche Versteifung der Taschen durch den Fixationsprozess kann dieses Verhalten hervorgerufen werden. Auch ist eine Denaturierung des Gewebes vorstellbar. Die Messung des nativen Zustandes erfolgt ca. 2 bis 3 Stunden nach der Schlachtung. Die Herzklappen unterlagen eventuell zu diesem Zeitpunkt bereits Gewebeveränderungen.

Eine Versteifung der Taschen durch den Fixationsprozess ist eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens. Dadurch kann es zu einer Verengung des aortalen Öffnungsquerschnitts kommen. Diese Verringerung sorgt bei gleichem Massendurchsatz für eine Zunahme der Axialgeschwindigkeit. Bei denselben Herzklappen ist eine Abnahme der Geschwindigkeit des durchströmenden Fluides nach der ersten Kalzifizierungswoche zu erkennen. Während der weiteren Kalzifizierungswochen ist bei allen Herzklappen eine stetige Zunahme der Geschwindigkeit zu erkennen. Durch die zunehmenden Ablagerungen an den Taschen öffnet sich die Klappe nicht mehr adäquat und die axiale Komponente der Geschwindigkeit steigt kontinuierlich an. Die Versteifung der Taschen durch Fixierung und Kalzifizierung sorgt für ein langsames Öffnen und damit zu einem trägeren Verhalten der Strömung. Die Strömung nimmt sowohl beim Öffnungs- als auch beim Schließvorgang den Weg des

geringsten Widerstandes (den der weniger kalzifizierte Tasche). Dieses wird durch die folgenden Abbildungen bestätigt (siehe Abbildung 6.20 und 6.21).

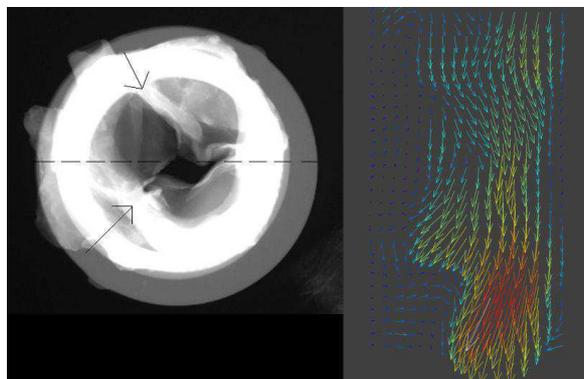


Abbildung 6.20: Klappe Nr. 7. Links: Röntgenaufnahme der Herzklappe in der 4. Kalzifizierungswoche (gestrichelte Linie: Laserschnittverlauf, Pfeile markieren Kalzifizierungspunkte), rechts: dazugehörige PIV-Aufnahme. Anhand des eingezeichneten Laserschnittes lässt sich erkennen, dass sich die Ausrichtung der Strömung in die Richtung der weniger kalzifizierten Taschenkontaktstellen richtet.

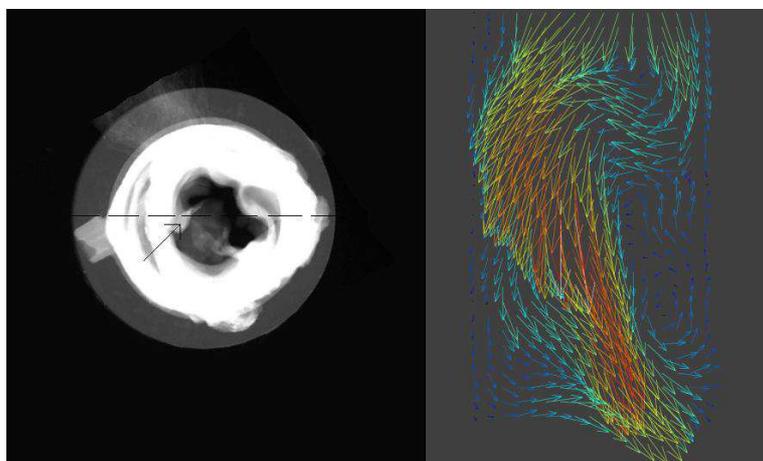


Abbildung 6.21: Klappe Nr. 8. Links: Röntgenaufnahme der Herzklappe in der 4. Kalzifizierungswoche (gestrichelte Linie: Laserschnittverlauf); rechts: dazugehörige PIV-Aufnahme mit Verengung der Strömung aufgrund von Kalzifizierungen der Tasche.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nicht nur der Einfluss einer Fixierung, sondern auch einer Kalzifizierung erörtert werden. Die Qualität einer Kalzifizierung wird mittels der PIV eindeutig abgebildet [155].

6.3 Simulation der Herzklappenöffnung mittels Fluid Structure Interaction (FSI) und Finite Elemente Methode (FEM)

Simulationen dienen nicht nur dazu, Versuche und Kosten zu sparen, sondern auch erste Abschätzungen hinsichtlich Versuchsanordnung und Einstellparameter zu erzielen. Geometrien, Materialdaten und Randbedingungen lassen sich variieren, was für die Simulation von Kalzifizierungen an Herzklappen von Vorteil ist. Für die Untersuchung von biologischen bzw. medizinischen Phänomenen hat die numerische Simulation eine große Bedeutung erlangt. Gegenüber experimentellen Versuchen ist die einfache Generierung von unterschiedlichen lokalen Bedingungen vorteilhaft. Zusätzlich können geometrische sowie stoffliche Änderungen einfacher realisiert werden. Für eine im Reaktor gezüchtete Herzklappe bedeutet das, wichtige Eigenschaften wie Öffnungsverhalten, Geometrieoptimierung oder auch Durchmesser der Klappe untersuchen zu können, ohne den eventuellen Verlust einer Klappe einkalkulieren zu müssen. Für die komplexe Aortenklappenbewegung stellt die numerische Simulation eine große Herausforderung dar. Viele Eigenschaften sind für die Modellierung des Problems von Bedeutung. Rotation, Translation sowie Deformation müssen im Modell berücksichtigt, Kräfte, geometrische sowie materialspezifische Eigenschaften müssen realitätsnah erfasst werden, um verlässliche, physiologisch unbedenkliche Ergebnisse zu erzielen. Zudem ist wichtig, dass die Randbedingungen zwischen Aortenklappentasche und der Aortenwand so gewählt werden müssen, damit in diesem Bereich eine hohe Flexibilität gewährleistet werden kann.

Im Rahmen dieses Kapitels sollen erste numerische Berechnungen durchgeführt werden, die die Fluid Structure Interaction (FSI) einer Herzklappe und eines durchströmenden Fluides berücksichtigen. Die FSI ermöglicht eine Kopplung zwischen Elastostatik und Strömungsmechanik und ist somit für das betrachtete Problem anwendbar. Es soll ein reales Herzklappenmodell erstellt werden, wobei sich die Daten an den FSI relevanten Literaturangaben orientieren. Eine weitere Simulation soll hinsichtlich der Druckverteilung und Spannungsverläufe durchgeführt werden. Hierbei baut dieser Abschnitt auf den Erfahrungen auf, die bei der FSI gesammelt wurden. Deshalb wird hier die Workbench von ANSYS[®] benutzt sowie ein Herzklappenmodell aus der FEM relevanten Literatur. Auch Kalzifizierungseinflüsse auf Spannung und Öffnung werden untersucht. Es sei erwähnt, dass zum Verfassungszeitpunkt dieser Dissertation keine Daten zu FE-Simulationen von Kalzifizierungen an der Aortenklappe veröffentlicht waren.

6.3.1 Material und Methoden der FSI

Bei der Fluid Structure Interaction werden Geometrien gewählt, die sich an den Modellen von Morsi et al. [140] orientieren. Die Geometrien unterscheiden sich dahingehend, dass beim ersten Modell (Geometrie A) die Taschendicke konstant bei 0,35 mm angenommen wird und bei dem zweiten Modell (Geometrie B) variabel ist. Das zweite Modell ist der realen Herzklappe ähnlicher. Durch die Geometrieänderungen wird auf das Öffnungsverhalten der Klappe eingegangen.

Geometrieerstellung der verwendeten Modelle

Die Konstruktion der Aortengeometrie erfolgt für beide Modelle mit dem 3D-CAD-Programm SolidWorks®2006. Die Klappen werden als nicht vollkommen geschlossen konstruiert. Es existiert dennoch eine theoretische Berührungsfläche. Der Gefäßinnendurchmesser d_G , die Klappenhöhe h_K sowie der Taschenwinkel α_T sind für beide Modelle gleich. Die Werte für diese Größen und Bilder zur Konstruktion sind im Anhang A.4 in der Tabelle A.16 aufgeführt. In den Abbildungen 6.22 werden die unterschiedlichen Klappengeometrien dargestellt. Der Konduit wird als starr erstellt (siehe Abbildung 6.22(d)).

Erstellung des Festkörper-Netzes

Für die Netzgenerierung werden zwei unterschiedliche Programme verwendet. Die Gittererstellung der Festkörperphase erfolgt mittels der automatischen Netzgenerierung von ANSYS® Mechanical. Mit einer einzigen definierten Zwangsbedingung (maximale Elementgröße von 0,25 mm) wird die gesamte Klappengeometrie mit einem Tetraedergitter vernetzt. In Abbildung 6.23 ist das Gitter der Klappengeometrie dargestellt. Im Bereich der Splines und Kanten wird das Netz automatisch verfeinert.

Erstellung des Fluidphasen-Netzes

Die Netzgenerierung für die Fluidphase der FSI wird mit Hilfe des Programms ANSYS®ICEM CFD durchgeführt. Mit der Steifigkeit des Netzes kann die Verformung realisiert werden. In den Bereichen größerer Bewegung muss das Fluidgitter eine feinere Struktur aufweisen.

Es ergibt sich folgende Oberflächeneinteilung:

- Inlet → untere Kreisfläche des Zylinders,
- Outlet → obere Kreisfläche des Zylinders,
- Wand → Mantelfläche,
- Klappe → obere Taschenoberfläche,
- Kontaktfläche → theoretische Kontaktfläche der einzelnen Taschen und
- Bauchbereich → Unterer Bauchbereich der Klappe.

In den Abbildungen 6.24 sind die obere Taschenoberfläche (a), die theoretische Kontaktfläche (b) sowie der untere Bauchbereich (c) hervorgehoben.

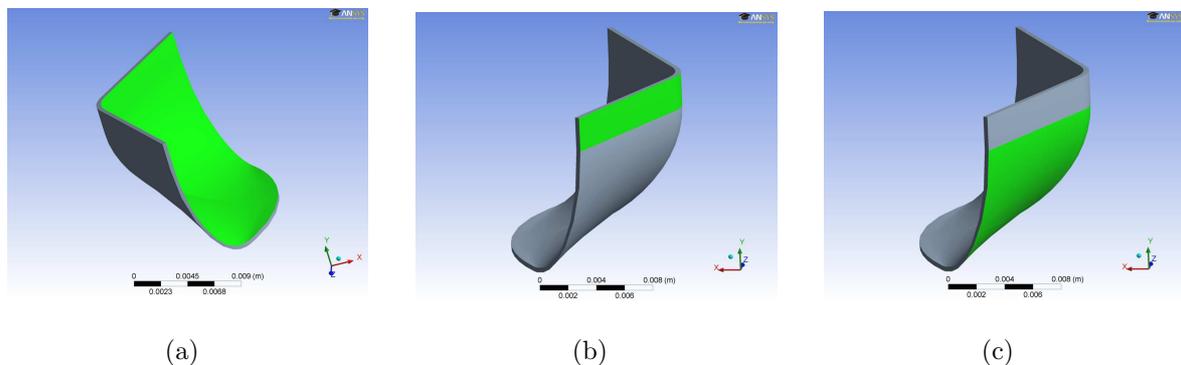


Abbildung 6.24: Darstellung der Oberflächeneinteilung des Klappenbereichs (grün dargestellt). (a) Obere Taschenoberfläche, (b) theoretische Kontaktfläche, (c) unterer Bauchbereich).

In Abbildung 6.25 ist die endgültige Darstellung des resultierenden Gitters dargestellt (mittiger Schnitt durch die y-z-Ebene). Im Bereich der theoretischen Kontaktfläche wird eine hohe Verfeinerung gewählt, da in diesem Bereich die stärkste Verformung der Volumenelemente erwartet wird.

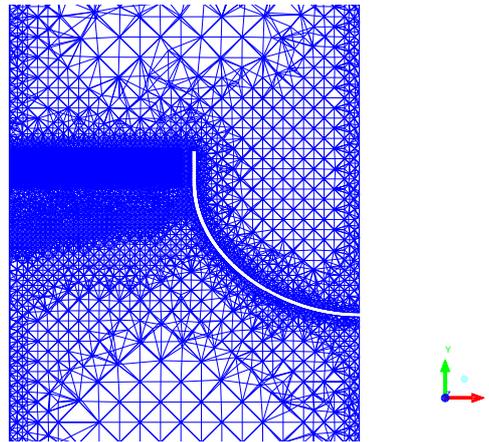


Abbildung 6.25: Fluidnetz der komplexen Geometrie. Eine besonders hohe Verfeinerung liegt im Bereich der theoretischen Kontaktfläche vor.

Zusätzlich erfolgt für die Generierung eines fehlerfreien Netzes erneut die Festlegung der Netztopologie in der Nähe der Kanten des Bauchbereichs. Die verwendeten Werte sind im Anhang A.4 aufgeführt.

Pre-Processing der Festkörperphase

Für die Lösung des mittels der FEM aufgestellten Gleichungssystems müssen bestimmte Randbedingungen definiert werden. Dieses sowie die Definition der Zeitschritte wird im Pre-Processing festgelegt. Die ersten Randbedingungen definieren sich aufgrund der Annahme einer festen Einspannung [156] zu

- $w(x_L) = 0$
- $w'(x_L) = 0$
- $w''(x_L) \neq 0$

mit $w(x_L)$ als Biegelinie an der Stelle der Lagerung x_L .

Bezogen auf die Klappe wird diese Art der Lagerung an den Flächen gewählt, die direkten Kontakt mit der Blutgefäßwand besitzen. In Abbildung 6.26(a) sind die ausgewählten Flächen hervorgehoben. Die zweite Randbedingung definiert den Kraftangriffspunkt sowie die Art und Höhe der Kraft, die auf diesen Punkt wirkt. Allerdings wird für den betrachteten Fall der FSI nur der Kraftangriffspunkt festgelegt, da die Art und Höhe der Kraft aus der Kopplung mit der Strömung erfolgt und somit vorher nicht bekannt ist. In ANSYS® Mechanical wird diese Art der Randbedingung als Fluid Solid Interface bezeichnet. An diesem Bereich erfolgt letztendlich die Kopplung zwischen der Fluid- und der Festkörperphase. Die Flächen, die diese Randbedingung enthalten, sind somit diejenigen, die im direkten Kontakt mit der Fluidphase stehen (siehe Abbildung 6.26(b)).

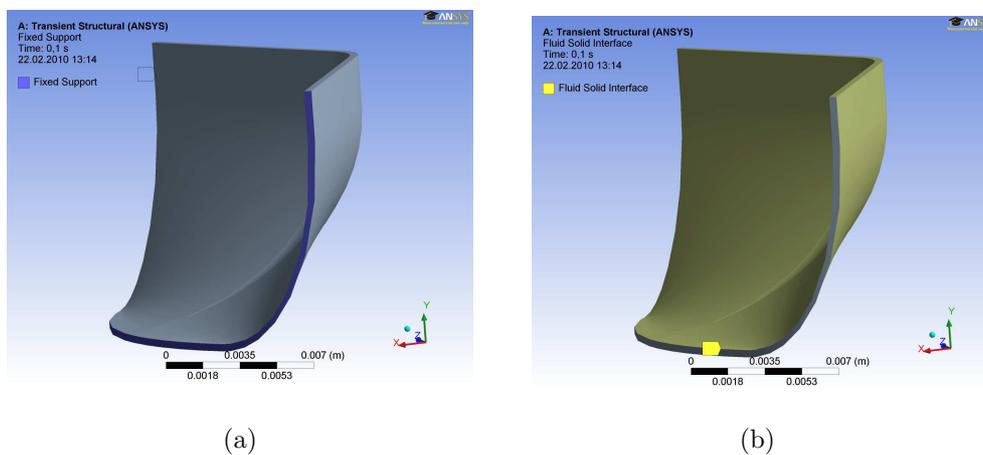


Abbildung 6.26: (a) Festlegung der festen Einspannung an den Rändern der Tasche.
 (b) Festlegung des Fluid Solid Interface. An den hervorgehobenen Flächen findet die Kopplung zwischen der Fluid- und Festkörperphase statt.

Neben der Definition der Randbedingung erfolgt im Rahmen des Pre-Processing der Festkörperphase die Festlegung der Materialeigenschaften. Für die FSI wird ein linear elastisches sowie isotropes Verhalten modelliert. Dabei ergeben sich für die drei zu definierenden Parameter folgende Werte, die sich an den Werten der vorgestellten Literatur orientieren (vgl. Abschnitt 4.4.3).

E-Modul	⇒	0,5 – 2 MPa
Poisson - Zahl	⇒	0,45 / 0,49
Dichte	⇒	1100 kg/m ³

Pre-Processing der Fluidphase

Beim Pre-Processing der Fluidphase werden prinzipiell vier unterschiedliche Randbedingungen festgelegt, die in der Abbildung 6.27 dargestellt sind.

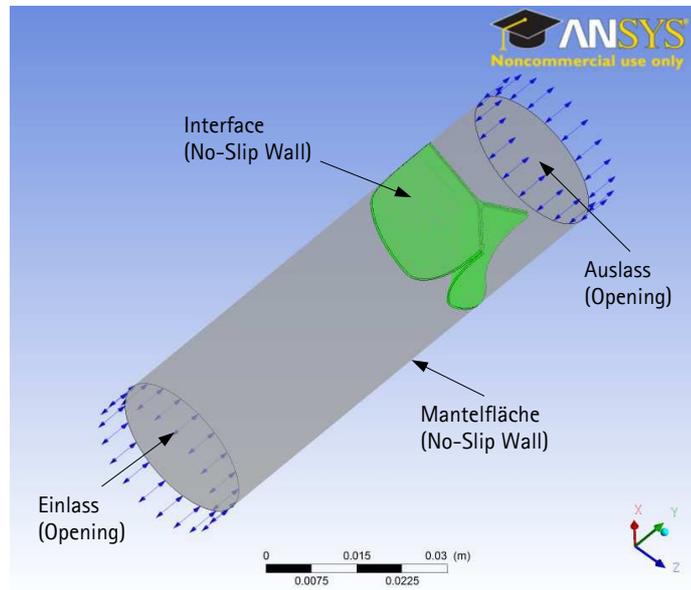


Abbildung 6.27: Darstellung der Randbedingungen der Fluidphase. Die Mantelfläche und das Interface werden als No-Slip Wall definiert, Ein- und Auslass als Opening.

Die Mantelfläche wird als sogenannte „No-Slip Wall“ definiert, womit die Haftbedingung der Strömung berücksichtigt wird. Die absolute Geschwindigkeit an der Wand wird mit der Geschwindigkeit der Klappenbewegung gleichgesetzt. Das heißt, dass die betrachteten Flächen in Bewegung sind. Dies wird auch mit der „No-Slip“-Bedingung erfüllt, hier jedoch auf die Klappenoberfläche (Interface) bezogen. Der Bereich, in dem der Einstrom des Fluides erwartet wird, wird als Einlass definiert. An dieser Stelle erfolgt die Implementierung des Druckverlaufs. Dafür wird mit Hilfe der CFX eigenen Programmiersprache CEL (CFX Expression Language) eine Gleichung programmiert, die diesen Verlauf beschreibt.

Aufgrund der Tatsache, dass während der Simulation zwei unterschiedliche Verläufe zum Einsatz kommen, werden zwei Beziehungen generiert. Diese setzen sich aus drei Einzelgleichungen zusammen, die für unterschiedliche Zeitbereiche gelten und wie folgt lauten:

$$P_{verl_{sinus}}(t) = \begin{cases} Ampl \cdot \sin(\pi \cdot \frac{t}{2 \cdot Tabschn}), & \text{für } t = [0; 0, 1] \\ Ampl, & \text{für } t = [0, 1; 0, 2] \\ Ampl \cdot \sin(\pi \cdot (\frac{t}{2 \cdot Tabschn} + 0.5)), & \text{für } t = [0, 2; 0, 3] \end{cases} \quad (6.4)$$

$$P_{verl_{linear}}(t) = \begin{cases} \frac{Ampl}{Tabschn} \cdot t, & \text{für } t = [0; 0, 1] \\ Ampl, & \text{für } t = [0, 1; 0, 2] \\ -\frac{Ampl}{Tabschn} \cdot t + \frac{Ampl}{Tabschn} \cdot T_{ges}, & \text{für } t = [0, 2; 0, 3] \end{cases} \quad (6.5)$$

mit $Ampl = 5 \text{ mmHg}$, $Tabschn = 0,1 \text{ s}$, $T_{ges} = 0,3 \text{ s}$. Für die durchgeführte Simulation ist es nicht eindeutig, in welche Richtung das Fluid strömt. Deshalb wird in diesem Fall ein sogenanntes „Opening“ als Randbedingung eingesetzt. Dies lässt während der gesamten Simulation einen Fluidstrom in positiver sowie in negativer Richtung über die definierte Fläche zu. Am definierten Auslass (erwarteter Ausstrom) wird ein Gegendruck von 0 Pa gesetzt, weil die Druckdifferenz bereits am Einlass festgelegt wird, die die treibende Kraft der Strömung darstellt. Auch hier wird als Randbedingungsart ein „Opening“ definiert. Neben der Definition der Randbedingung erfolgt die Festlegung der Fluideigenschaften. Es soll ein generiertes Blutmodell festgelegt werden. Das Blut, welches bei 37 °C innerhalb der Aorta fließt, wird als newtonsches Fluid mit konstanter dynamischer Viskosität sowie Dichte modelliert. Die verwendeten Größen dieser Parameter sind:

$$\begin{aligned} \text{Dichte} & \Rightarrow 1050 \text{ kg/m}^3 \\ \text{dyn. Viskosität} & \Rightarrow 4 \text{ mPas} \end{aligned}$$

Zusätzlich wird eine hohe Steifigkeit von Zellen, die sich in der Nähe von kleinen Zellen befinden, angenommen. Dadurch wird eine Verformung in Klappennähe gering gehalten. Eine solche Verformung kann sonst zu Konvergenzproblemen und zum Abbruch der Simulation führen.

6.3.2 Ergebnisse der FSI

Mit den ausgewählten Modelleigenschaften kommt es nicht zu einer vollständigen Klappenöffnung, jedoch wird mittels dieser Eigenschaften die zu diesem Zeitpunkt maximal mögliche Öffnung der Klappe erzeugt. Für die Auswertung der Klappenbewegung, die mittels der totalen Netzverformung dargestellt wird, werden acht Zeitschritte ausgewählt (siehe Anhang A.4). Die maximale Bewegung ist zu Beginn der Öffnung im Bauchbereich festzustellen, die sich im weiteren Verlauf in Richtung der frei beweglichen Klappenränder vergrößert. Im Bereich der konstanten Druckdifferenz vergrößert sich die Netzauslenkung. Dies ist durch den zeitlichen Verlauf der Öffnungsbewegung der Klappe zu erkennen. Der Grund für die Vergrößerung liegt darin, dass die Strömungsgeschwindigkeit in der Öffnungsphase ansteigt, was sich sowohl an der Abbildungsfolge des Geschwindigkeitsfeldes sowie anhand des zeitlichen Verlaufs der maximal auftretenden Geschwindigkeit nachvollziehen lässt. Es handelt sich hierbei um ein Verhalten der Trägheit des Systems. Der Geschwindigkeitsverlauf wird in der y - z -Ebene mittig durch die Abbildungsfolge dargestellt. Dabei wird jede maximale Geschwindigkeit eines einzelnen Zeitschrittes im Bereich der theoretischen Kontaktfläche definiert. Für den 15. Zeitschritt wird die maximale Geschwindigkeit von $v_{max} = 1,159 \text{ m/s}$ bestimmt. Die Beschleunigung der Strömung ist bis zum 12. Zeitschritt markant, was anhand des zeitlichen Verlaufes bewiesen wird. Es folgt eine konstante Geschwindigkeit, bis sich ein Abfallen der Geschwindigkeit ab dem 20. Zeitschritt eingestellt hat. Zu erkennen ist, dass trotz Erreichen der Gesamtsimulationszeit (30. Zeitschritt = $0,03 \text{ s}$) eine maximale Geschwindigkeit von $v_{30} = 0,5786 \text{ m/s}$ ermittelt wird. Der Grund dafür liegt in der Trägheit des Fluides, da trotz einer Druckdifferenz von 0 mmHg eine Leckage-Strömung durch die initiale Klappen­geometrie vorhanden ist und das Fluid erst später zum Stillstand kommt. Diese Leckage-Strömung ist auch in realen Klappenversuchen bzw. bei in-vivo-Untersuchungen vorhanden.

Bei der Analyse der Belastung, die an den Kommissuren auftreten werden, ist ein mittlerer Schnitt durch die x - y -Ebene gezogen worden. Hier nehmen mit größer werdender Öffnung die Spannungen zu (Bauchbereich ca. $2 \cdot 10^7 \text{ Pa}$). Während des Zeitschritts der größten Öffnung der Klappe ist auch die höchste Belastung festzustellen, die im Bereich der Kommissuren liegt. Sie erreicht punktuell eine maximale Spannung von $8,978 \cdot 10^7 \text{ Pa}$ (siehe Anhang A.4).

Vergleich des Einflusses der Geometrie innerhalb der FSI

In Abschnitt 6.3.1 wird die Geometrie der Klappe vorgestellt. Im Rahmen dieser Beschreibung wird erwähnt, dass zwei unterschiedliche Modelle untersucht werden. Diese zwei

Modelle unterscheiden sich in der Klappendicke. Für das erste Modell wird ein konstanter Wert von 0,35 mm angenommen. In Abbildung 6.22 ist die Klappendicke in einer 3D-Skizze dargestellt. Die zweite Geometrie wird so generiert, dass es an den Klappenseiten zu einer Verjüngung der Dicke zur Seitenmitte kommt. Allerdings wird diese Verjüngung zur Klappenmitte hin nicht aufrecht erhalten, so dass es in diesem Bereich zu einer konstanten Klappendicke von 0,35 mm kommt.

Die Analyse der Klappenbewegung beweist einen geringeren Öffnungsquerschnitt bei dem Modell mit der konstanten Klappendicke für dieselben Bedingungen. In Abbildung 6.28 ist die Netzauslenkung für die unterschiedlichen Klappen geometrien dargestellt. Die maximale Netzauslenkung bei der Klappe mit konstanter Dicke (Geometrie A (a)) beträgt 0,86 mm. Die maximale Netzauslenkung für das zweite Modell (Geometrie B) mit variabler Dicke (b) beträgt für den dargestellten 10. Zeitschritt 1,147 mm. Die maximale Bewegung bei konstanter Dicke ist zusätzlich bei einer größeren Fläche vorhanden, während diese bei der anderen Geometrie im Bauchbereich zu finden ist [157]. Bereits Nicosia et al. fanden heraus, dass die Variationen in der Geometrie einen großen Einfluss auf die Klappenbewegung haben [24].

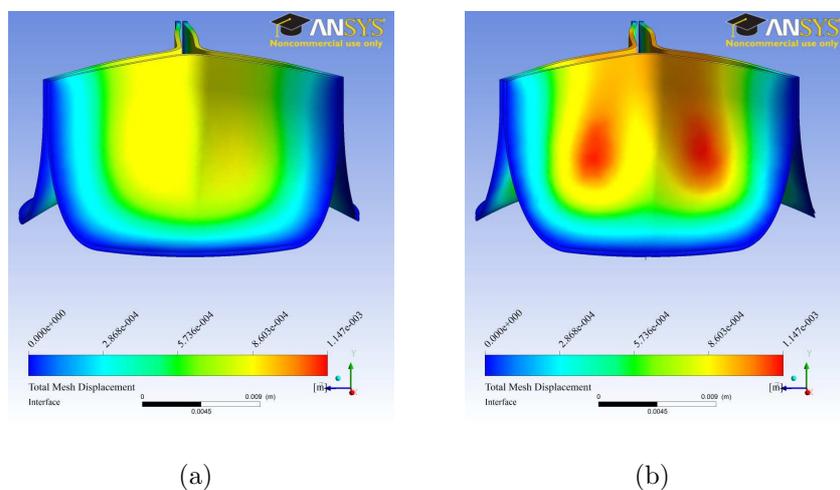


Abbildung 6.28: Darstellung des Einflusses der Klappendicke im 10. Zeitschritt auf die maximale Netzauslenkung. (a) Klappe mit konstanter Dicke: 0,86 mm verteilt auf der Taschenfläche, (b) Klappe mit variabler Dicke: 1,147 mm im Bauchbereich.

6.3.3 Material und Methoden der FEM-Simulation

Bei der FEM-Simulation wurde aus den Erkenntnissen, die bei der FSI-Simulation gewonnen wurden, entschieden, mit der ANSYS® Workbench zu arbeiten. Berechnungen mittels der Workbench haben den Vorteil einer besseren Simulation von Druckeinflüssen und Spannungen.

Geometrierstellung der verwendeten Modelle

Die Geometrie A aus Kapitel 6.3.1 wird auch für die erste FEM-Simulation verwendet (in diesem Kapitel als Geometrie C bezeichnet). Es handelt sich hierbei um eine Klappe mit konstanter Taschendicke und starrem Rohr (siehe Abbildung 6.23). Für die Geometrie D wird eine variable Taschendicke und der Sinus berücksichtigt, der in diesem Kapitel neu eingeführt wird (siehe Abbildung 6.29(a) und Abbildung 6.30). Die Geometrie des Sinus ist oval. Er wird mit einem vertikalen Radius von 14 mm und einem horizontalen Radius von 12 mm erstellt. Die Erstellung erfolgt mittels dem 3D-CAD-Programm Solid Works® 2006. Während die Geometrie C nicht vollkommen geschlossen konstruiert ist, aber eine theoretische Berührungsfläche aufweist, beinhaltet die Geometrie D keine geschlossene Form. Auch die Berührungsfläche ist verkleinert (siehe Abbildung 6.29(b)).

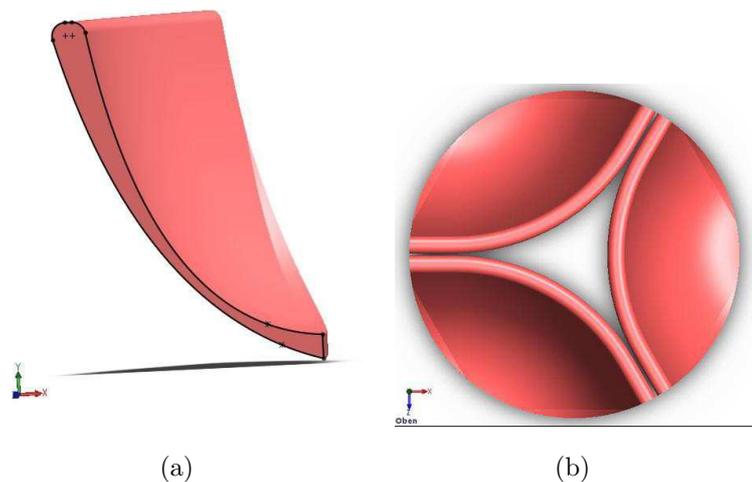


Abbildung 6.29: Darstellung der variablen Taschendicke der Geometrie D. (a) Die geometrischen Maße sind am freien Rand 1,53 mm, am Nodulus 1,9 mm, am Körper 0,25 mm und am Aortenring 1,16 mm nach [158]. (b) Obere Ansicht der Herzklappe. Die theoretische Berührungsfläche ist reduziert.

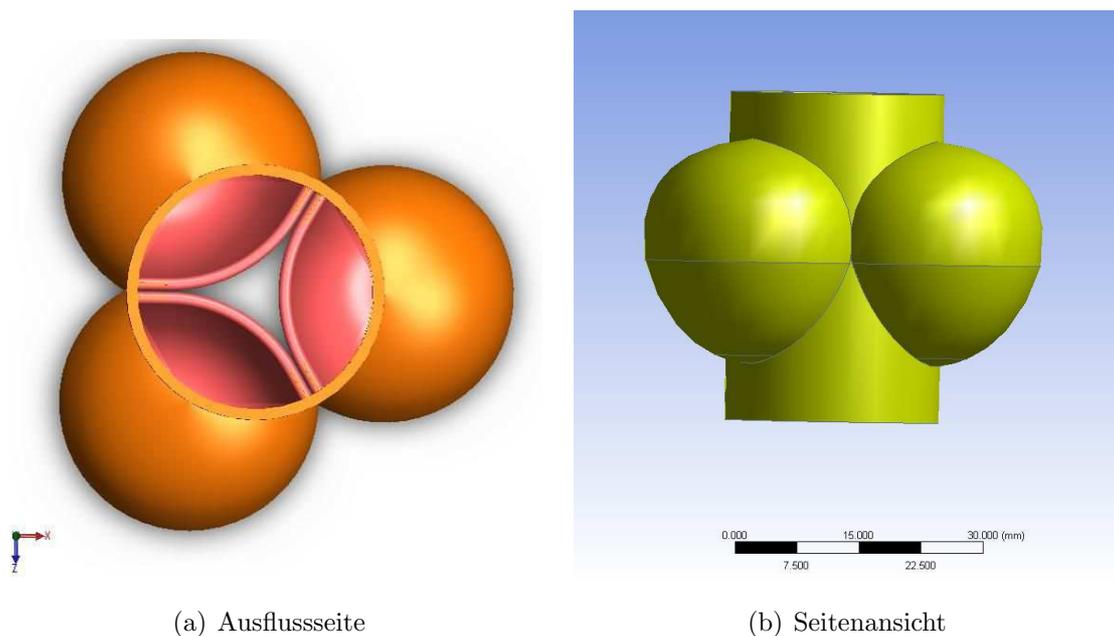


Abbildung 6.30: Darstellung der Geometrie D mit Sinus und Klappe. (a) Obere Ansicht der Ausflusseite und (b) Seitenansicht.

Die Werte für die Größen zur Konstruktion sind im Anhang A.4 aufgeführt.

In einer abschließenden Simulation werden bei der FEM-Simulation Geometrien auf die Taschen konstruiert, die eine Kalzifizierung darstellen sollen. Dabei unterscheiden sich drei Varianten. Die erste Variante modelliert eine kreisförmige Kalzifizierungsablagerung im Bauchbereich der Klappentasche mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Dicke von 0,1 mm, die zweite mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Dicke von 0,1 mm (siehe Abbildung 6.31(a), Ablagerungsgröße 10 mm, 5 mm nicht dargestellt). Die dritte Variante simuliert eine längliche Kalzifizierungsablagerung im Bereich der Kommissuren mit einer Länge von 3 mm sowie einer Breite von 0,2 mm und einer Höhe von 0,1 mm (siehe Abbildung 6.31(b)).

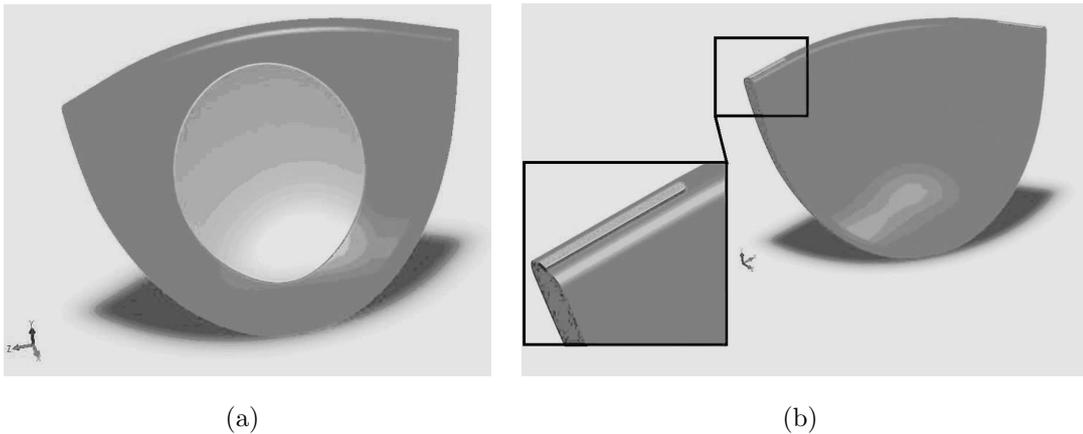


Abbildung 6.31: (a) Kalzifizierungsablagerung in der Mitte der Herzklappentasche. Dargestellt ist eine $10 \times 0,1$ mm runde Fläche, die versteift ist. (b) Kalzifizierungsablagerung an den Kommissuren der Herzklappentasche. Größe der Fläche: $3 \times 0,2 \times 0,1$ mm.

Erstellung des Festkörper-Netzes

Die Netzgenerierung der FEM erfolgt analog zur Generierung der FSI (siehe Abschnitt 6.3.1). In Abbildung 6.32 ist das Festkörpernetz der Geometrie D dargestellt. Das Netz der Geometrie C ist bereits in Abschnitt 6.3.1 beschrieben worden.

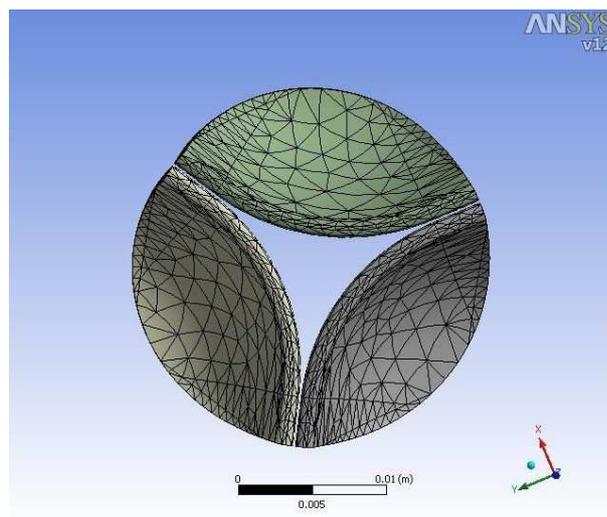


Abbildung 6.32: Festkörpernetz. Für die Klappengeometrie D wird ein Tetraedernetz mit einer maximal zulässigen Elementgröße von 0,25 mm erstellt. Die Generierung erfolgt rein automatisch.

Pre-Processing der Festkörperphase

Die erste Randbedingung ist bereits in Kapitel 6.3.1 erwähnt worden. Diese kann anhand der Abbildung 6.33 und des Abschnittes 6.3.1 auf die Geometrie C und D übertragen werden. Für die Aortenwand auf die Fläche, die direkten Kontakt zum linken Ventrikel besitzt, gilt dieselbe Randbedingung (siehe Abbildung 6.33(b) und (d)).

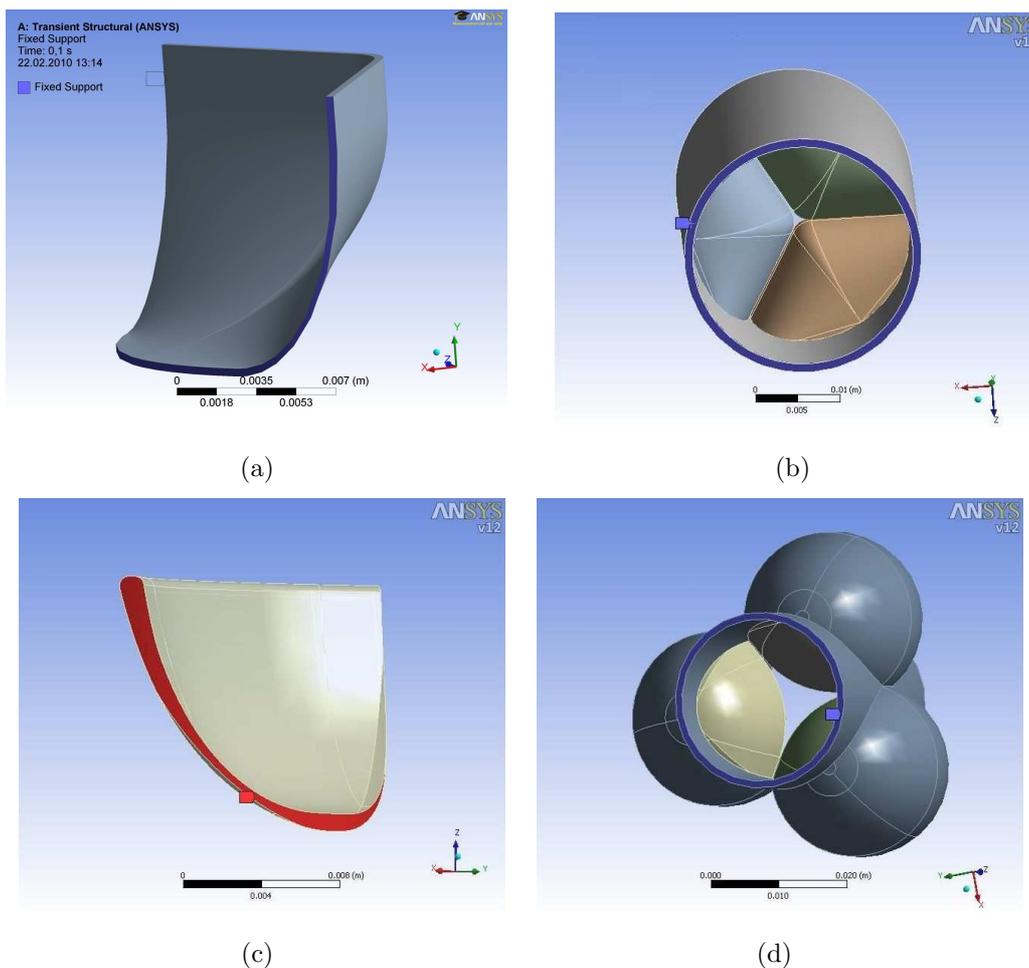


Abbildung 6.33: Festlegung der festen Einspannung. Die Flächen mit den Randbedingungen einer festen Einspannung sind in den Abbildungen farblich hervorgehoben. (a) und (b) Geometrie C, (c) und (d) Geometrie D.

Die zweite Randbedingung hinsichtlich der FEM-Simulation definiert, dass kein Kraftangriffspunkt, sondern eine Angriffsfläche resultiert. Dies ist der Druck, der durch die Strömung des Blutes, das aus der Herzkammer strömt, resultiert sowie der hydrostatische Druck des Blutes, der auf die aortenseitige Außenflächen der Taschenklappen und

die Innenseite der Aortenwand drückt. Die Flächen sind somit diejenigen, die im direkten Kontakt mit der Blutphase stehen. In den Abbildung 6.34 und 6.35 sind die ausgewählten Flächen für das Modell und für die unterschiedlichen Drücke dargestellt.

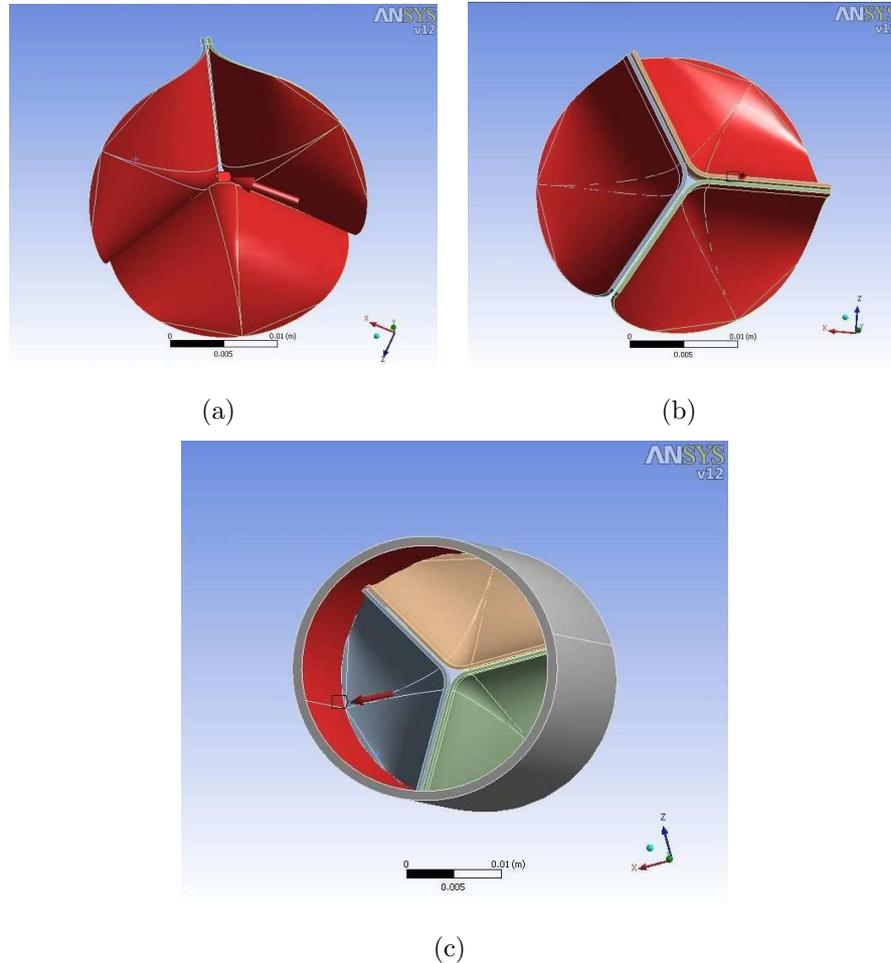


Abbildung 6.34: Geometrie C. (a) Festlegung der Angriffsfläche für den Druck, der aus der Strömung des Blutes resultiert, das aus der Herzkammer strömt. (b) Festlegung der Angriffsfläche für den hydrostatischen Druck, der auf die aortenseitigen Außenflächen der Taschenklappe drückt. (c) Festlegung der Angriffsfläche für den hydrostatischen Druck, der auf die Innenseite der Aortenwand drückt.

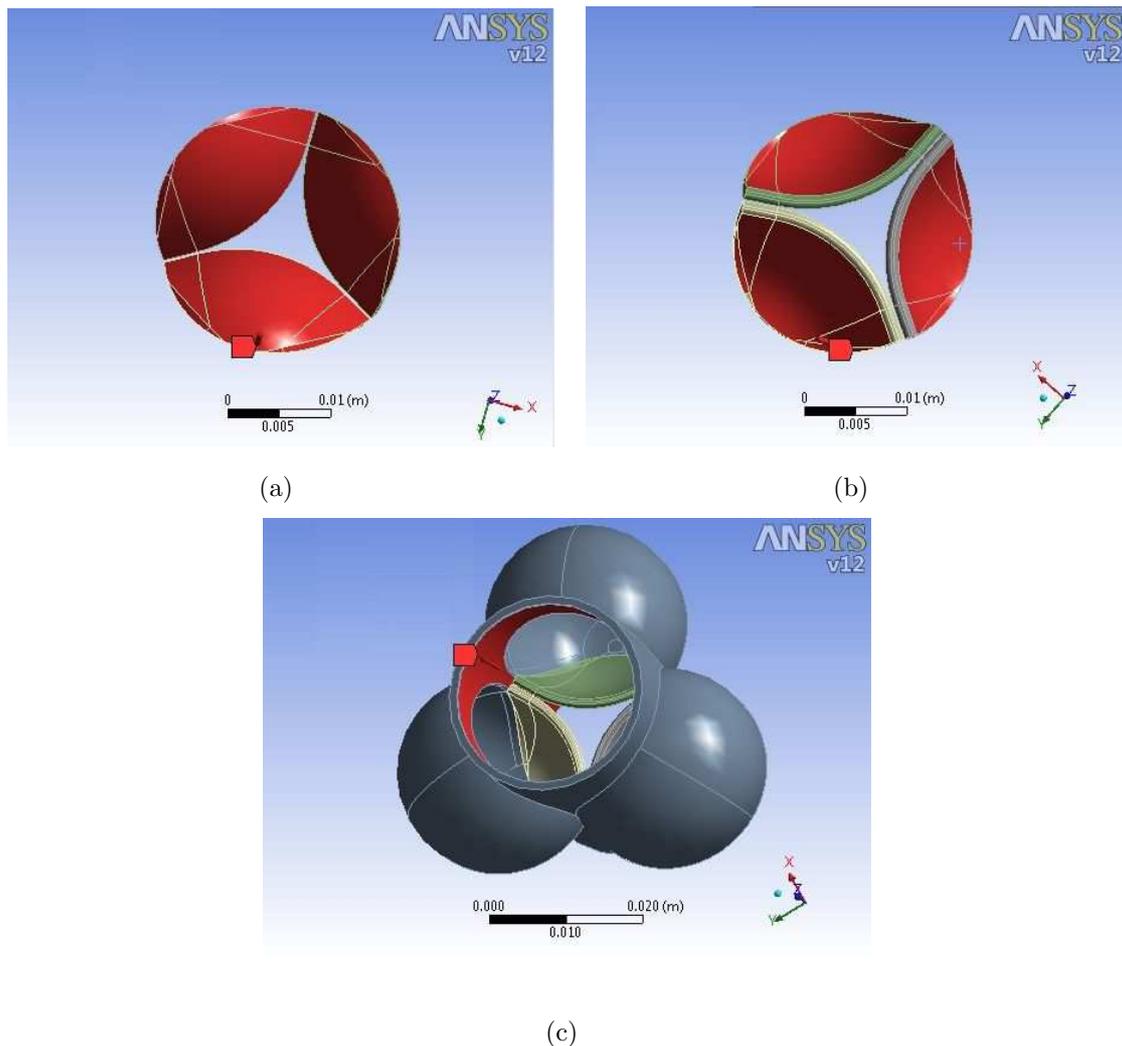


Abbildung 6.35: Geometrie D. Festlegung der Angriffsfläche für den hydrostatischen Druck, der auf die aortenseitigen Außenflächen der Taschenklappe drückt (a) einflussseitig, (b) ausflussseitig. (c) Festlegung der Angriffsfläche für den Druck, der aus der Strömung des Blutes resultiert, das aus der Herzkammer strömt.

Anschließend folgt die Festlegung der Materialeigenschaften. Es wird auch hier ein linear elastisches sowie isotropes Verhalten modelliert. Dabei ergeben sich für die drei zu definierenden Parameter Werte, die sich an den Werten der vorgestellten Literatur hinsichtlich der FEM orientieren (siehe Tabelle A.17 im Anhang A.4).

6.3.4 Ergebnisse der FEM

Bei der Auswertung der Ergebnisse der FEM-Simulation werden die Spannungsverteilung, die drucklose Öffnungsfläche sowie der Einfluss der Kalzifizierungsablagerungen der Herzklappe betrachtet.

Einfluss der unterschiedlichen Taschendicken

Das Modell mit konstanter Dicke (Geometrie C) erweist sich als divergent. Es kann lediglich eine Öffnungsfläche von 243 mm^3 erreicht werden, was einer Öffnung von 54% entspricht. Der Bauchbereich der Aortenklappe wölbt sich nicht in Richtung der Aortenwand durch. Vielmehr ist ein Versteifen der gekrümmten Position und eine translatorische Änderung in Richtung der Aortenwand zu erkennen (siehe Abbildung 6.36).

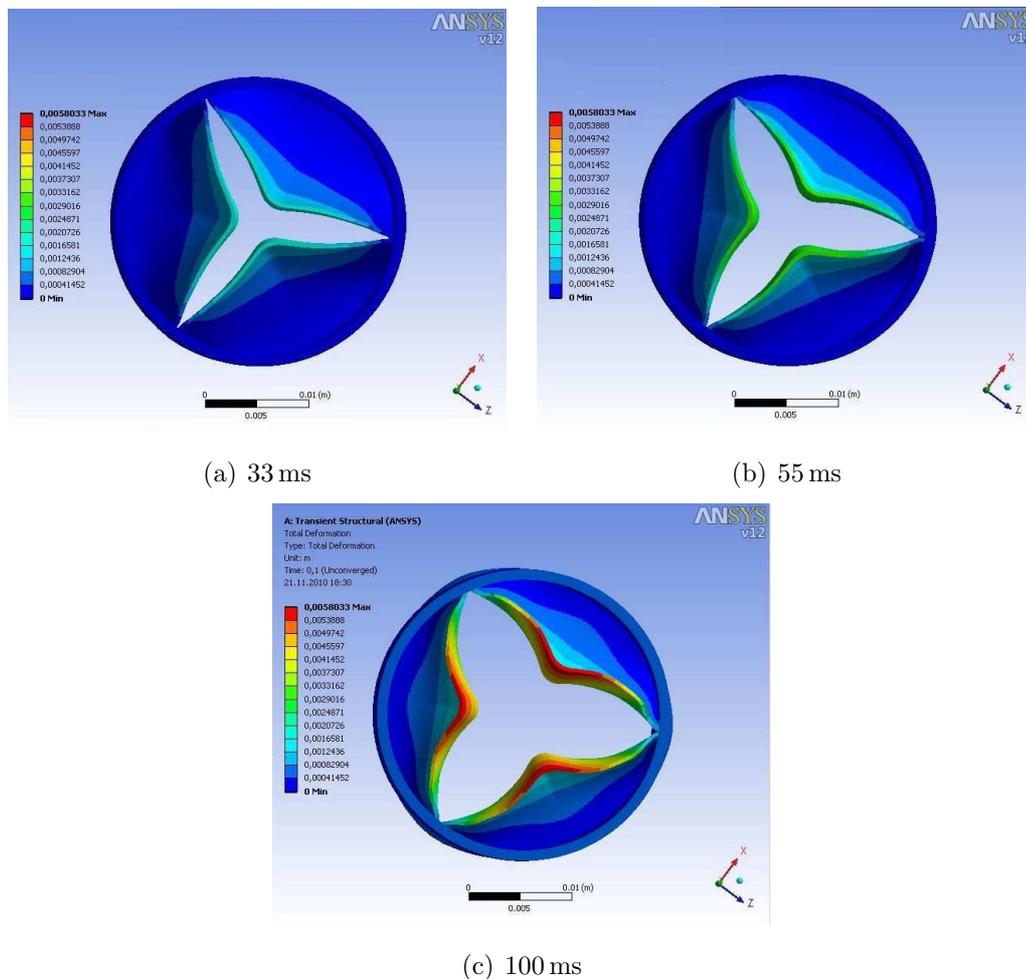


Abbildung 6.36: Verlauf der Klappenöffnung im Zeitbereich 33 bis 100 ms. Zu erkennen ist ein Versteifen der Taschen und eine translatorische Änderung in Richtung der Aortenwand.

Für die weitere Modellierung wird die Dicke der Klappen variabel gestaltet. Das Steifigkeitsverhalten besonders im Bauchbereich wird so für die FEM verbessert. Modelle mit einem isotropen E-Modul von 2 MPa sowie der Sinus haben einen wesentlichen Einfluss auf die Spannungsverteilung innerhalb der Klappentasche. Der gesamte Zeitbereich wird mit dem Modell der variablen Dicke simuliert und die Öffnungsbewegung der Klappe analysiert. Dabei kommt es neben der Präsentation der Abbildungsfolgen zur Darstellung der zeitlichen Verläufe dieser Größen. Die dargestellten Zeitschritte 20 bis 168 ms entsprechen der Phase mit steigender Druckdifferenz. Des Weiteren werden die materialinternen von Mises-Spannungen dargestellt sowie die maximalen Werte quantifiziert.

Anhand des zeitlichen Verlaufs ist zu Beginn eine maximale Deformation im Bauchbereich zu erkennen. In Richtung der frei beweglichen Klappenrändern wird dieser Bereich vergrößert, bis die Klappe vollständig geöffnet ist. Nach 168 ms ist die Klappe maximal geöffnet. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Kommissuren 2,9 mm von ihrer Ursprungsposition entfernt (siehe Abbildung 6.37).

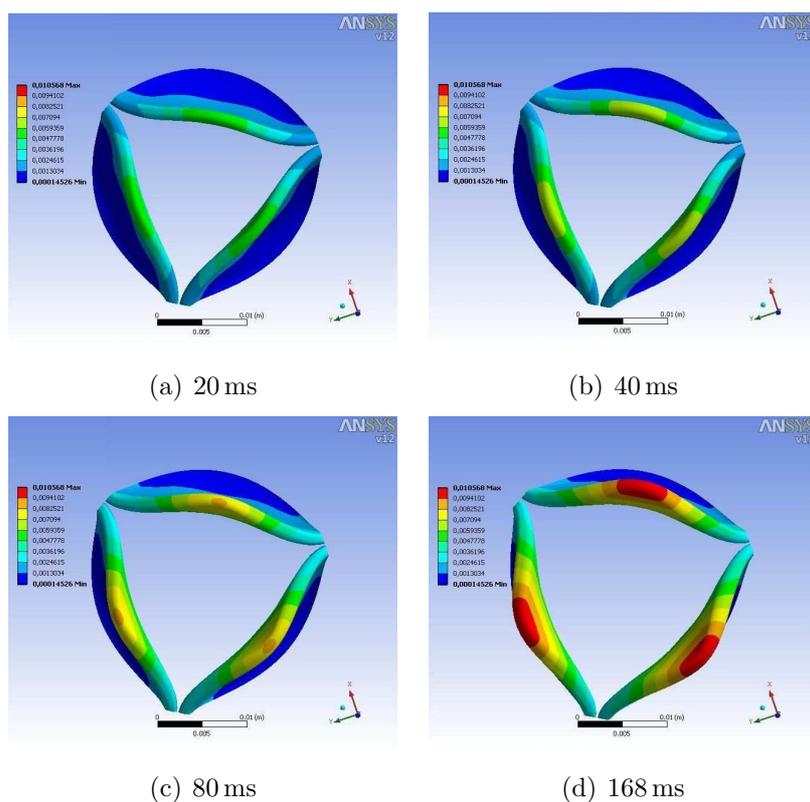


Abbildung 6.37: Verlauf der Klappenöffnung des zweiten Modells, Zeitbereich 20 bis 168 ms. Nach 168 ms maximale Öffnung. Die maximale Deformation findet im Bauchbereich statt, die sich zu den frei beweglichen Rändern vergrößert bis zu einer maximalen Öffnung.

Im Nodulus wird eine Deformation von ca. 10 mm erzielt. Dies entspricht der maximalen Deformation. Damit öffnet sich die Klappe zu 90,7 %, was eine Öffnungsfläche von 410 mm² bedeutet. Der Druckverlauf beeinflusst sowohl die Bewegung der Kommissuren sowie der Taschenklappen. Bei geringen Druckdifferenzen resultieren geringe Deformationen, analog bei großen Druckdifferenzen große Deformationen. Eine Simulation der Dilatation der Klappe zeigt, dass sich die Klappe zu 21 % dehnt bzw. die Querschnittsfläche geöffnet wird. Der Nodulus verschiebt sich um 3,17 mm, die Kommissuren um 1,22 mm in radialer Richtung.

Von Mises-Spannung in den Taschenklappen

Die maximale von Mises-Spannung ergibt sich an den Kommissuren der Klappen (siehe Abbildung 6.38). Diese beträgt bei 168 ms 815,6 kPa.

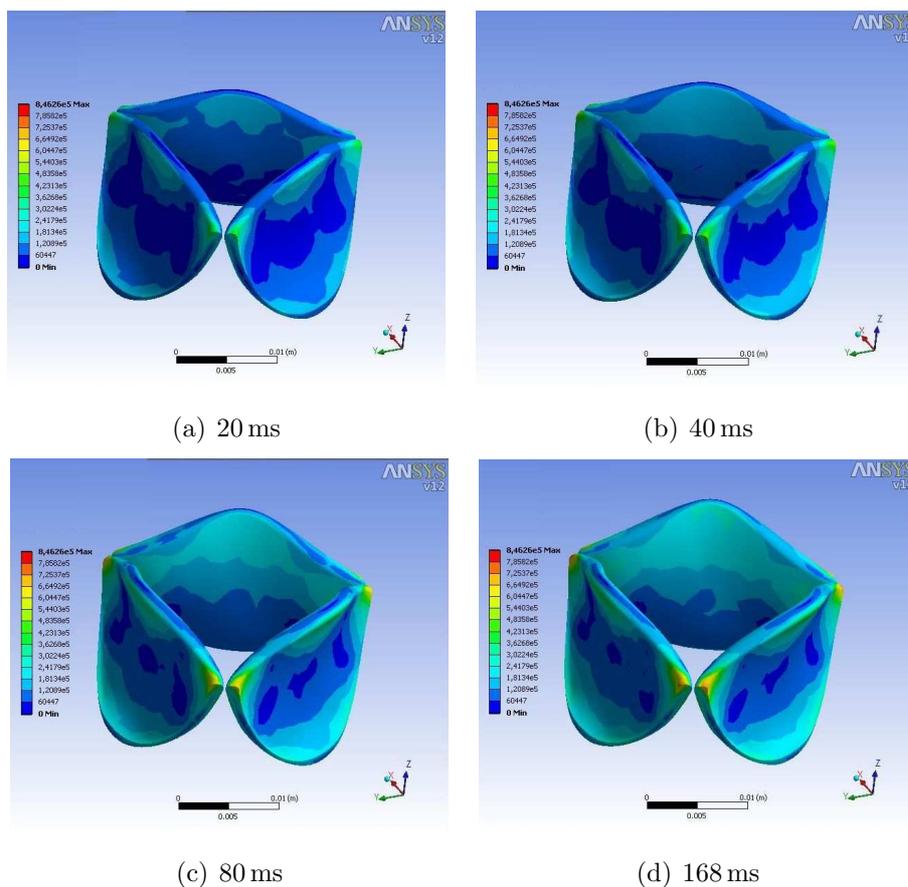


Abbildung 6.38: Zeitlicher Verlauf der von Mises-Spannung der Geometrie D im Zeitbereich von 20 bis 168 ms. Zum Zeitpunkt 168 ms erreicht die von Mises-Spannung ihren maximalen Wert im Bereich der Kommissuren.

Modell mit Kalzifizierungsablagerungen

Das in Abschnitt 6.3.3 dargestellte Modell kann mit Modellen aus der Literatur verglichen werden. Eine realitätsnahe Analyse der Aortenklappenöffnungsbewegung ist somit möglich. Bisher liegen nur wenige Ergebnisse aus der Literatur vor, die zeigen, welchen Einfluss Kalzifizierungsablagerungen auf das Öffnungsverhalten der Klappentaschen haben. Die erste simulierte Kalzifizierungsablagerung entspricht einer runden Scheibe mit den Maßen $h = 0,1 \text{ mm}$ und $d = 5 \text{ mm}$. Pro Taschenklappe und bezogen auf das Gesamttaschenvolumen von $119,92 \text{ mm}^3$ entspricht dies einem Kalzifizierungsvolumen von $2,12 \text{ mm}^3$ pro Taschenklappe. Die Kommissuren verschieben sich bei einer solchen Klappe um $2,44 \text{ mm}$, der Nodulus wird um 6 mm ausgelenkt. Hieraus resultiert eine Gesamtöffnung von $45,3 \%$. Weitere Kalzifizierungsgeometrien sind in Tabelle 6.8 zusammengefasst. Die dritte Modellierung (Ablagerungen an den Randbereichen der Taschen) weist trotz des geringen Kalzifizierungsvolumens die höchste Spannungsbelastung für den Nodulus und die Kommissuren auf.

Kalzifiziertes Modell	Geometrie	Kalzifiziertes Volumen pro Tasche	max. Auslenkung Nodulus [mm]	Verschiebung der Kommissuren [mm]
1	runde Ablagerung ($\varnothing 5 \text{ mm}$)	$2,12 \text{ mm}^3$	6,02	2,44
2	runde Ablagerung ($\varnothing 10 \text{ mm}$)	$8,9 \text{ mm}^3$	3,8	1,34
3	längliche Ablagerung	$0,159 \text{ mm}^3$	7,8	2,73

Tabelle 6.8: Geometrische Eigenschaften der Kalzifizierungsablagerungen

7 Diskussion

Der größte Nachteil von biologischen Herzklappenprothesen ist ihre kurze Lebensdauer. Dabei bestimmt primär die auftretende Kalzifizierung, wann ein erneuter Austausch des Implantates notwendig wird. Zumeist muss eine Reoperation innerhalb von 7 bis 15 Jahren durchgeführt werden. Die Untersuchung der Kalzifizierung von Herzklappenbioprothesen ist wegen dieses Problems schon seit vielen Jahren ein aktuelles Forschungsthema.

Deiwick et al. fanden durch Versuche heraus, dass humane Explantate zu ähnlichen Kalzifizierungsmustern neigen wie in vitro kalzifizierte Klappenprothesen [65]. Dies wurde sowohl mit der Rasterelektronenmikroskopie (REM) als auch mit dem μ -Computertomographen untersucht [152]. Außerdem wurde bestätigt, dass die Morphologie und Topographie der in vitro erzeugten Ablagerungen denen der in vivo vorkommenden sehr ähnlich sind [159]. Da nachweislich sowohl natürliche als auch xenogene Herzklappen zu einer Kalzifizierung neigen, manifestiert sich die Theorie, dass auch eine Herzklappe, die mittels natürlicher Zellen und künstlichem Gerüst hergestellt wird, ein ähnliches Verhalten der Kalzifizierung aufweisen wird.

Vitalitätsversuche

Durch die Versuche im Bioreaktor konnte verifiziert werden, dass nicht nur die Vitalität von natürlichen Herzklappen aufrecht erhalten wird, sondern auch, dass die Herzklappen sensibel auf Druckveränderungen reagieren. Ausgehend von der Physiologie des Herzens bedeutet ein erhöhter Blutdruck gleichzeitig eine pathologische Veränderung innerhalb des Körpers. Nicht selten werden die Herzklappen beschädigt, wie von Stewart et al. bestätigt wird, da Hypertonie eine Kalzifizierung fördert [75]. Bei einer Druckerhöhung in den hypertonen Bereich (systolische Druckerhöhung ab 20 mmHg) wurde eindeutig das vermehrte Absterben von Zellen nachgewiesen. Nach insgesamt 9 Tagen waren nur noch 34% der Zellen vital. Mohler et al. weisen in ihren Studien zur primären Stimulation einer Kalzifizierung darauf hin, dass eine Kombination aus mechanischer Belastung und Entzündung der Klappe kalzifizierungsfördernd ist. Dies ist auf die belastungsätiologische Endothelverletzung, das Absterben der Zellen und das Eindringen von Makrophagen und T-Zellen zurückzuführen [102].

Strömungsuntersuchungen mittels der Particle Image Velocimetry (PIV)

Um ein auftretendes Kalzifizierungsverhalten näher untersuchen zu können, werden biologische Herzklappenprothesen mittels des Fatigue Accelerated Calcification Tester (FACT) zur beschleunigten *in vitro* Kalzifizierung angeregt. Der FACT ist in vielen Studien bereits auf seine Eignung zur beschleunigten Kalzifizierung von Herzklappenbioprothesen verifiziert worden [65, 71, 72, 152, 159].

Die porcinen Herzklappen, die für die PIV-Untersuchungen kalzifiziert wurden, wiesen unterschiedliche Strömungsformen auf. Alle hatten jedoch die Gemeinsamkeit einer Zunahme der axialen Geschwindigkeit der Strömung durch die Herzklappe, je länger sie im FACT kalzifiziert wurden. Nach 3 Wochen Kalzifizierungsdauer verschob sich die mittige Strömungsform zum Rand hin. Lim et al. sprechen in diesem Zusammenhang von einer Jet-Strömung (siehe Abbildung 7.1), die auch in den hier durchgeführten Versuchen beobachtet werden konnte.

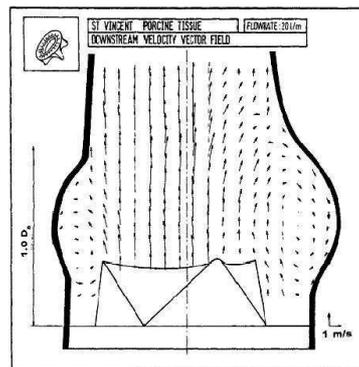


Abbildung 7.1: Strömungsprofil hinter einer porcinen Herzklappe von Lim et al. [137]. Es ist ein mittiger Jet mit Rezirkulationsgebieten im Sinus zu erkennen.

Eine typische Form war besonders beim Öffnungs- und Schließvorgang der Herzklappen im nativen Zustand zu erkennen. Ein mittiger rotationssymmetrischer Jet bildete sich aus, der aufgrund der gleichmäßigen Öffnung der drei Taschen und deren symmetrischen Anlegens an die Aortenwand auftrat. Der Unterschied bei den Untersuchungen von Lim et al. lag darin, dass Rezirkulationsgebiete aufgrund der bauchförmigen Aortenwand vorhanden waren. Diese Gebiete lagen hier aufgrund der geraden Aortenwand nicht vor. Bei diesen Klappen prägte sich eine seitliche Jet-Strömung deshalb besonders deutlich aus.

Anhand von Röntgenbildern konnten nach der vierten Kalzifizierungswoche deutliche Ablagerungsstellen definiert werden. In den meisten Fällen wurden diese vor allem an den Kommissuren festgestellt. Kommissuren sind mechanisch höher belastet, was die Neigung zur Kalzifizierung an diesen Stellen erklärt [60, 159].

Fluid Structure Interaction (FSI)

Hinsichtlich der numerischen Berechnung einer Herzklappenprothese wurde bestätigt, dass eine Klappe mit variabler Dicke, die damit einer natürlichen Herzklappe sehr nahe kommt, realere Ergebnisse liefert als eine Klappe mit konstanter Taschendicke. Die maximale Netzauslenkung bei der Klappe mit konstanter Dicke betrug 0,86 mm, für das Modell mit variabler Dicke 1,147 mm. Bereits Nicosia et al. fanden heraus, dass die Variation in der Klappen­geometrie einen großen Einfluss auf die Klappenbewegung hat [24]. Mit den ausgewählten Modelleigenschaften kam es nicht zu einer vollkommenen Klappenöffnung, allerdings wurde mittels dieser Eigenschaften das zu diesem Zeitpunkt größte Öffnen der Klappe erzeugt. Die maximale Bewegung war zu Beginn der Öffnung im Bauchbereich festzustellen und vergrößerte sich im weiteren Verlauf in Richtung der frei beweglichen Klappenrändern. Im Bereich der konstanten Druckdifferenz vergrößerte sich die Netzauslenkung. Der Grund für die Vergrößerung lag darin, dass die Strömungsgeschwindigkeit in der Öffnungsphase anstieg. Es handelte sich hierbei um ein Verhalten der Trägheit des Systems. Für den 15. Zeitschritt wurde die maximale Geschwindigkeit von $v_{max} = 1,159$ m/s bestimmt. Die Beschleunigung der Strömung war bis zum 12. Zeitschritt markant, was anhand des zeitlichen Verlaufs gezeigt werden konnte. Es folgte zunächst eine konstante Geschwindigkeit, bis ein Abfallen ab dem 20. Zeitschritt auftrat. Trotz des Erreichens der Gesamtsimulationszeit (30. Zeitschritt = 0,03 s) wurde eine maximale Endgeschwindigkeit von $v_{30} = 0,5786$ m/s ermittelt. Der Grund dafür lag in der Trägheit des Fluides, das bei einer Druckdifferenz von 0 mmHg eine Leckage-Strömung durch die initiale Klappen­geometrie aufwies. Diese Leckage-Strömung ist auch in realen Klappenversuchen bzw. durch in vivo Untersuchungsmethoden vorhanden. Hier entstehen während der Systole Wirbel in den Sinus, die zusätzlich für eine schnelle Schließung der Klappe sorgen. Dadurch entsteht ein Rückflussvolumen von $< 5\%$ [28].

Das in dieser Arbeit verwendete Modell entsprach dem Modell von Morsi et al. [140], die verwendeten Festkörper- bzw. Fluideigenschaften unterschieden sich jedoch. Die verwendete Klappe wies ein ähnliches Öffnungsverhalten wie die Klappe von Morsi et al. auf. Eine wellenförmige Öffnungskontur im Bereich des frei beweglichen Randes war in beiden Modellen festzustellen (siehe Abbildung 7.2).

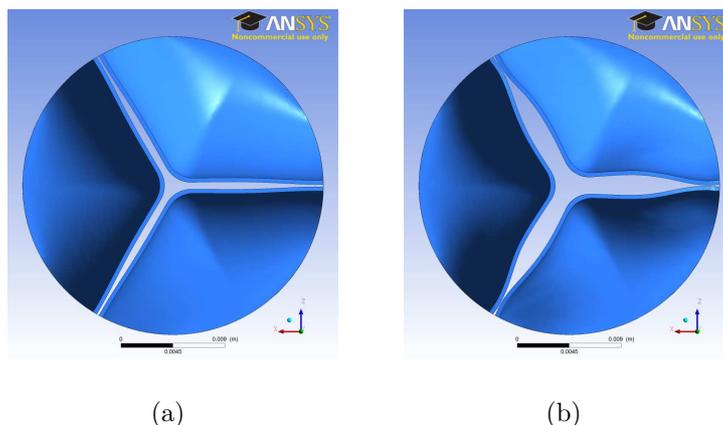


Abbildung 7.2: Darstellung der Klappenöffnung nach 0,05 s (a) bzw. 0,17 s (b). Es lässt sich eine wellenförmige Bewegung im frei beweglichen Rand feststellen. Darstellung der Geometrie mit variabler Klappendicke.

Ein weiterer Vergleich wird mit Hilfe der Geschwindigkeitsvektoren in x- und y-Richtung in Abbildung 7.3 bzw. 7.4 dargestellt. Im Modell von Morsi et. al bildete sich in Klappennähe auf der arteriellen Seite der Klappe in Abhängigkeit der Zeit ein Rezirkulationsgebiet aus. Diese Rezirkulation verhindert einen Kontakt der Klappe mit der Aortenwand.

Bei der Geometrie mit variabler Dicke bildete sich ebenfalls ein Rezirkulationsgebiet aus, welches im Verlauf der Beschleunigungszeit weiter in Richtung Auslass wanderte und sich vergrößerte. Bei einem Vergleich der hier gewonnenen Ergebnisse mit denen von Morsi et al. kann festgestellt werden, dass eine qualitative Übereinstimmung besteht.

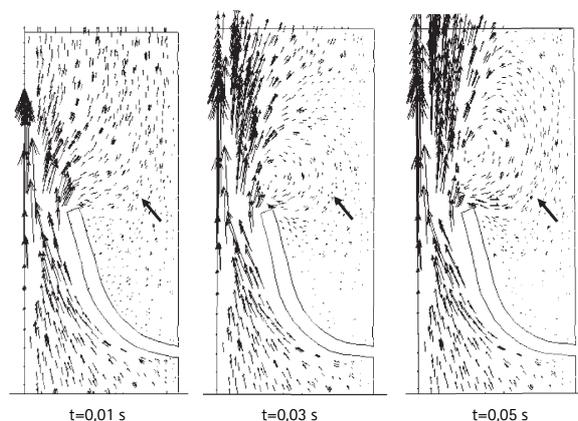


Abbildung 7.3: Darstellung der Geschwindigkeitsvektoren im Modell von Morsi et al. für eine Reynoldszahl von 600 für unterschiedliche Zeitschritte. Vergrößerung des Rezirkulationsgebietes Richtung Auslass.

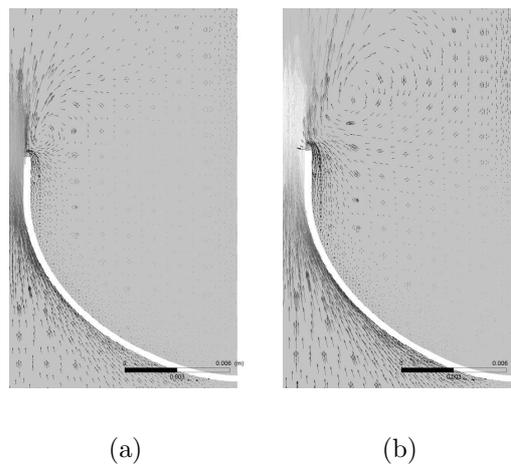


Abbildung 7.4: Darstellung der Geschwindigkeitsvektoren des erstellten Modells. Es bildete sich ebenfalls ein Rezirkulationsgebiet aus. Es lässt sich eine Übereinstimmung der Verwirbelungen zu dem Modell von Morsi et al. feststellen.

Finite Elemente Methode (FEM)

Bei der Simulation mittels der Finiten Elemente Methode (FEM) konnte aufgrund der Ergebnisse der FSI ein Modell erstellt werden, welches einem in-vivo-Modell hinsichtlich der Öffnungszeit ähnelt. Bei dem simulierten Modell wurde die maximale Öffnung nach 168 ms festgestellt, was mit einer Abweichung von + 5 ms den Werten aus echokardiographischen sowie in-vivo-Daten (siehe Anhang Tabelle A.18) entspricht. Die Öffnungszeit im Modell ergab 20 ms, in-vivo-Ergebnisse wurden mit einer Abweichung von 4,1 ms angegeben [160]. Aufgrund der Dilatation öffnete sich das Klappenmodell zu 21 %, wobei sich der Nodulus um 3,17 mm und die Kommissuren um 1,219 mm in radialer Richtung verschoben haben. Die Dilatation wird in der Literatur mit ca. 15 % angegeben [161]. Diese geringen Abweichungen sprechen für die eindeutige Validierung des beschriebenen Modells. Eine realitätsnahe Analyse der Aortenklappenöffnungsbewegung war somit möglich.

Bei der Betrachtung der maximalen von Mises-Spannung waren auch hier die Kommissuren am stärksten belastet (bei 168 ms 815,6 kPa). Verglichen mit Werten aus der Literatur ergab sich eine Abweichung von 17,6 % (693 kPa). An den frei beweglichen Klappenrändern zeigte sich eine Abweichung von 13,45 % (486 kPa) verglichen mit anderen FE-Modellen [142].

Bei der Simulation von örtlichen Steifigkeiten auf der Klappenoberfläche (Kalzifizierungsablagerungen) resultierten Verschiebungen im Bereich der Kommissuren von ca. 2,44 mm, 0,46 mm weniger als bei dem Modell ohne Ablagerungen. Die Querschnittserweiterung der

Aorta verringerte sich somit um 6,47%. Der Nodulus wurde nicht mehr 10 mm, sondern nur noch 6 mm ausgelenkt. Die Klappe öffnete sich nur noch zu 45,3%. Schon in den 80er Jahren stellten Schoen et al. die These auf, dass eine Kalzifizierung an mechanisch stark belasteten Stellen bevorzugt stattfindet und somit die Öffnungsfläche verringert wird [60]. Die simulierten Ergebnisse unterstützen diese These.

Hart et al. [23, 144] haben mit einem generierten Modell das Wash-Out-Verhalten der Aortenklappe simuliert. Auch Weinberg et al. [25, 142] gehen einen Schritt weiter. Die Alterung und der Krankheitsverlauf einer Herzklappe wird bei ihnen thematisiert. Der Einfluss von Kalzifizierungen auf die Spannungsverteilung innerhalb einer Klappe wird jedoch bei keiner Gruppe erörtert.

Für die Simulation der FSI und der FEM lässt sich festhalten, dass unterschiedliche Veröffentlichungen bereits viele Ergebnisse generiert haben. Dennoch werden diese Ergebnisse bis jetzt nur begrenzt für weitere Untersuchungen bzw. Optimierungen eingesetzt.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Herzklappenerkrankungen und damit ein zwingender Ersatz der betroffenen Herzklappe sind weltweit verbreitet. Insuffizienz und Stenose sind hierbei die grundsätzlichen Formen der Erkrankung. Während bei der Insuffizienz die Herzklappe nicht mehr adäquat schließt, verringert sich bei der Stenose die Öffnungsfläche der betroffenen Herzklappe. Die Gründe für eine solche Erkrankung sind ätiologisch zumeist bei der Kalzifizierung der Herzklappen zu finden. Nicht nur Risikofaktoren wie Rauchen, Übergewicht, Lebensgewohnheiten, Ernährung oder Umwelteinflüsse, sondern auch die Gene sind für den Verlauf der Krankheit verantwortlich. Gibt es keine Möglichkeit der medikamentösen Therapie, ist ein Ersatz der Herzklappe unumgänglich. Ein solcher Ersatz kann entweder mit Hilfe einer mechanischen oder biologischen Herzklappenprothese durchgeführt werden. Mechanische Herzklappenprothesen haben den Nachteil der lebenslangen Einnahme von Antikoagulantien, um die Neigung zur Thrombose und Embolie zu unterdrücken. Deshalb werden sie nur in 30 % der Fälle als Ersatzteil gewählt. Biologische Herzklappenprothesen weisen gute hämodynamische Eigenschaften auf, die Lebensdauer ist jedoch u. a. aufgrund von Kalzifizierung begrenzt. Dennoch werden sie aufgrund ihrer überwiegenden Vorteile in 70 % der Operationen eingesetzt. Eine Alternative sind Tissue Engineerte Herzklappenprothesen, die in einem Bioreaktor aus autologen Zellen hergestellt werden. Diese Forschungsrichtung befindet sich noch in den Anfängen, standardmäßig werden diese Prothesen noch nicht eingesetzt. Erste tierexperimentelle und klinische Studien zeigen eine gute Möglichkeit, Tissue Engineerte Herzklappenprothesen zukünftig als Alternative für mechanische und biologische Herzklappenprothesen einzusetzen. Eine Langzeitprognose hinsichtlich der Haltbarkeit bzw. Kalzifizierung solcher Prothesen liegt jedoch nicht vor. Langzeitversuche mit modernen Analysemethoden wie Strömungvalidierung mittels PIV oder μ -Computertomographie sind für die Einschätzung einer auftretenden Kalzifizierung bei Tissue Engineerten Herzklappenprothesen notwendig.

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung und Verifizierung eines Bioreaktors vorgestellt, der die Vitalität von natürlichen Herzklappen aufrecht erhalten soll. Der Reaktor ist dafür ausgelegt worden, um in Zukunft eine Tissue Engineerte Herzklappenprothese zu kultivieren und zu kalzifizieren. Im Hinblick auf Validierung und Verifizierung sind

Versuche mit lebenden Herzklappen aus dem Schlachthof durchgeführt und mit Hilfe des Bioreaktors 14 Tage vital gehalten worden. Dieses wurde mit einer Live/Dead-Färbung von lebenden/toten Zellen belegt. Nach 14 Tagen konnte eine Überlebenszahl der Zellen von ca. 97% festgestellt werden. Der Reaktor wurde sowohl bei einer physiologischen Druckdifferenz (Aortendruck 80 – 100 mmHg, Ventrikeldruck Austreibungsphase 120 – 140 mmHg), als auch bei einer Erhöhung um ca. 20 mmHg (Aortendruck 80 – 100 mmHg, Ventrikeldruck Austreibungsphase 140 – 160 mmHg) betrieben. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen bei einer Druckerhöhung nach 5 Tagen schon zu ca. 50%, bei 9 Tagen bereits zu 70% geschädigt wurden. Aufgrund der veränderten Umgebungsbedingungen und des semi-physiologischen Fluides schienen die Zellen der Herzklappe empfindlicher auf Druck zu reagieren und starben vermehrt ab. Der Einfluss einer Kalzifizierung auf das Absterben der Zellen konnte aufgrund von ständiger Frischzufuhr von Endothelzellmedium nicht untersucht werden, was in zukünftigen Versuchen jedoch notwendig ist, da das Absterben der Zellen einen Einfluss auf die Kalzifizierungsneigung hat.

Hinsichtlich auftretender Kalzifizierung und Herstellung zukünftiger Herzklappenprothesen sind weitere Untersuchungsmethoden entwickelt worden. Kalzifizierungsablagerungen können mit unterschiedlichen Methoden untersucht werden. Bei der Röntgenanalyse werden den unterschiedlichen Geweben Graustufen zugeordnet und mit ihrer Hilfe die kalzifizierten Bereiche eingegrenzt. Häufig tritt hierbei das Problem auf, dass dichtes Gewebe als Kalzifizierung gedeutet wird, da sich der Graustufenbereich aus der Literatur in einem weiten Bereich befindet (262 – 512 HU). Um diesen Bereich auf kalzifizierte Areale einzugrenzen, ist eine Herzklappe mit Hydroxylapatit präpariert worden, um die definierte Lokalisation der Kalzifizierung sicherzustellen. Nach der Trocknung erfolgte eine Einbettung in Epoxidharz. Anschließend wurden mit einem Poliergerät Schriffe abgetragen. Die Bilder der geschliffenen Probe wurden mit den Schnittbildern eines Computertomographen (Nanotom) verglichen. Der tatsächliche Graustufenbereich konnte nach diesen Untersuchungen zwischen 250 und 450 HU eingegrenzt werden.

Eine weitere Untersuchung zur Herzklappenkalzifizierung wurde mittels der Particle Image Velocimetry durchgeführt. Hierbei ist die Strömung sowohl durch native und fixierte, als auch durch ein- bis vierwöchig kalzifizierte Herzklappen gemessen worden. Signifikant bei den Ergebnissen ist der mittige Jet während der Öffnung und Schließung der nativen Herzklappe, der sich mit zunehmender Kalzifizierung seitlich ausprägte. Dieses Verhalten der Strömung konnte mit Hilfe von Röntgenaufnahmen belegt werden. Die Tendenz seitlich ausgeprägter Strömung entstand aus der Versteifung der Taschen aufgrund von Kalzifizierung. Im nativen Zustand wies die Herzklappe eine weitaus

geringere maximale Axialgeschwindigkeit als nach vierwöchiger Kalzifizierung auf. Kalzifizierungsuntersuchungen können nicht nur experimentell, sondern auch numerisch betrachtet werden. Es steht hier die Fluid Structure Interaction (FSI) sowie die Untersuchung mit Hilfe der Finite Elemente Methode (FEM) zur Verfügung. Innerhalb der FSI wurden zwei Herzklappenmodelle untersucht, die sich in ihrer Taschengeometrie unterschieden. Bei dem Modell mit variabler Taschendicke zeigte sich der Einfluss auf das Öffnungsverhalten und auf die Bewegungsfläche der Herzklappe ausgeprägter als bei konstanter Taschengeometrie. Bei der FEM sind wiederum zwei Geometrien untersucht worden. Gute Ergebnisse konnten mit der Geometrie, die sich an Literaturwerten orientiert, erzielt werden. Die Klappe öffnete sich zu ca. 90 %. Eine Öffnung der Klappe nur aufgrund der Dilatation (Öffnung der Herzklappe nur aufgrund des Herzdruckes ohne den Einfluss einer Strömung) konnte mit 21 % festgestellt werden (Literaturwert Dilatation: 15 %). In einem letzten Schritt wurde ein Modell erstellt, das unterschiedliche Kalzifizierungsablagerungen aufwies. Die größte Beeinflussung der Spannungsverteilung und des Öffnungsverhaltens wiesen die Ablagerungen an den Kommissuren der Taschen auf. Im Bereich der Kommissuren kommt es aufgrund der hier höher liegenden Spannungen zu einer Kalzifizierung. Die simulierten Spannungen an diesen Stellen bestätigten die Theorie.

Für zukünftige Verifizierungen von Tissue Engineerten Herzklappenprothesen müssen reale Kalzifizierungsstudien mit diesen Prothesen durchgeführt werden. Die heutige Technik des Tissue Engineering wird zeitnah in der Lage sein, eine humane Tissue Engineerte Herzklappe im Bioreaktor zu kultivieren, ihr Strömungsverhalten und die Kinematik ihrer Taschen mit Methoden der Particle Image Velocimetry zu validieren. Für eine realitätsnähere Untersuchung sollte ein Reaktor konstruiert werden, der der natürlichen Form der Aorta inklusive Krümmung und Länge nahe kommt, um etwaige Einflüsse durch das hier verwendete starre Rohr ausschließen zu können, da der Aortenbogen fast unmittelbar an die Aortenklappe anschließt, was die Geschwindigkeiten des Blutes durch die Herzklappe deutlich beeinflussen wird. Weiterhin müssen Simulationsmodelle vermehrt eingesetzt werden, da viele Parameter untersucht und Modelle erstellt werden können, die ein neues spannungsgarnes Design einer realen Herzklappe hervorbringen können. Auch die Modellierung der Kollagenfasern sowie die Beschreibung der Anisotropie des biologischen Materials stellt eine wissenschaftliche Herausforderung dar. Eine Validierung der Ergebnisse mittels realer Messungen der Spannungsverläufe ist mit aktueller Technik zur Zeit nicht möglich. Deshalb ist eine Beeinflussung der eingesetzten Vereinfachungen zukünftig zu erörtern.

Eine Verifizierung mit Literaturdaten ist durchzuführen, sobald vergleichbare Simulationen von Kalzifizierungsablagerungen aus der FEM vorliegen.

Die Untersuchung der Spannungsverteilung aufgrund von Kalzifizierungen ist sowohl bei der xenogenen als auch bei im Reaktor hergestellten autologen Herzklappen von großer Bedeutung. Vergleichswerte anderer Forschergruppen für die FSI- bzw. FEM-Simulation sind nicht oder nur unvollständig vorhanden. Fortführende Untersuchungen sollten auf MRT-Daten basieren, damit ein reales kalzifiziertes Klappenmodell erstellt und dessen Spannung aufgrund pathologischer Veränderungen untersucht werden kann.

Weiterhin ist es möglich, Kalzifizierungsablagerungen mit Fluoreszenzmethoden differenzierter zu untersuchen. Es existieren Fluoreszenzmarker, die sich bevorzugt an Calcium ablagern. Mit dieser Methode kann dann die Calciumablagerung bereits auf atomarer Ebene betrachtet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] C. E. Sarraf, A. B. Harris, A. D. McCulloch und M. Eastwood: *Heart valve and arterial tissue engineering*. Cell Prolif, 36(5):241–254, 2003.
- [2] E. Erdmann: *Klinische Kardiologie*. Springer Verlag, Heidelberg, 2009.
- [3] K. Mendelson und F. J. Schoen: *Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges*. Ann Biomed Eng, 34(12):1799–1819, 2006.
- [4] Deutsche Gesellschaft für Gewebeersatz: *Mündliche Mitteilung*. 2012.
- [5] E. Brückenberger: *Herzbericht 2009*. 22. Bericht Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie und Herzchirurgie in Deutschland sowie vergleichende Daten aus Österreich und der Schweiz, 2009.
- [6] H. Körtke: *Mündliche Mitteilung*. 2010.
- [7] G. Hoffmann, G. Luther und J. Cremer: *Verbesserte Haltbarkeit von biologischen Herzklappen*. Ärzteblatt, 105(8):143–148, 2008.
- [8] M. Kucharek: *Lehrbuch für Operationspflegekräfte: Medizinische Grundlagen*. Urban und Fischer, München, 2002.
- [9] T. Tolxdorff: *Bildverarbeitung in der Medizin*. Springer Verlag, Berlin, 2006.
- [10] V. Hombach: *Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie: Technik, Klinik, Therapie*. Schattauer, Stuttgart, New York, 2001.
- [11] A. Bernardo: *Gut Leben mit der neuen Herzklappe*. Trias, Stuttgart, 2002.
- [12] L. Guilherme¹, R. Ramasawmy¹ und J. Kalil¹: *Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease: Genetics and Pathogenesis*. Scand J Immunology, 66(2-3):199–207, 2007.
- [13] B. F. Stewart, D. Siscovick, B. K. Lind, J. M. Gardin, J. S. Gottdiener, V. E. Smith, D. W. Kitzman und C. M. Otto: *Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease*. J Am Coll Cardiology, 29(3):630–634, 1997.

- [14] I. Tudorache, S. Cebotari, G. Sturz, L. Kirsch, C. Hurschler, A. Hilfiker, A. Haverich und A. Lichtenberg: *Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves*. Journal of Heart Valve Disease, 16(5):567–573, 2007.
- [15] M. Krings: *Beschleunigte in vitro Kalzifikation gerüstringloser Herzklappenbioprothesen*. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover, 2007.
- [16] L. Waite und J. Fine: *Applied Biofluid Mechanics*. Mc Graw Hill, 2007.
- [17] H. Fritsch und W. Kühnel: *Taschenatlas der Anatomie*. Georg Thieme Verlag KG, 9. Auflage, 2005.
- [18] Wikipedia: <http://de.wikipedia.org/wiki/Rückschlagventil>, 2009.
- [19] <http://patricklynch.net>. 2003.
- [20] E. Mutschler, H. G. Schaible und P. Vaupel: *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 6. Auflage, 2007.
- [21] A. P. Yoganathan, Z. He und S. C. Jones: *Fluid mechanics of heart valves*. Annu Rev Biomed Eng, 6:331–362, 2004.
- [22] S. Geroulanos: *Bioprothesen - Ihre Veränderungen und deren Bedeutung*. Verlag Hans Huber, Bern Stuttgart Toronto, 1985.
- [23] J. D. Hart, G. W.M. Peters, P. J. G. Schreurs und F. P. T. Baaijens: *A three-dimensional computational analysis of fluid-structure interaction in the aortic valve*. J Biomech, 36(1):103–112, 2003.
- [24] M. A. Nicosia, R. P. Cochran, D. R. Einstein, C. J. Rutland und K. S. Kunzelman: *A coupled fluid-structure finite element model of the aortic valve and root*. J Heart Valve Dis, 12(6):781–789, 2003.
- [25] E. J. Weinberg, F. J. Schoen und M. R. K. Mofrad: *A computational model of aging and calcification in the aortic heart valve*. PLoS One, 4(6):e5960, 2009.
- [26] O. Rossvoll, S. Samstad, H. G. Torp, D. T. Linker, T. Skjaerpe, B. A. Angelsen und L. Hatle: *The velocity distribution in the aortic annulus in normal subjects: a quantitative analysis of two-dimensional Doppler flow maps*. J Am Soc Echocardiogr, 4(4):367–378, 1991.

-
- [27] M. J. Thubrikar, J. L. Heckman und S. P. Nolan: *High speed cine-radiographic study of aortic valve leaflet motion*. J Heart Valve Dis, 2(6):653–661, 1993.
- [28] B. Bellhouse und F. Bellhouse: *Fluid mechanics of model normal and stenosed aortic valves*. Circ Res, 25(6):693–704, 1969.
- [29] M. Lindroos, M. Kupari, J. Heikkilä und R. Tilvis: *Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample*. J Am Coll Cardiol, 21(5):1220–1225, 1993.
- [30] C. M. Otto, J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, A. M. Gown und K. D. O’Brien: *Characterization of the early lesion of ‘degenerative’ valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies*. Circulation, 90(2):844–853, 1994.
- [31] O. Dzemali, F. Bakhtiary, U. Steinseiffer, C. Schmitz, B. Glasmacher, A. Moritz und P. Kleine: *Impact of valve calcification on systolic and diastolic valvular function—an in vitro model*. J Cardiovasc Surg (Torino), 49(6):817–824, 2008.
- [32] A. Goldemund: *In vitro Endothelialisierung glutaraldehyfixierter porciner Herzklappen*. Dissertation. Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2006.
- [33] T. Folliguet, A. Dibie und F. Laborde: *Future of cardiac surgery: minimally invasive techniques in sutureless valve resection*. Future Cardiol, 5(5):443–452, 2009.
- [34] F. Beyersdorf: *Zunehmende Zahl der Herzklappenoperationen*. Dtsch Ärzteblatt, 102(30):A–2089, 2005.
- [35] J. F. Gummert, A. Funkat, A. Beckmann, W. Schiller, K. Hekmat, M. Ernst und A. Haverich: *Cardiac surgery in Germany during 2010. A report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Thorac Cardiovasc Surg, 10(6):Epub ahead of print, 2011.
- [36] M. Misfeld und H. H. Sievers: *Die Aortenklappenchirurgie - gestern, heute und morgen*. Focus MUL (Universität zu Lübeck), 23 (2):82–89, 2006.
- [37] R. F. Siddiqui, J. R. Abraham und J. Butany: *Bioprosthetic heart valves: modes of failure*. Histopathology, 55(2):135–144, 2009.
- [38] <http://www.kgu.de/zchir/THG%2DChirurgie/klappenchir.html>. 2011.

- [39] Gemeinnützige Gesellschaft für Gewebetransplantation. Jahresbericht 2005.
- [40] <http://www.herzlinik.muenchen.de/fachkreise/wissenschaft/forschungsschwerpunkte/homograft/>.
- [41] F. Bakhtiary, O. Dzemali, U. Steinseiffer, C. Schmitz, B. Glasmacher, A. Moritz und P. Kleine: *Hydrodynamic comparison of biological prostheses during progressive valve calcification in a simulated exercise situation. An in vitro study.* European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 34:960–963, 2008.
- [42] H. S. Rapoport, J. M. Connolly, J. Fulmer, N. Dai, B. H. Murti, R. C. Gorman, J. H. Gorman, I. Alferiev und R. J. Levy: *Mechanisms of the in vivo inhibition of calcification of bioprosthetic porcine aortic valve cusps and aortic wall with triglycidylamine/mercapto bisphosphonate.* Biomaterials, 28(4):690–699, 2007.
- [43] <http://www.hgz-bb.de/inhalt/klinik-fuer-herz-thorax-chirurgie/herzoperationen/operative-behandlung-bei-aortenklappenshyerkrankungen.html> Transapikaler und transfemoraler Aortenklappenersatz.
- [44] <http://www.htchirurgie.uniklinikum-jena.de>. 2009.
- [45] M. Epple: *Biomaterialien und Biomineralisation.* Seiten 126–131, 2003.
- [46] R. F. Schmidt und G. Thews (Hrsg.): *Physiologie des Menschen.* 1995.
- [47] J. D. Termine und A. S. Posner: *Calcium phosphate formation in vitro: I. Factors affecting initial phase separation.* Biochem Biophys, 140(2):307–317, 1970.
- [48] P. Karlson: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964.
- [49] E. Buddecke: *Grundriss der Biochemie.* Walter de Gruyter Verlag Berlin, 1985.
- [50] H. S. Rapoport, J. M. Connolly, J. Fulmer, N. Dai, B. H. Murti, R. C. Gorman, J. H. Gorman, I. Alferiev und R. J. Levy: *Mechanisms of the in vivo inhibition of calcification of bioprosthetic porcine aortic valve cusps and aortic wall with triglycidylamine/mercapto bisphosphonate.* Biomaterials, 28(4):690–699, 2007.
- [51] B. B. Tomazic, W. E. Brown und F. J. Schoen: *Physicochemical properties of calcific deposits isolated from porcine bioprosthetic heart valves removed from patients following 2-13 years function.* J Biomed Mater Res, 28(1):35–47, 1994.

-
- [52] B. B. Tomazic, L. C. Chow, C. M. Carey und A. J. Shapiro: *An in vitro diffusion model for the study of calcification of bovine pericardium tissue*. J Pharm Sci, 86(12):1432–1438, 1997.
- [53] G. H. Nancollas, M. LoRe, L. Perez, C. Richardson und S. J. Zawacki: *Mineral phases of calcium phosphate*. Anat Rec, 224(2):234–241, 1989.
- [54] B. B. Tomazic: *Physiochemical principles of cardiovascular calcification*. Z Kardiol, 90 Suppl 3:68–80, 2001.
- [55] R. Tang, M. Hass, W. Wu, S. Gulde und G. H. Nancollas: *Constant composition dissolution of mixed phases. II. Selective dissolution of calcium phosphates*. J Colloid Interface Sci, 260(2):379–384, 2003.
- [56] W. E. Brown, N. Eidelman und B. Tomazic: *Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation*. Adv Dent Res, 1(2):306–313, 1987.
- [57] E. Pettenazzo, M. Deiwick, G. Thiene, G. Molin, B. Glasmacher, F. Martignago, T. Bottio, H. Reul und M. Valente: *Dynamic in vitro calcification of bioprosthetic porcine valves: evidence of apatite crystallization*. J Thorac Cardiovasc Surg, 121(3):500–509, 2001.
- [58] F. J. Schoen und R. J. Levy: *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention*. Ann Thorac Surg, 79(3):1072–1080, 2005.
- [59] K. M. Kim, G. A. Herrera und H. D. Battarbee: *Role of glutaraldehyde in calcification of porcine aortic valve fibroblasts*. Am J Pathol, 154(3):843–852, 1999.
- [60] F. J. Schoen und R. J. Levy: *Bioprosthetic heart valve failure: pathology and pathogenesis*. Cardiol Clin, 2(4):717–739, 1984.
- [61] B. Glasmacher und M. Dewick: *Kalzifizierung porciner Bioprothese: Korrelation von holographischer Interferometrie und dynamischer in vitro Kalzifizierung*. Research Report Helmholtz-Institut Aachen, 10:41–47, 1995/96.
- [62] M. Deiwick, B. Glasmacher, A. M. Zarubin, H. Reul, A. Geiger, G. von Bally, A. Stargardt, G. Rau und H. H. Scheld: *Quality control of bioprosthetic heart valves by means of holographic interferometry*. J Heart Valve Dis, 5(4):439–7, 1996.
- [63] B. Glasmacher, M. Deiwick, H. Reul, H. Knesch, D. Keus und G. Rau: *A new in vitro test method for calcification of bioprosthetic heart valves*. Int J Artif Organs, 20(5):267–271, 1997.

- [64] B. Glasmacher und M. Deiwick: *Kalzifizierung biologischer Herzklappenprothesen*. In: *Wintermantel*. Medizintechnik. Life Science Engineering. Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage:1175–1190, 2008.
- [65] M. Deiwick, B. Glasmacher, E. Pettenazzo, D. Hammel, W. Castellón, G. Thiene, H. Reul, E. Berendes und H. H. Scheld: *Primary tissue failure of bioprotheses: new evidence from in vitro tests*. *Thorac Cardiovasc Surg*, 49(2):78–83, 2001.
- [66] O. Dzemali, F. Bakhtiary, U. Steinseiffer, C. Schmitz, B. Glasmacher, A. Moritz und P. Kleine: *Opening and closing kinematics of fresh and calcified aortic valve prostheses—an in vitro study*. *Journal of Thorac and Cardiovasc Surg*, 134:657–662, 2007.
- [67] O. Dzemali, F. Bakhtiary, U. Steinseiffer, C. Schmitz, B. Glasmacher, A. Moritz und P. Kleine: *Hemodynamic performance of fresh and calcified aortic valve prostheses in critical low stroke volume*. *Journal of Heart Valve Disease*, 17(3):317–324, 2008.
- [68] R. Zeeman: *Cross linking of collagen based Materials*. Dissertation. University of Twente, Enschede, The Netherlands. 1998.
- [69] B.G. Barrett-Boyes, G.W. Christie und P.J. Raudkivi: *The stentless bioprotheses: surgical challenges and implications for long-term durability*. *Eur J Cardio-Thoracic Surgery*, 6 (1):39–43, 1992.
- [70] M. Krings, F. Everaerts, M. Torrianni, M. Hendriks und B. Glasmacher: *In vitro calcification of stentless bioprotheses: comparison of 5 glutaraldehyde fixated vs. 5 medtronic prototypes called Idefix*. *Int J Artif Organs*, 28(9):103, 2005.
- [71] M. Krings, D. Kanellopoulou, P. D. Koutsoukos, D. Mavrillas und B. Glasmacher: *Development of a new combined test setup for accelerated dynamic pH-controlled in vitro calcification of porcine heart valves*. *Int J Artif Organs*, 32(11):794–801, 2009.
- [72] M. Krings, D. Kanellopoulou, D. Mavrillas und B. Glasmacher: *In vitro pH-controlled calcification of biological heart valve prostheses*. *Mat-Wiss u Werkstofftech*, 37:432–435, 2006.
- [73] M. Tanahashi, T. Yao, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto, T. Nakamura und T. Yamamuro: *Apatite coating on organic polymers by a biomimetic process*. *Journal of American Ceramic Society*, 77:2805–2808, 1994.

- [74] J. F. Manoa, R. A. Sousaa, L. F. Boesela, N. M. Neves und R. L. Reisa: *Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments*. *Composites Science and Technology*, 64(6):789–817, 2004.
- [75] B. F. Stewart, D. Siscovick, B. K. Lind, J. M. Gardin, J. S. Gottdiener, V. E. Smith, D. W. Kitzman und C. M. Otto: *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease*. *Cardiovascular Health Study*. *J Am Coll Cardiol*, 29(3):630–634, 1997.
- [76] W. S. Aronow, C. Ahn, I. Kronzon und M. E. Goldman: *Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons*. *Am J Cardiol*, 88(6):693–695, 2001.
- [77] S. Palta, A. M. Pai, K. S. Gill und R. G. Pai: *New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention*. *Circulation*, 101(21):2497–2502, 2000.
- [78] M. Peltier, F. Trojette, M. E. Sarano, F. Grigioni, M. A. Slama und C. M. Tribouilloy: *Relation between cardiovascular risk factors and nonrheumatic severe calcific aortic stenosis among patients with a three-cuspid aortic valve*. *Am J Cardiol*, 91(1):97–99, 2003.
- [79] M. C. Chui, D. E. Newby, M. Panarelli, P. Bloomfield und N. A. Boon: *Association between calcific aortic stenosis and hypercholesterolemia: is there a need for a randomized controlled trial of cholesterol-lowering therapy?* *Clin Cardiol*, 24(1):52–55, 2001.
- [80] K. Pohle, R. Mäffert, D. Ropers, W. Moshage, N. Stilianakis, W. G. Daniel und S. Achenbach: *Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors*. *Circulation*, 104(16):1927–1932, 2001.
- [81] K. D. O'Brien, D. D. Reichenbach, S. M. Marcovina, J. Kuusisto, C. E. Alpers und C. M. Otto: *Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(4):523–532, 1996.
- [82] N. M. Rajamannan, W. D. Edwards und T. C. Spelsberg: *Hypercholesterolemic aortic-valve disease*. *N Engl J Med*, 349(7):717–718, 2003.

- [83] F. C. Caira, S. R. Stock, T. G. Gleason, E. C. McGee, J. Huang, R. O. Bonow, T. C. Spelsberg, P. M. McCarthy, S. H. Rahimtoola und N. M. Rajamannan: *Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation*. J Am Coll Cardiol, 47(8):1707–1712, 2006.
- [84] N. M. Rajamannan, G. Sangiorgi, M. Springett, K. Arnold, T. Mohacsi, L. G. Spagnoli, W. D. Edwards, A. J. Tajik und R. S. Schwartz: *Experimental hypercholesterolemia induces apoptosis in the aortic valve*. J Heart Valve Dis, 10(3):371–374, 2001.
- [85] H. A. Baba, M. Deiwick, D. Breukelmann, B. Glasmacher, H. H. Scheld und W. Böcker: *Einfluss präexistenter Lipide auf die Verkalkung von Schweinebioklappenprothesen: Eine Untersuchung am dynamischen In-vitro-Modell*. Pathologe, 19:425–429, 1998.
- [86] M. Olsson, J. Thyberg und J. Nilsson: *Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 19(5):1218–1222, 1999.
- [87] B. Jian, P. L. Jones, Q. Li, E. R. Mohler, F. J. Schoen und R. J. Levy: *Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis*. Am J Pathol, 159(1):321–327, 2001.
- [88] M. Olsson, C. J. Dalsgaard, A. Haegerstrand, M. Rosenqvist, L. Rydén und J. Nilsson: *Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves*. J Am Coll Cardiol, 23(5):1162–1170, 1994.
- [89] E. R. Mohler, M. K. Chawla, A. W. Chang, N. Vyavahare, R. J. Levy, L. Graham und F. H. Gannon: *Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves*. J Heart Valve Dis, 8(3):254–260, 1999.
- [90] B. Wu, S. Elmariah, F. S. Kaplan, G. Cheng und E. R. Mohler: *Paradoxical effects of statins on aortic valve myofibroblasts and osteoblasts: implications for end-stage valvular heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 25(3):592–597, 2005.
- [91] N. M. Rajamannan, M. Subramaniam, S. R. Stock, N. J. Stone, M. Springett, K. I. Ignatiev, J. P. McConnell, R. J. Singh, R. O. Bonow und T. C. Spelsberg: *Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve*. Heart, 91(6):806–810, 2005.

-
- [92] N. M. Rajamannan, M. Subramaniam, F. Caira, S. R. Stock und T. C. Spelsberg: *Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway*. *Circulation*, 112(9 Suppl):I229–I234, 2005.
- [93] P. M. Ridker, C. P. Cannon, D. Morrow, N. Rifai, L. M. Rose, C. H. McCabe, M. A. Pfeffer und E. Braunwald and: *C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy*. *N Engl J Med*, 352(1):20–28, 2005.
- [94] I. Inoue, S. Goto, K. Mizotani, T. Awata, T. Mastunaga, S. Kawai, T. Nakajima, S. Hokari, T. Komoda und S. Katayama: *Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells*. *Life Sci*, 67(8):863–876, 2000.
- [95] R. S. Rosenson. C. C. Tangney. L. C. Casey: *Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin*. *Lancet*, 353(9157):983–984, 1999.
- [96] R. Rosenhek, F. Rader, N. Loho, H. Gabriel, M. Heger, U. Klaar, M. Schemper, T. Binder, G. Maurer und H. Baumgartner: *Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis*. *Circulation*, 110(10):1291–1295, 2004.
- [97] G. M. Novaro, I. Y. Tiong, G. L. Pearce, M. S. Lauer, D. L. Sprecher und B. P. Griffin: *Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis*. *Circulation*, 104(18):2205–2209, 2001.
- [98] M. F. Bellamy, P. A. Pellikka K. W. Klarich, A. J. Tajik und M. Enriquez-Sarano: *Association of cholesterol levels, hydroxymethylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitor treatment, and progression of aortic stenosis in the community*. *J Am Coll Cardiol*, 40(10):1723–1730, 2002.
- [99] J. J. Kaden, C. E. Dempfle, R. Grobholz, C. S. Fischer, D. C. Vocke, R. Kiliç, A. Sarikoç, R. Piñol, S. Hagl, S. Lang, M. Brueckmann und M. Borggrefe: *Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis*. *Cardiovasc Pathol*, 14(2):80–87, 2005.
- [100] R. Katz, N. D. Wong, R. Kronmal, J. Takasu, D. M. Shavelle, J. L. Probstfield, A. G. Bertoni, M. J. Budoff und K. D. O'Brien: *Features of the metabolic syndrome*

- and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis.* Circulation, 113(17):2113–2119, 2006.
- [101] W. S. Aronow, K. S. Schwartz und M. Koenigsberg: *Correlation of serum lipids, calcium, and phosphorus, diabetes mellitus and history of systemic hypertension with presence or absence of calcified or thickened aortic cusps or root in elderly patients.* Am J Cardiol, 59(9):998–999, 1987.
- [102] E. R. Mohler, F. Gannon, C. Reynolds, R. Zimmerman, M. G. Keane und F. S. Kaplan: *Bone formation and inflammation in cardiac valves.* Circulation, 103(11):1522–1528, 2001.
- [103] E. R. Mohler, L. P. Adam, P. McClelland, L. Graham und D. R. Hathaway: *Detection of osteopontin in calcified human aortic valves.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17(3):547–552, 1997.
- [104] N. M. Rajamannan, M. Subramaniam, D. Rickard, S. R. Stock, J. Donovan, M. Springett, T. Orszulak, D. A. Fullerton, A. J. Tajik, R. O. Bonow und T. Spelsberg: *Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype.* Circulation, 107(17):2181–2184, 2003.
- [105] J. J. Kaden, S. Bickelhaupt, R. Grobholz, C. F. Vahl, S. Hagl, M. Brueckmann, K. K. Haase, C. E. Dempfle und M. Borggrefe: *Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis.* J Heart Valve Dis, 13(4):560–566, 2004.
- [106] S. A. Steitz, M. Y. Speer, M. D. McKee, L. Liaw, M. Almeida, H. Yang und C. M. Giachelli: *Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification.* Am J Pathol, 161(6):2035–2046, 2002.
- [107] J. S. Shao, S. L. Cheng, J. M. Pingsterhaus, N. Charlton-Kachigian, A. P. Loewy und D. A. Towler: *Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals.* J Clin Invest, 115(5):1210–1220, 2005.
- [108] J. R. Ortlepp, R. Hoffmann, F. Ohme, J. Lauscher, F. Bleckmann und P. Hanrath: *The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis.* Heart, 85(6):635–638, 2001.
- [109] G. M. Novaro, R. Sachar, G. L. Pearce, D. L. Sprecher und B. P. Griffin: *Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease.* Circulation, 108(15):1804–1808, 2003.

-
- [110] P. Nordström, C. A. Glader, G. Dahlén, L. Slunga Birgander, R. Lorentzon, A. Waldenström und M. Lorentzon: *Oestrogen receptor alpha gene polymorphism is related to aortic valve sclerosis in postmenopausal women*. J Intern Med, 254(2):140–146, 2003.
- [111] V. Garg, A. N. Muth, J. F. Ransom, M. K. Schluterman, R. Barnes, I. N. King, P. D. Grossfeld und D. Srivastava: *Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease*. Nature, 437(7056):270–274, 2005.
- [112] F. Robicsek, M. J. Thubrikar, J. W. Cook und B. Fowler: *The congenitally bicuspid aortic valve: how does it function? Why does it fail?* Ann Thorac Surg, 77(1):177–185, 2004.
- [113] A. Charest, A. Pépin, R. Shetty, C. Côté, P. Voisine, F. Dagenais, P. Pibarot und P. Mathieu: *Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis*. Heart, 92(12):1844–1849, 2006.
- [114] M. Olsson, M. Rosenqvist und J. Nilsson: *Expression of HLA-DR antigen and smooth muscle cell differentiation markers by valvular fibroblasts in degenerative aortic stenosis*. J Am Coll Cardiol, 24(7):1664–1671, 1994.
- [115] S. Helske, K. A. Lindstedt, M. Laine, M. Mäyränpää, K. Werkkala, J. Lommi, H. Turto, M. Kupari und P. T. Kovanen: *Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves*. J Am Coll Cardiol, 44(9):1859–1866, 2004.
- [116] J. J. Kaden, C. E. Dempfle, R. Grobholz, H. T. Tran, R. Kiliç, A. Sarikoç, M. Brueckmann, C. Vahl, S. Hagl, K. K. Haase und M. Borggrefe: *Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis*. Atherosclerosis, 170(2):205–211, 2003.
- [117] Z. S. Galis, G. K. Sukhova, M. W. Lark und P. Libby: *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 94(6):2493–2503, 1994.
- [118] S. T. Nikkari, K. D. O’Brien, M. Ferguson, T. Hatsukami, H. G. Welgus, C. E. Alpers und A. W. Clowes: *Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis*. Circulation, 92(6):1393–1398, 1995.
- [119] Z. S. Galis, G. K. Sukhova, R. Kranzhöfer, S. Clark und P. Libby: *Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(2):402–406, 1995.

- [120] J. L Reynolds, A. J. Joannides, J. N. Skepper, R. McNair, L. J. Schurgers, D. Proudfoot, W. Jahnen-Dechent, P. L. Weissberg und C. M. Shanahan: *Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD*. J Am Soc Nephrol, 15(11):2857–2867, 2004.
- [121] L. L. Demer: *A skeleton in the atherosclerosis closet*. Circulation, 92(8):2029–2032, 1995.
- [122] K. Boström, K. E. Watson, S. Horn, C. Wortham, I. M. Herman und L. L. Demer: *Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 91(4):1800–1809, 1993.
- [123] B. Johansson, A. Holmgren, M. Hedström, A. Engström-Laurent und K. G. Engström: *Evaluation of hyaluronan and calcifications in stenotic and regurgitant aortic valves*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 39(1): 27–32.
- [124] S. P. Hoerstrup, I. Cummings, M. Lachat, F. J. Schoen, R. Jenni, S. Leschka, S. Neuenschwander, D. Schmidt, A. Mol, C. Günter, M. Gössi, M. Genoni und G. Zund: *Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model*. Circulation, 114(1 Suppl):I159–I166, 2006.
- [125] S. Cebotari, A. Lichtenberg, I. Tudorache, A. Hilfiker, H. Mertsching, R. Leyh, T. Breyman, K. Kallenbach, L. Maniuc, A. Batrinac, O. Repin, O. Maliga, A. Ciubotaru und A. Haverich: *Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells*. Circulation, 114(1 Suppl):I132–I137, 2006.
- [126] M. Rothenburger, W. Volker, P. Vischer, E. Berendes, B. Glasmacher, H. H. Scheld und M. Deiwick: *Tissue engineering of heart valves: formation of a three-dimensional tissue using porcine heart valve cells*. ASAIO Journal, 48(6):586–591, 2002.
- [127] M. Rothenburger, W. Volker, P. Vischer, B. Glasmacher, H. H. Scheld und M. Deiwick: *Ultrastructure of proteoglycans in tissue-engineered cardiovascular structures*. Tissue Engineering, 8(6):1049–1056, 2002.
- [128] L. Krämer: *Isolierung und Kryokonservierung von vaskulären Zellen aus menschlichen Nabelschnurgefäßen für das Tissue Engineering von kardiovaskulären Ge-*

- weben (Herzklappen)*. Dissertation. Medizinischen Fakultät der Charité, Universitätsmedizin Berlin, 2005.
- [129] R. Sodian: *Tissue Engineering von kardiovaskulären Geweben*. Dissertation. Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität Berlin, 2004.
- [130] C. G. Cornelissen: *Fibringel als Scaffold für das Tissue Engineering von Herzklappen*. Dissertation. Medizinische Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, 2009.
- [131] H. C. Ott, T. S. Matthiesen, S. K. Goh, L. D. Black, S. M. Kren, T. I. Netoff und D. A. Taylor: *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. *Nat Med*, 14(2):213–221, 2008.
- [132] M. Schleicher, H. P. Wendel, O. Fritze und U. A. Stock: *In vivo tissue engineering of heart valves: evolution of a novel concept*. *Regen Med*, 4(4):613–619, 2009.
- [133] C. Y. Lin: *Untersuchung der Kalzifikation von Perikard und Polyurethan in Abhängigkeit des pH-Wertes*. Dissertation. Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen. 2001.
- [134] K. Nikolaou, C. R. Becker, B. J. Wintersperger, C. Rist, C. Trumm, A. Leber, G. Babaryka und M. F. Reiser: *Evaluating multislice computed tomography for imaging coronary atherosclerosis*. *Radiologe*, 44(2):130–139, 2004.
- [135] <http://www.ame.hia.rwth-aachen.de/index.php?id=65> und 03.09.2010.
- [136] W. Lim, Y. T. Chew, T. C. Chew und H. T. Lo: *Steady flow dynamics of prosthetic aortic heart valves: a comparative evaluation with PIV-techniques*. *Journal of Biomechanics*, 31:411–421, 1997.
- [137] W. Lim, Y. T. Chew, T. C. Chew und H. T. Low: *Steady flow velocity field and turbulent stress mappings downstream of a porcine bioprosthetic aortic valve in vitro*. *Annals of Biomedical Engineering*, 25:86–95, 1997.
- [138] W. Lim, Y. T. Chew, T. C. Chew und H. T. Low: *Pulsatile flow studies of a porcine bioprosthetic aortic valve in vitro PIV measurements and shear induced blood damage*. *Journal of Biomechanics*, 34:1417–1427, 2001.
- [139] L. Kadem, D. Garcia, R. Rieu, L.G. Durand und P. Pibarot: *Flow dynamics past a bioprosthetic valve using PIV and proper orthogonal decomposition*. *Biomechanics*, 7-9, 2005.

- [140] Y. S. Morsi, W. Yang, C. Wong und S. Das: *Transient fluid-structure coupling for simulation of a trileaflet heart valve using weak coupling*. J Artif Organs, 10(2):96–103, 2007.
- [141] C. J. Carmody, G. Burriesci, I. C. Howard und E. A. Patterson: *An approach to the simulation of fluid-structure interaction in the aortic valve*. J Biomech, 39(1):158–169, 2006.
- [142] E. J. Weinberg und M. R. K. Mofrad: *Transient, three-dimensional, multiscale simulations of the human aortic valve*. Cardiovasc Eng, 7(4):140–155, 2007.
- [143] M. Soncini, E. Votta, S. Zinicchino, V. Burrone, A. Mangini, M. Lemma, C. Antona und A. Redaelli: *Aortic root performance after valve sparing procedure: a comparative finite element analysis*. Med Eng Phys, 31(2):234–243, 2009.
- [144] J. D. Hart, F. P. T. Baaijens, G. W. M. Peters und P. J.G. Schreurs: *A computational fluid-structure interaction analysis of a fiber-reinforced stentless aortic valve*. J Biomech, 36(5):699–712, 2003.
- [145] W.W. Minuth: *Zukunftstechnologie Tissue Engineering*. Wiley-WCH, Weinheim, 2003.
- [146] K. Nowak: *Mündliche Mitteilung*. 2010.
- [147] F. Zitzer: *Mündliche Mitteilung*. 2011.
- [148] G. Lang: *Histotechnik*. Springer Verlag, Wien, 2006.
- [149] M. Mulisch und U. Welsch: *Romeis Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 18. Auflage, 2006.
- [150] A. Kern: *Mündliche Mitteilung*. 2010.
- [151] B. Glasmacher, M. Deiwick und M. Krings: *Zerstörungsfreie 3D-Detektion und Lokalisation von Kalzifizierungsablagerungen in biologischem Herzklappengewebe*. Biomedizinische Technik Band 46: 240–241, 2001.
- [152] M. Krings, A. Mahnken, C. Schroer, J. Patommel, W. Kalender und B. Glasmacher: *CT, Mikro-CT und Mikro-Tomographie (Synchrotron) der in vitro Kalzifizierung*. In: *Bildverarbeitung in der Medizin*. H. Handels, J. Ehrhardt, A. Horsch, H.-P. Meinzer, T. Tolxdorff (Hrsg.), Seiten Springer Verlag, Berlin, 444–448, 2006.

- [153] A. S. Agatston, W. R. Janowitz, F. J. Hildner, N. R. Zusmer, M. Viamonte und R. Detrano: *Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography*. J Am Coll Cardiol, 15(4):827–832, 1990.
- [154] M. Raffel, C.E. Willert, S.T. Wierely und J. Kompenhans: *Particle Image Velocimetry: A practical guide*. Springer Verlag, Berlin, 2007.
- [155] V. Schütte: *Mündliche Mitteilung*. 2011.
- [156] B. Klein: *FEM: Grundlagen und Anwendungen der Finite-Element-Methode im Maschinen- und Fahrzeugbau*. Vieweg Sohn Verlag, 7. Auflage, 2006.
- [157] S. Betancur-Escobar: *Mündliche Mitteilung*. 2009.
- [158] K. J. Grande-Allen, R. P. Cochran, P. G. Reinhall und K. S. Kunzelman: *Finite-element analysis of aortic valve-sparing: influence of graft shape and stiffness*. IEEE Trans Biomed Eng, 48(6):647–659, 2001.
- [159] B. Glasmacher und M. Krings: *Pathological calcification of heart valve bioprostheses*. In: *Handbook of Biomineralization*. E. Bäumlein, P. Behrens, M. Epple (Hrsg.), Seiten 361–371, 2007.
- [160] R. De Paulis, G. M. De Matteis, P. Nardi, R. Scaffa, M. M. Buratta und L. Chiariello: *Opening and closing characteristics of the aortic valve after valve-sparing procedures using a new aortic root conduit*. Ann Thorac Surg, 72(2):487–494, 2001.
- [161] M. Bauer: *Bikuspide Aortenklappe und Dilatation der Aorta ascendens*. Dissertation. Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität, Berlin, 2005.

A Anhang

A.1 Bioreaktor

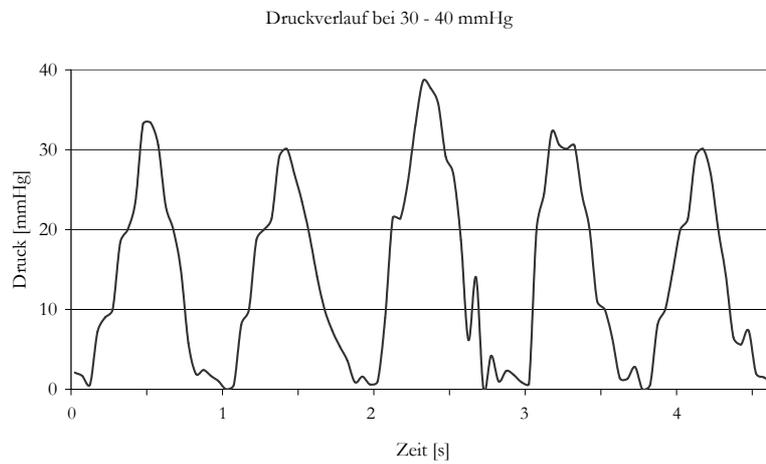
Zusammensetzung des Endothelzellmediums

Zusammensetzung	Mengenangabe
Endothelial Cell Growth Medium MV2	500 ml
Fetal Calf Serum	25 ml
Epidermal Growth Factor	2,5 μg
Basic Fibroblast Growth Factor	5 μg
Insulin-like Growth Factor	20 μg
Vascular Endothelial Growth Factor 165	0,25 mg
Ascorbic Acid	0,5 mg
Hydrocorisone	0,1 mg
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Nystatin	116 μl

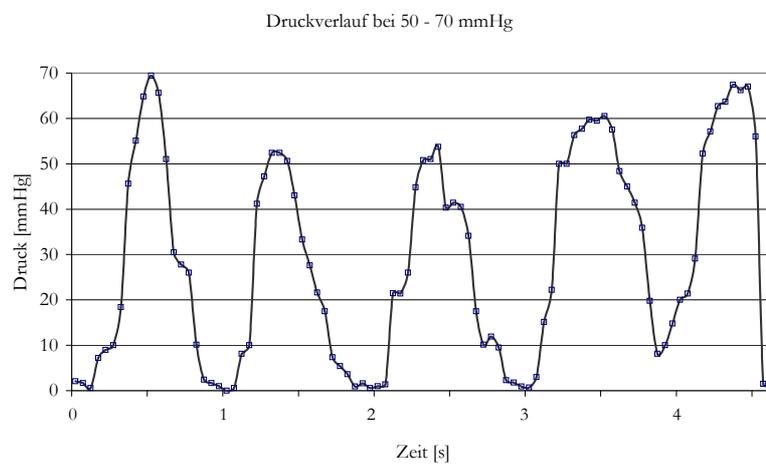
Tabelle A.1: Zusammensetzung des Endothelzellmediums der Firma PromoCell

Reihenfolge der Färbung der Herzklappentaschenstücke

- sterile Petrischalen mit zu färbender Probe und Endothelzellmedium füllen,
- Zellkulturmedium absaugen,
- Färbung nach dem Mischen auf die präparierten Gewebestücke pipettieren,
- 20 Minuten im Inkubator einwirken lassen
- Färbung abwaschen und 2 Mal gründliches Spülen mit Endothelzellmedium.

v/a Druck während der Versuche

(a) Druckverlauf beim 14-Tage-Versuch (30–40 mmHg)



(b) Druckverlauf beim 9-Tage-Versuch (50–70 mmHg)

Abbildung A.1: Druckverlauf bei den jeweiligen Versuchsreihen. Der Druck wurde bei 30 – 40 mmHg (a) und 50 – 70 mmHg (b) vor und nach der Platzierung im Inkubator kontrolliert.

Überlebensrate der jeweiligen Herzklappen

Referenzklappe	
Anteil lebender Zellen [%]	91,8
Anteil toter Zellen [%]	8,2
5-Tage-Versuch	
v/a Druck p = 30 – 40 mmHg	
Anteil lebender Zellen [%]	97,6
Anteil toter Zellen [%]	2,4
14-Tage-Versuch	
v/a Druck p = 30 – 40 mmHg	
Anteil lebender Zellen [%]	97,8
Anteil toter Zellen [%]	2,2
5-Tage-Versuch	
v/a Druck p = 50 – 70 mmHg	
Anteil lebender Zellen [%]	50,9
Anteil toter Zellen [%]	49,1
9-Tage-Versuch	
v/a Druck p = 50 – 70 mmHg	
Anteil lebender Zellen [%]	35,3
Anteil toter Zellen [%]	64,7

Tabelle A.2: Anteil der lebenden und toten Zellen der Herzklappen im Bioreaktor

A.2 Von Kossa Färbung

Kalzifizierungsanteile mit zugehörige HU-Fenster

Schicht Nr.	Pixel(HU-Fenster 1)	Pixel (HU-Fenster 2)	Anzahl aller Pixel	Kalzifizierungsanteil HU-Fenster 1	Kalzifizierungsanteil HU-Fenster 2
1	15 714	11 856	287 917	5,47 %	4,10 %
2	18 022	15 064	287 917	6,27 %	5,24 %
3	19 842	15 521	287 917	6,88 %	5,38 %
4	19 644	15 419	287 917	6,83 %	5,37 %
5	23 188	14 465	287 917	8,06 %	5,03 %
6	23 965	15 604	287 917	8,33 %	5,43 %
7	25 633	16 795	287 917	8,91 %	5,84 %
8	25 683	17 376	287 917	8,93 %	6,04 %
9	26 757	18 501	287 917	9,28 %	6,44 %
10	26 144	16 458	287 917	9,09 %	5,73 %

Tabelle A.3: Anzahl der jeweiligen Pixel und Kalzifizierungsanteile der eingebetteten, präparierten Herzklappe für beide HU-Fenster 1 und 2 in der μ -CT-Aufnahme. Mit Hilfe des Programmes werden alle Pixel gezählt und mit den HU-Fenstern angeglichen.

Schliff Nr.	Pixel(HU-Fenster 3)	Pixel (HU-Fenster 4)	Anzahl aller Pixel	Kalzifizierungsanteil HU-Fenster 3	Kalzifizierungsanteil HU-Fenster 4
1	9 587	8 001	287 917	3,34 %	2,79 %
2	12 127	9 251	287 917	4,22 %	3,22 %
3	12 044	9 784	287 917	4,19 %	3,41 %
4	12 071	9 665	287 917	4,20 %	3,37 %
5	15 788	8 678	287 917	5,49 %	3,02 %
6	17 068	10 241	287 917	5,94 %	3,57 %
7	18 112	10 988	287 917	6,28 %	3,83 %
8	18 638	11 438	287 917	6,48 %	3,98 %
9	19 111	12 441	287 917	6,65 %	4,33 %
10	17 464	10 405	287 917	6,08 %	3,62 %

Tabelle A.4: Anzahl der jeweiligen Pixel und die Kalzifizierungsanteile der eingebetteten, präparierten Herzklappe für beide HU-Fenster 3 (200 – 450) und 4 (250 – 450) in der μ -CT-Aufnahme

Schnittbild Nr.	Pixel(HU-Fenster 5)	Pixel (HU-Fenster 6)	Anzahl aller Pixel	Kalzifizierungsanteil HU-Fenster 5	Kalzifizierungsanteil HU-Fenster 6
1	5 887	6 299	287 917	2,03 %	2,20 %
2	6 912	7 275	287 917	2,41 %	2,54 %
3	6 900	7 625	287 917	2,41 %	2,66 %
4	7 622	7 741	287 917	2,66 %	2,70 %
5	6 133	6 721	287 917	2,14 %	2,34 %
6	7 708	7 530	287 917	2,69 %	2,62 %
7	8 346	7 889	287 917	2,91 %	2,75 %
8	7 561	8 137	287 917	2,64 %	2,84 %
9	7 616	8 981	287 917	2,65 %	3,13 %
10	7 625	7 668	287 917	2,67 %	2,67 %

Tabelle A.5: Anzahl der jeweiligen Pixel und die Kalzifizierungsanteile der eingebetteten, präparierten Herzklappe für beide HU-Fenster 5 und 6 in der μ -CT-Aufnahme

Einstellungen des Röntgengerätes GE Sonograph 2000

- Versorgungsspannung: 27 kV
- Stromstärke: 10 mAs
- Filter: Mo-Mo

Entwässerung der Herzklappe

1. 2 Std. in 50 % Ethanol
2. 2 Std. in 70 % Ethanol
3. 2 Std. in 96 % Ethanol
4. 2 Std. in 99,9 % Ethanol
5. 24 Std. an Luft trocknen

Färbeprotokoll von Kossa

1. Probe 3× mit dem Aqua bidest gründlich spülen
2. Oberfläche des Präparates mit 5 % Silbernitratlösung mittels Kunststoffpipette überdecken und unter UV-Licht (60 W UV-Glühlampe) für 20 min einwirken lassen
3. Probe erneut 3× mit Aqua bidest gründlich spülen
4. 5 % Natriumthiosulfat für 5 Minuten auf die Probe geben
5. Spülen mit Aqua bidest

Messparameter der präparierten Herzklappe

Parameter	präparierte Herzklappe
Manipulator – Höhe Y	72
Manipulator – Abstand zur Röhre Z	40
Manipulator – Drehung R	0
Detektor – Verschiebung xD	0
Detektor – Abstand zur Röhre zD	250
Detektor – Timing [ms]	500
Detektor – Binning	1 × 1
Detektor – Timing [ms]	500
Detektor – Bildausschnitt [Pixel]	2 304 × 2 304
Röntgenröhre – Fokusgröße M	0
Röntgenröhre – Spannung UB [kV]	100
Röntgenröhre – Stromstärke IA [μ A]	250
Anzahl Bilder	2 000
Gemittelte Bilder/Bild Av	3
Skip Sk	2
Magnification	6.250
Voxelsize [μ m]	8.00
Gain/Offset – Einzelmessung	ja
Gain/Offset – Modus	(4×UB)
Gain/Offset – Av	100
Gain/Offset – Skip	10
Detektorkalibrierung – Spannungen [kV]	100
Detektorkalibrierung – 1. Stromstärke [μ A]	250
Detektorkalibrierung – 2. Stromstärke [μ A]	125
Detektorkalibrierung – 3. Stromstärke [μ A]	62
Detektorkalibrierung – 4. Stromstärke [μ A]	31

Tabelle A.6: Einstellungen des nanotom[®] (Phoenix—x-ray, Hannover, Deutschland)

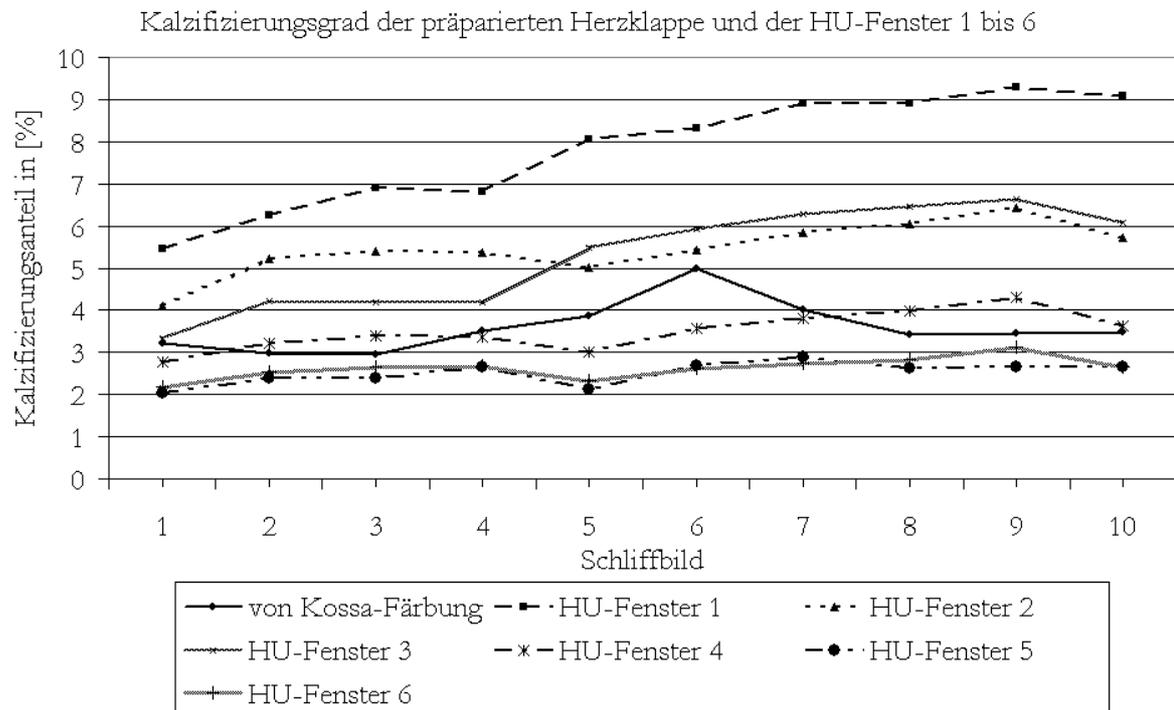


Abbildung A.2: Vergleich des prozentualen Kalzifizierungsanteils aus der von Kossa Färbung und den analysierten HU-Fenstern 1 bis 6 der μ -CT-Bilder der präparierten Herzklappe gegen die einzelnen Schliffbilder aufgetragen

HU-Fenster 1-5 sowie aus Literaturangaben

Fensterbezeichnung	HU-Wertebereich
HU-Fenster - Literatur	262 – 512
HU-Fenster 1	100 – 600
HU-Fenster 2	250 – 500
HU-Fenster 3	200 – 450
HU-Fenster 4	250 – 450
HU-Fenster 5	300 – 450

Tabelle A.7: Unterschiedliche HU-Fensterbereiche

A.3 Particle Image Velocimetry (PIV)

Herzklappendurchmesser

Klappenr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Durchmesser [mm]	18	15,5	18	19,5	17	18	17	18	17,5	17

Tabelle A.8: Aortendurchmesser der zehn verwendeten Herzklappen in mm

Zusammensetzung Glutaraldehyd

992 ml Aqua Bidest + 8 ml Glutaraldehyd 25 % = 0,2 % Glutaraldehydlösung

976 ml Aqua Bidest + 24 ml Glutaraldehyd 25 % = 0,6 % Glutaraldehydlösung

Die anschließende Fixierung der Herzklappe beträgt 24 Stunden mit 0,6 % Glutaraldehyd, danach 24 Stunden in 0,2 % Glutaraldehyd

Zusammensetzung der Kalzifizierungsflüssigkeit 1.5 Simulated Body Fluid (1.5SBF) [73]

Zusammensetzung	Mengenangabe
Ultrareines Wasser	750 ml
NaCl	11,994 g
$NaHCO_3$	0,525 g
KCl	0,336 g
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	0,342 g
$MgCl_2 \times 6H_2O$	0,458 g
$1\text{ kmol}/\text{m}^3\text{ HCl}$	60 cm ³
$CaCl_2$	0,417 g
Na_2SO_4	0,107 g
$(CH_2OH)3CNH_2$	9,086 g
$1\text{ kmol}/\text{m}^3\text{ HCl}$	je nach Anhebung des pH-Wertes auf 7,4

Tabelle A.9: Zusammensetzung des 1.5 Simulated Body Fluides

- Wasser auf 37 °C aufwärmen.
- alle Salze bis auf $(CH_2OH)_3CNH_2$ nacheinander zufügen, bis sich alle Salze gelöst haben.
- $(CH_2OH)_3CNH_2$ langsam zufügen, hier entsteht ein pH-Sprung, der langsam durchgeführt werden muss. Anderenfalls fällt die Lösung aus.
- Mit HCl auf gewünschten pH-Wert anheben.

Röntgenbilder nach 4 Wochen Kalzifizierung

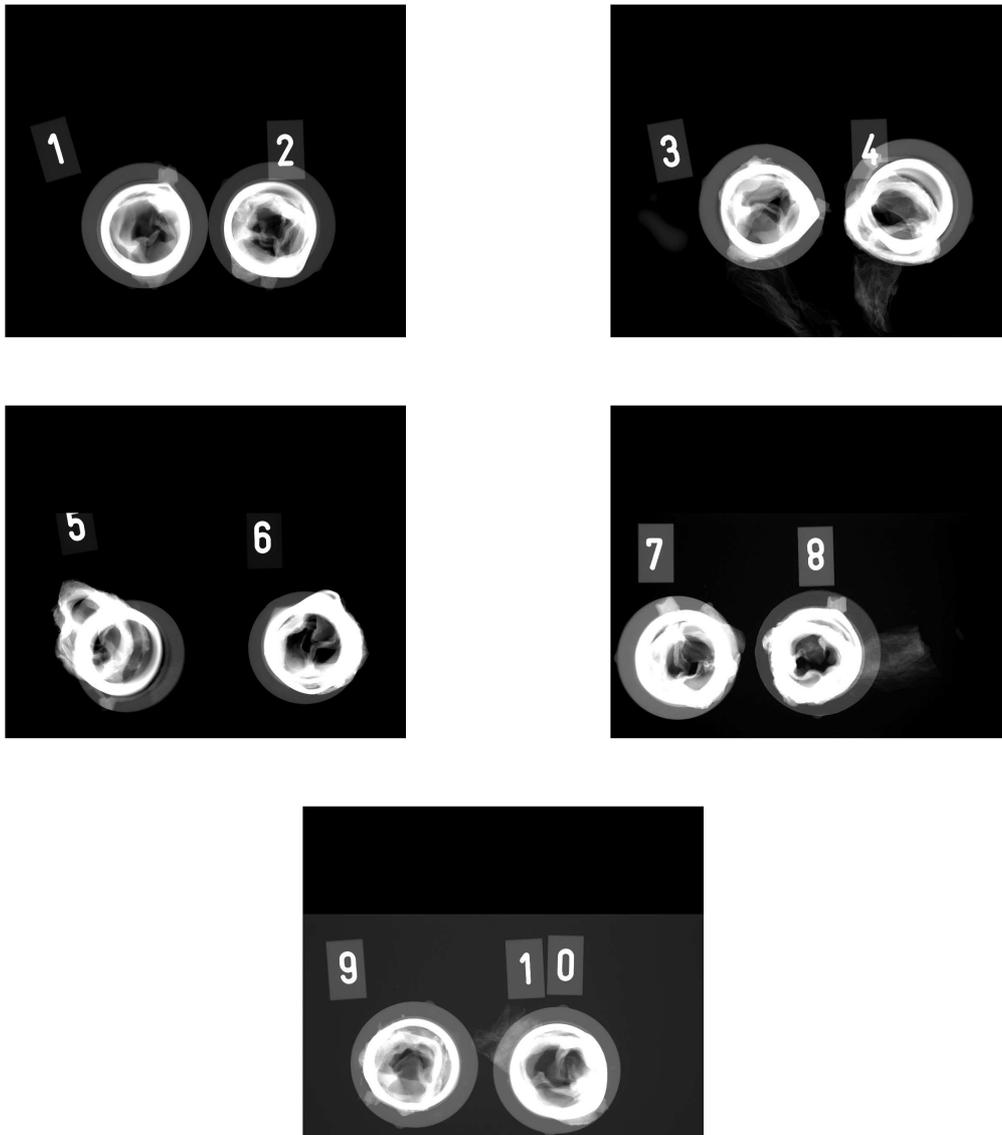


Abbildung A.3: Röntgenbilder der Herzklappen 1 bis 10 nach der 4. Kalzifizierungswoche

A.4 FSI- und FEM-Simulation

Daten und Abbildungen zur FSI

Geometrien

Bezeichnung	Abkürzung	Größe
Gefäßdurchmesser	d_G	26 mm
Klappenhöhe	h_K	12,5 mm
Taschenwinkel	α_T	120°
Konduitdurchmesser	d_S	26 mm

Tabelle A.10: Geometrische Grunddaten, die für beide Klappenmodelle verwendet werden

Bezeichnung	Abkürzung	Größe Geometrie A	Größe Geometrie B
Klappendicke	l_{dicke}	0,35 mm	0,25 – 0,5 mm
Taschenwinkel unten	α_{unten}	70°	70°
Taschenwinkel oben	$\alpha_{T-Komplex}$	119°	119°
Bauchbereichhöhe	h_{Bauch}	10 mm	10 mm
Kontaktflächenhöhe	$h_{Kontakt}$	2,5 mm	2,5 mm
Rundungsradius	$r_{Rundung}$	2,5 mm	2,5 mm
Lückenwinkel	α_{Luecke}	1°	1°
Zylinderhöhe +	h_+	26 mm	26 mm
Zylinderhöhe -	h_-	55 mm	55 mm

Tabelle A.11: Daten der Geometrie A und B

Geometrie B

Solver-Einstellung	
t_{ges}	0,3 s
t_{step}	0,01 s
Relaxationsfaktor	0,3
physikalische Eigenschaften	
Festkörper	
Material	linear elastisch; isotrop
Poisson - Zahl	0,49
E-Modul	0,5 MPa
Dichte	1 100 kg/m ³
Fluid	
Druckverlauf	linear
strömendes Fluid	Wasser
Netztopologie	
vergl. Oberflächennetz	

Tabelle A.12: Verwendete Parameter der Geometrie B

Werte des Oberflächennetzes

Oberflächenbezeichnung	Maximale Elementgröße [mm]
Inlet	4
Outlet	4
Wand	1,25
Klappe	0,75
Kontaktfläche	0,2
Bauchbereich	0,75
Kanten	0,75

Tabelle A.13: Maximale Elementgröße

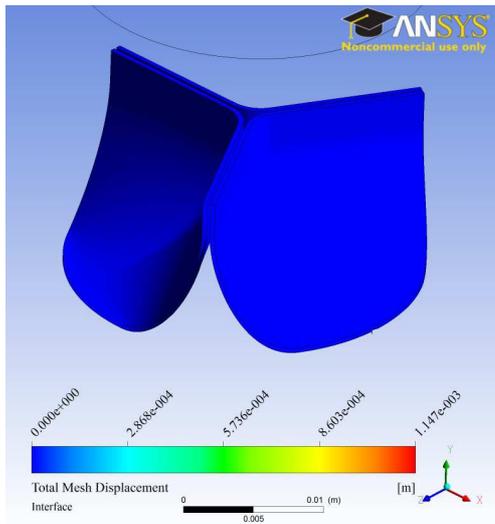
Netzstatistik

Festkörper	
Knotenanzahl	14 028
Elementanzahl	40 769
Minimaler Flächenwinkel	6,69 °
Maximaler Flächenwinkel	158,24 °
Maximales Kantenlängenverhältnis	8,58

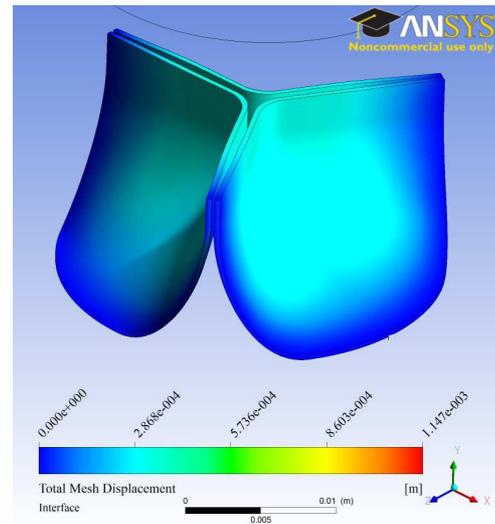
Tabelle A.14: Netzstatistik des Festkörpers

Fluidphase	
Knotenanzahl	121 028
Elementanzahl	576 658
Minimaler Flächenwinkel	10,95 °
Maximaler Flächenwinkel	115,13 °
Maximales Kantenlängenverhältnis	5,25

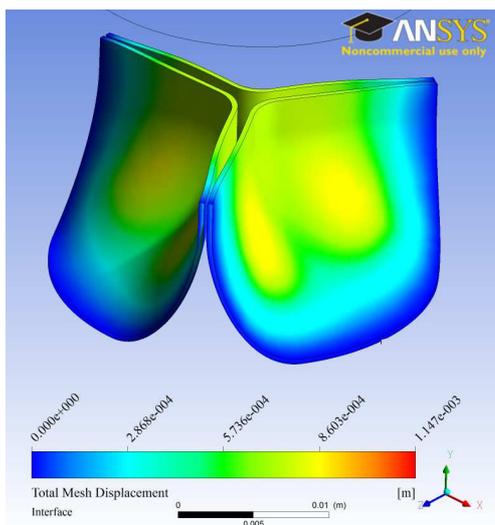
Tabelle A.15: Netzstatistik der Fluidphase



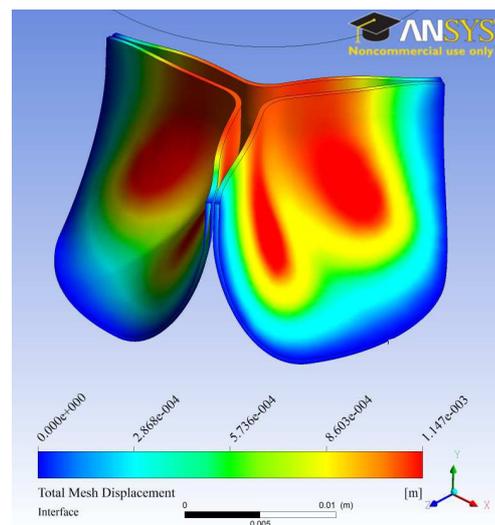
(a) 2. Zeitschritt



(b) 8. Zeitschritt

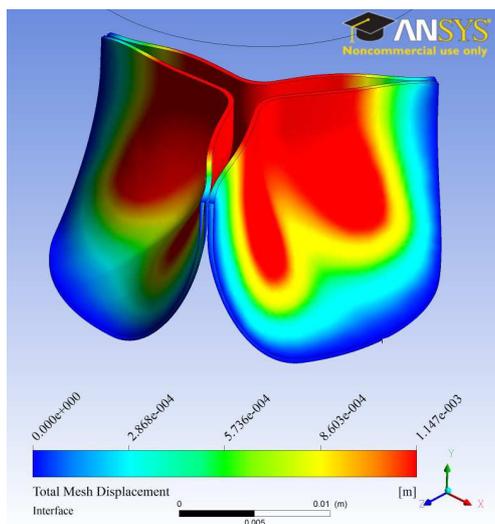


(c) 10. Zeitschritt

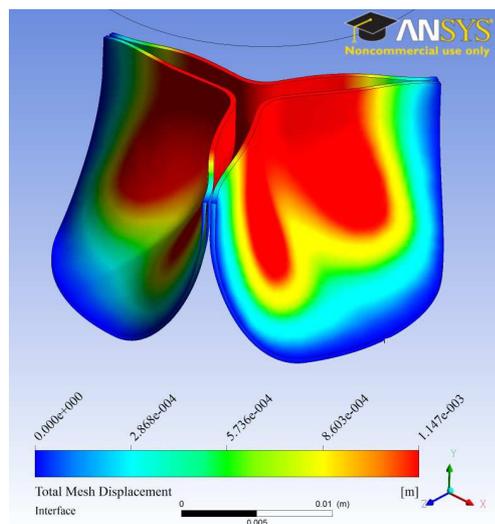


(d) 13. Zeitschritt

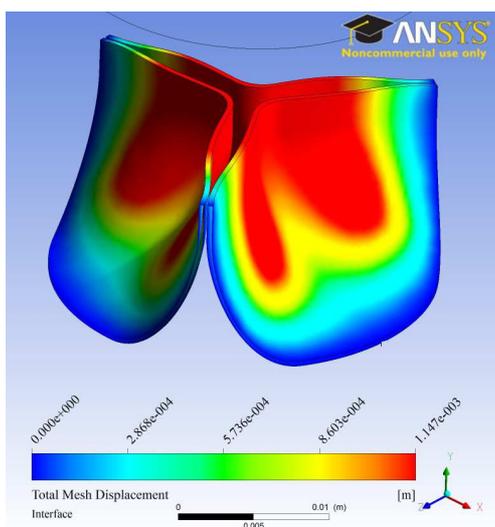
Abbildung A.4: Modell mit Mesh Displacement



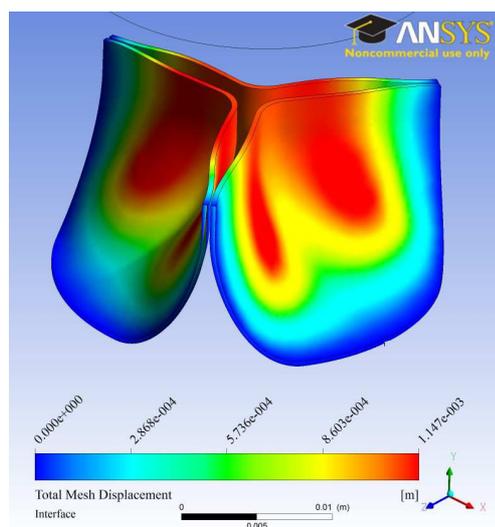
(a) 15. Zeitschritt



(b) 17. Zeitschritt



(c) 19. Zeitschritt



(d) 22. Zeitschritt

Abbildung A.5: Modell mit Mesh Displacement

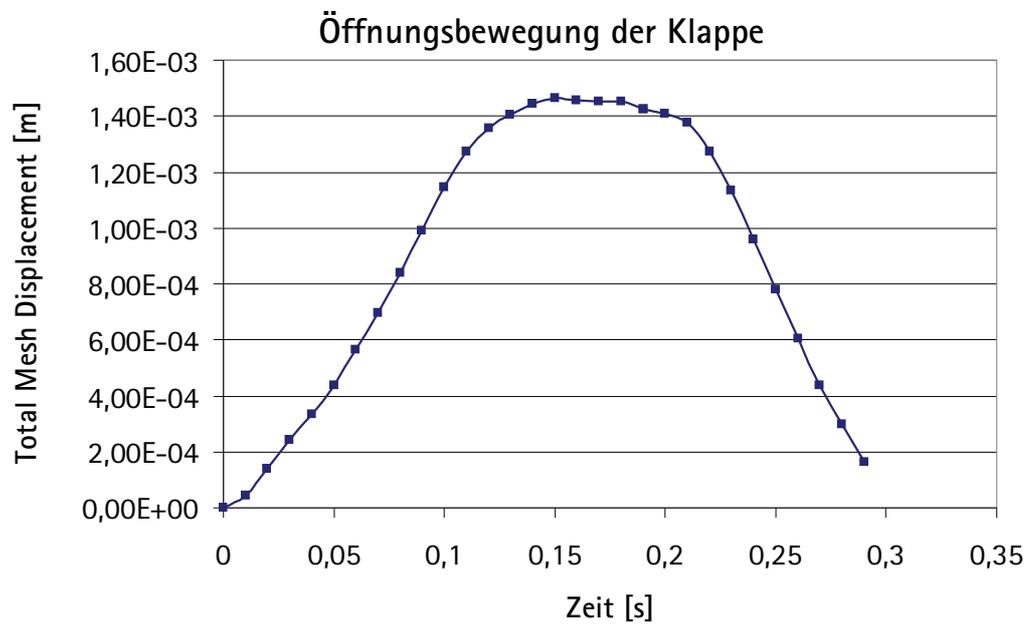


Abbildung A.6: Öffnungsbewegung der Klappe mit Mesh Displacement

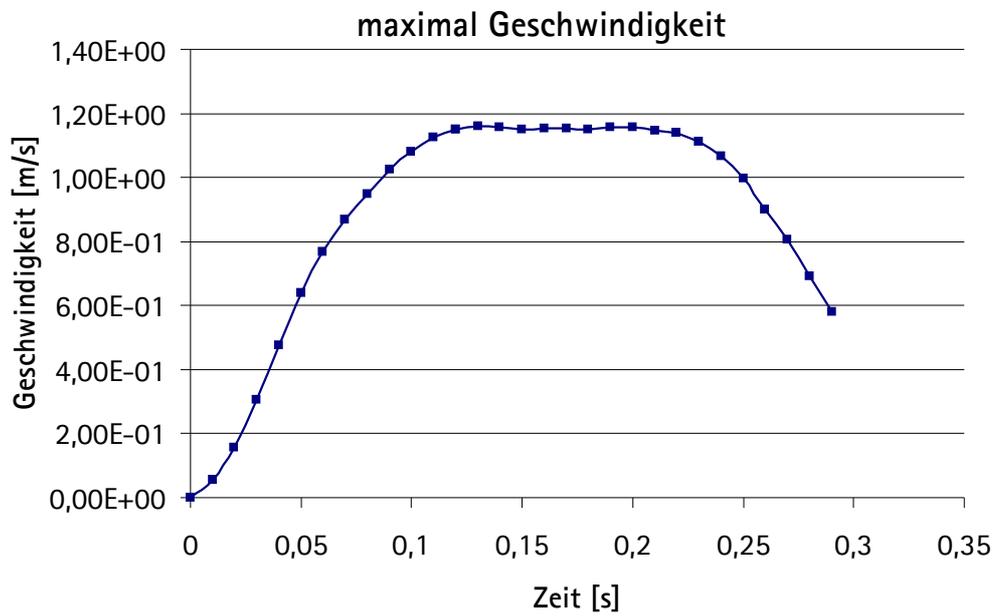


Abbildung A.7: Maximale Geschwindigkeit der Klappe

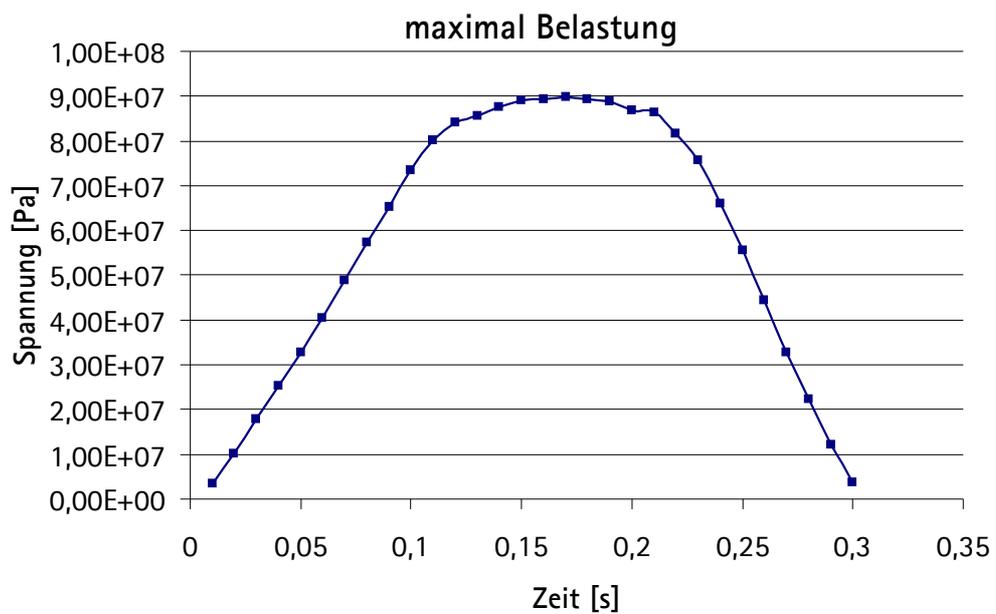
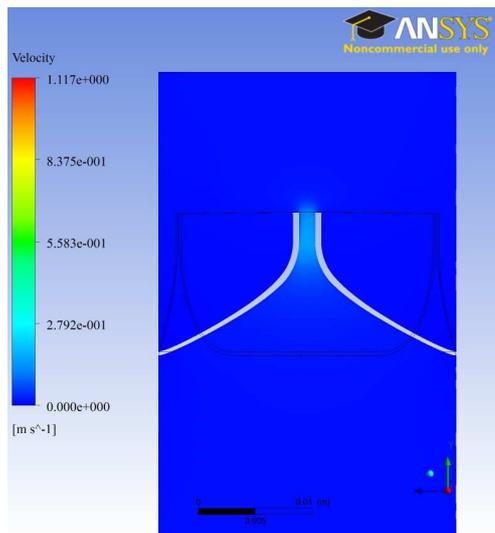
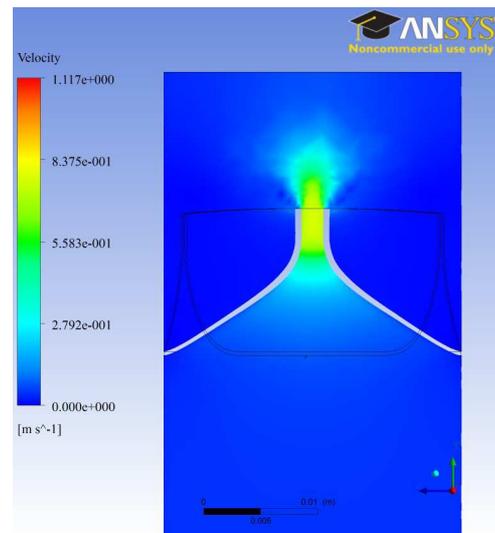


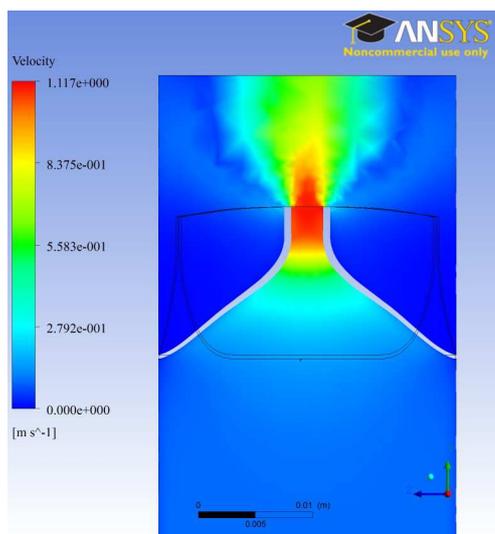
Abbildung A.8: Maximale Belastung der Klappe



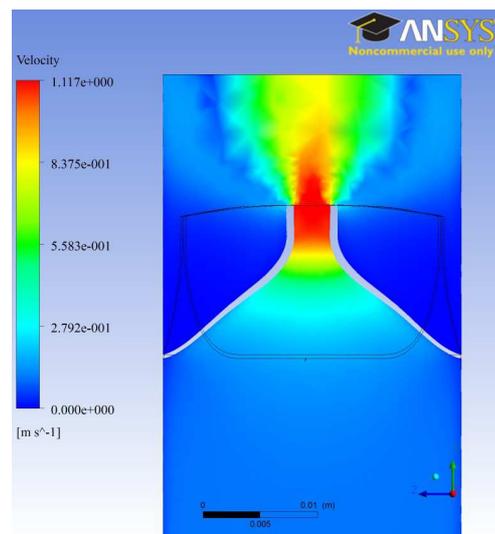
(a) 2. Zeitschritt



(b) 6. Zeitschritt

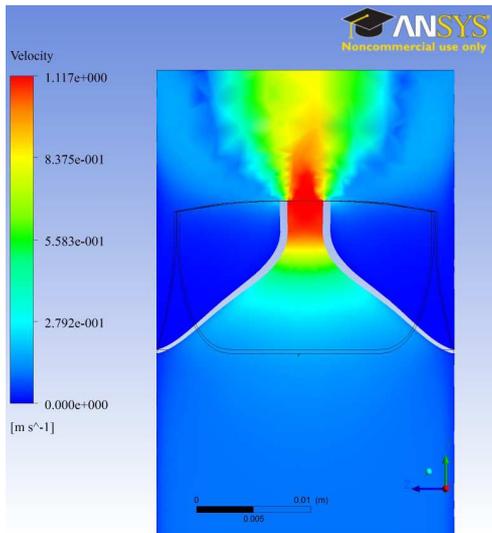


(c) 11. Zeitschritt

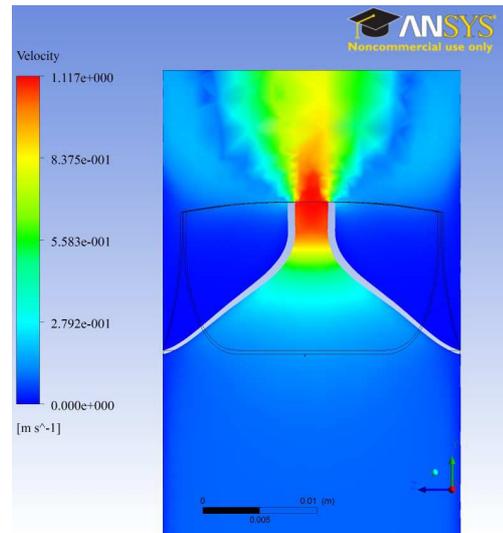


(d) 15. Zeitschritt

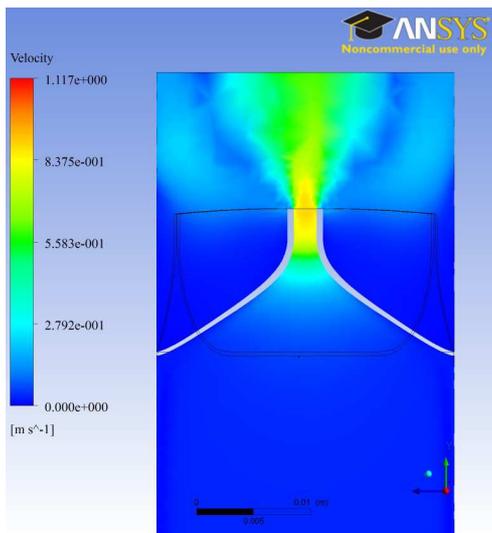
Abbildung A.9: Modell mit Geschwindigkeitsverteilung



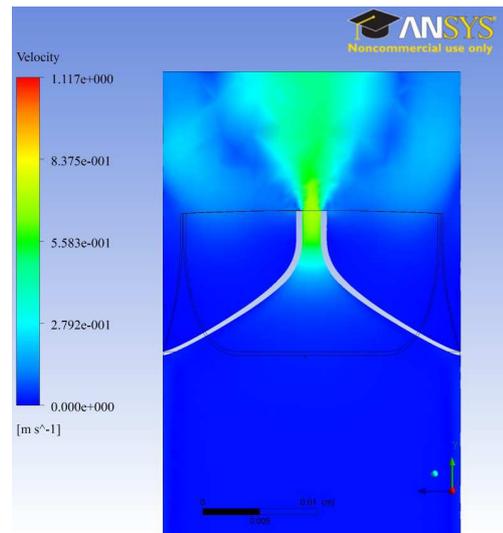
(a) 19. Zeitschritt



(b) 22. Zeitschritt

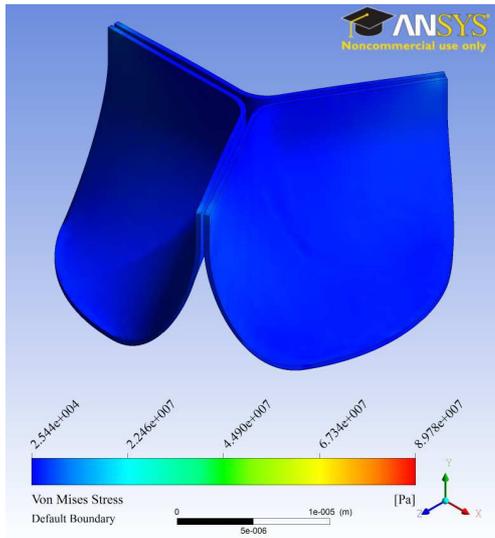


(c) 26. Zeitschritt

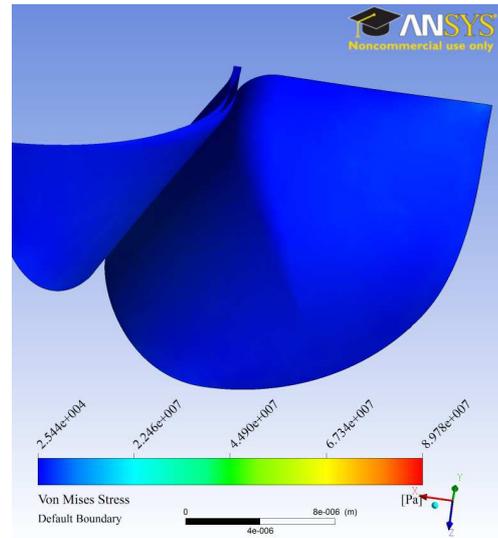


(d) 28. Zeitschritt

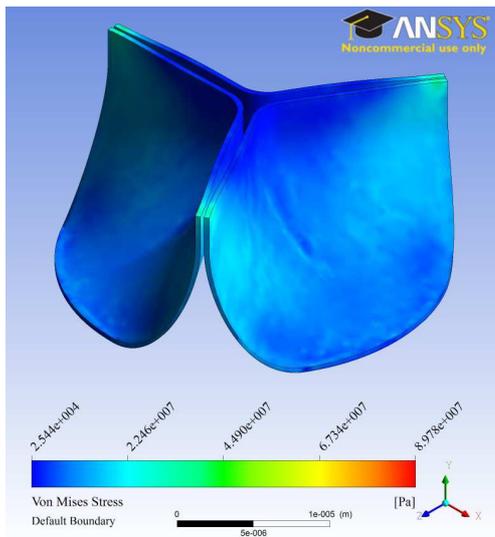
Abbildung A.10: Modell mit Geschwindigkeitsverteilung



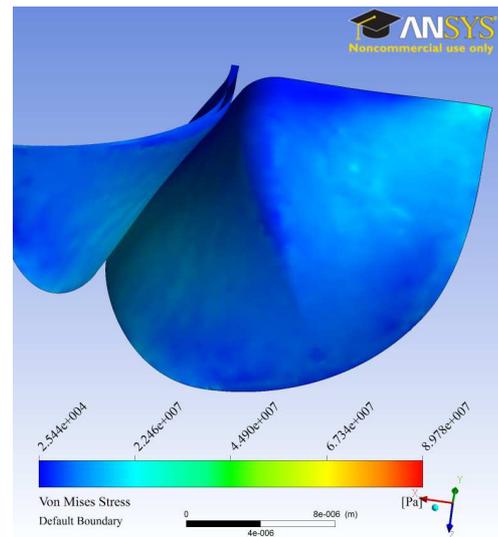
(a) 2. Zeitschritt arterielle Seite



(b) 2. Zeitschritt ventrikuläre Seite

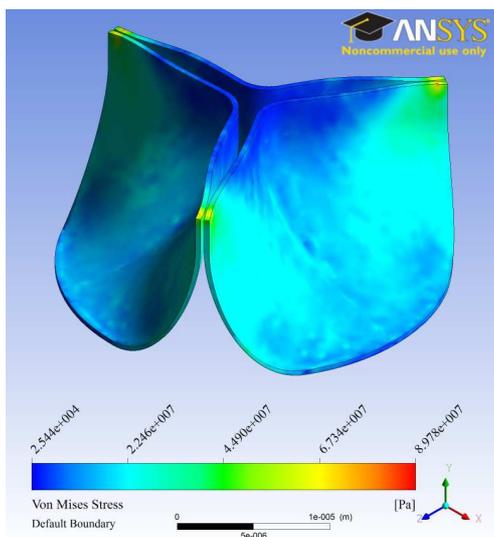


(c) 6. Zeitschritt arterielle Seite

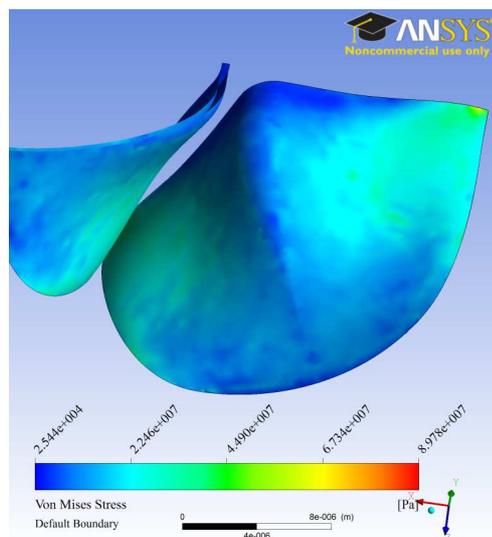


(d) 6. Zeitschritt ventrikuläre Seite

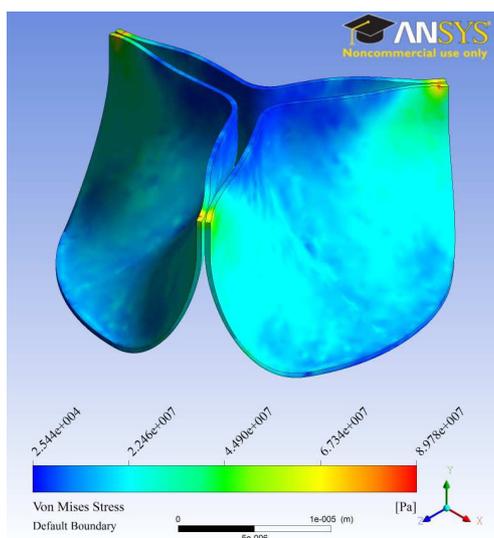
Abbildung A.11: Modell mit von Mises Spannung



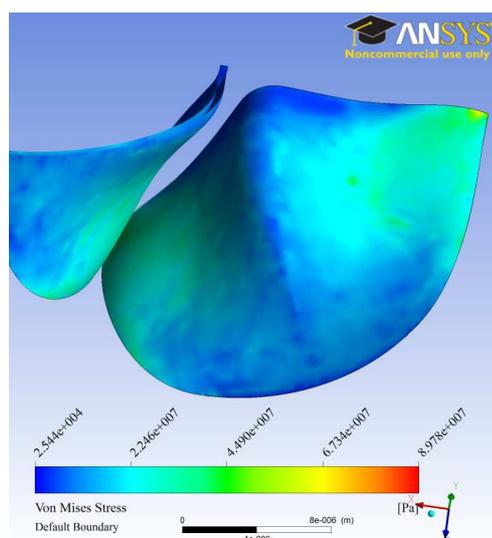
(e) 11. Zeitschritt arterielle Seite



(f) 11. Zeitschritt ventrikuläre Seite

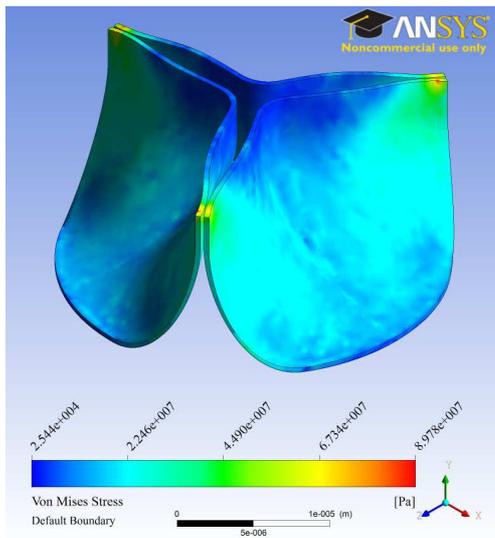


(g) 15. Zeitschritt arterielle Seite

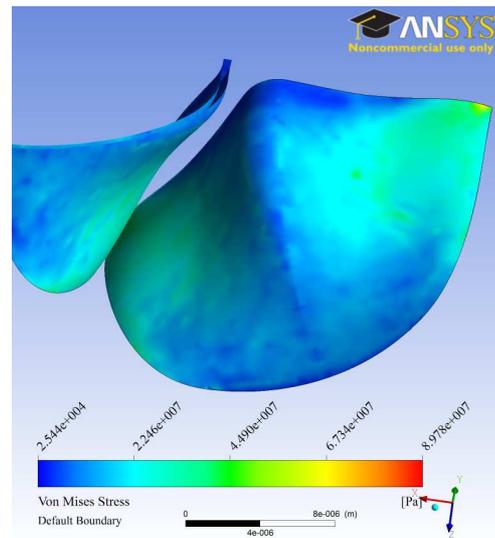


(h) 15. Zeitschritt ventrikuläre Seite

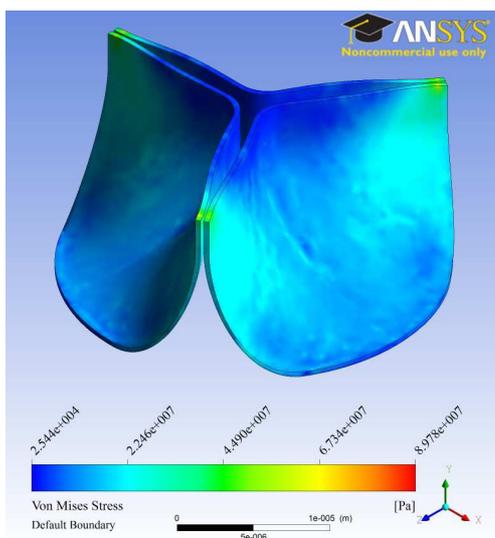
Abbildung A.12: Modell mit von Mises Spannung



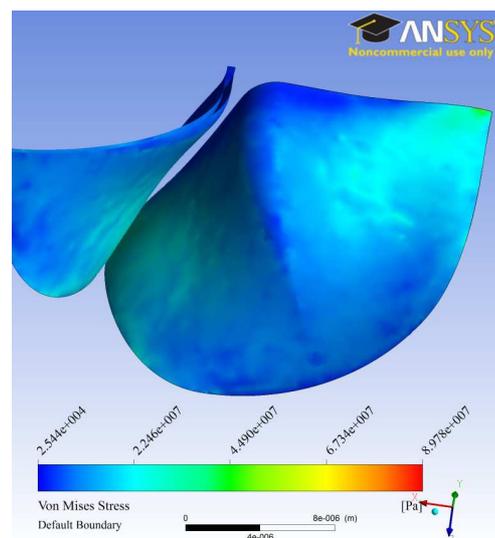
(i) 19. Zeitschritt arterielle Seite



(j) 19. Zeitschritt ventrikuläre Seite



(k) 24. Zeitschritt arterielle Seite



(l) 24. Zeitschritt ventrikuläre Seite

Abbildung A.13: Modell mit von Mises Spannung

Daten und Abbildungen zur FEM

Geometrien

Bezeichnung	Abkürzung	Größe Geometrie C	Größe Geometrie D
Klappendicke	l_{dicke}	0,35 mm	0,25 – 0,5 mm
Taschenwinkel Unten	α_{unten}	70°	70°
Taschenwinkel Oben	$\alpha_{T-Komplex}$	119°	119°
Bauchbereichhöhe	h_{Bauch}	10 mm	10 mm
Kontaktflächenhöhe	$h_{Kontakt}$	2,5 mm	2,5 mm
Rundungsradius	$r_{Rundung}$	2,5 mm	2,5 mm
Lückenwinkel	α_{Luecke}	1°	1°
Zylinderhöhe +	h_+	26 mm	26 mm
Zylinderhöhe -	h_-	55 mm	55 mm
mittl. Sinusdurchmesser	d_S	26 mm	26 mm

Tabelle A.16: Daten der Geometrie C und D

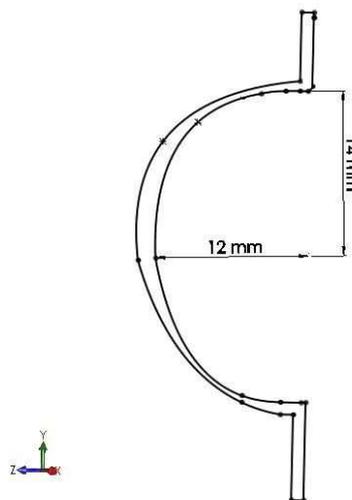
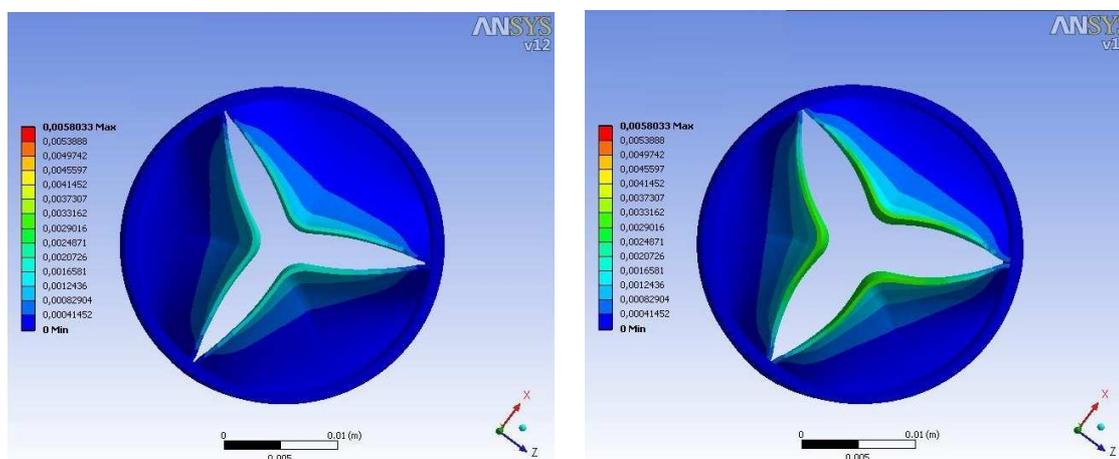


Abbildung A.14: Konstruktion des Sinus für die Geometrie D. Die Abmaße sind zu 12×14 mm gewählt worden.

Geometrie C		Geometrie D	
Aortenwand		Aortenwand	
E-Modul	8 MPa	E-Modul	4 MPa
Poisson-Zahl	0,45	Poisson-Zahl	0,45
Dichte	2 000 kg/m ³	Dichte	2 000 kg/m ³
Klappentasche		Klappentasche	
E-Modul	8 MPa	E-Modul	2 MPa
Poisson-Zahl	0,45	Poisson-Zahl	0,45
Dichte	1 100 kg/m ³	Dichte	1 100 kg/m ³
Kalzifizierung			
E-Modul		80 GPa	
Poisson-Zahl		0,3	
Dichte		1 100 kg/m ³	

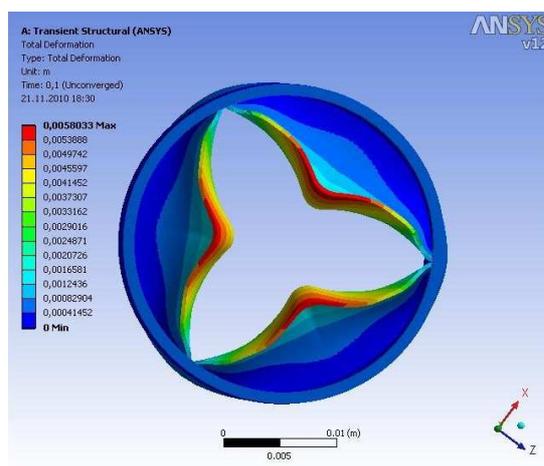
Tabelle A.17: Materialdaten der Modelle

Deformationsverhalten



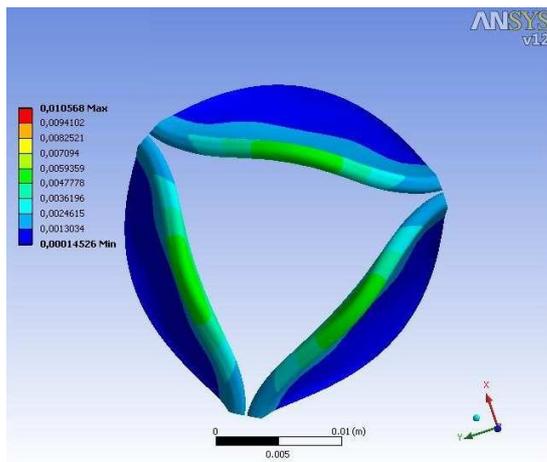
(a) 33 ms

(b) 55 ms

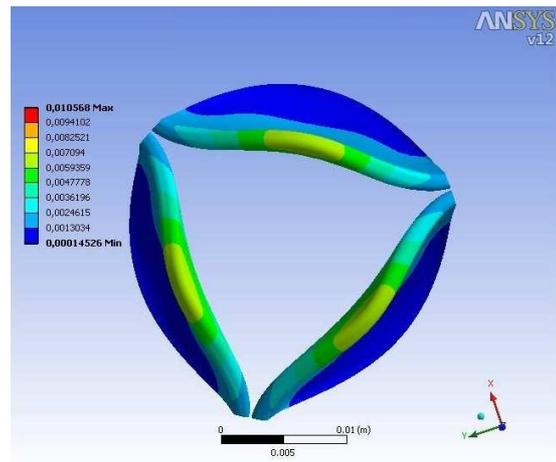


(c) 100 ms

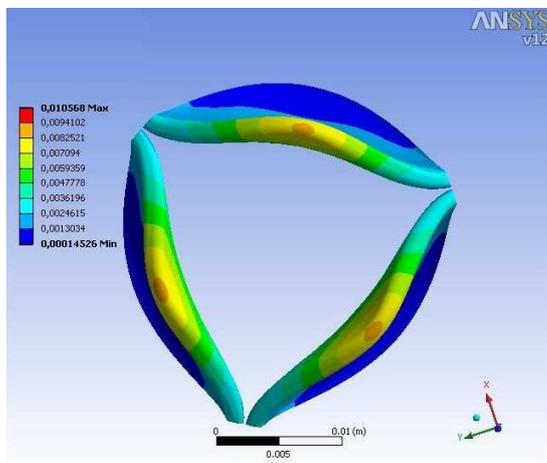
Abbildung A.15: Geometrie C mit Deformation.



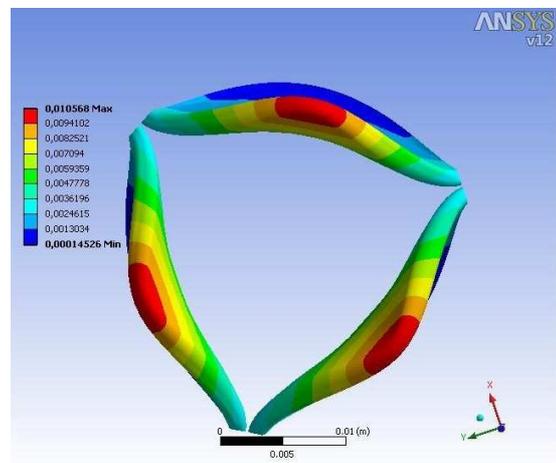
(a) 20 ms



(b) 40 ms



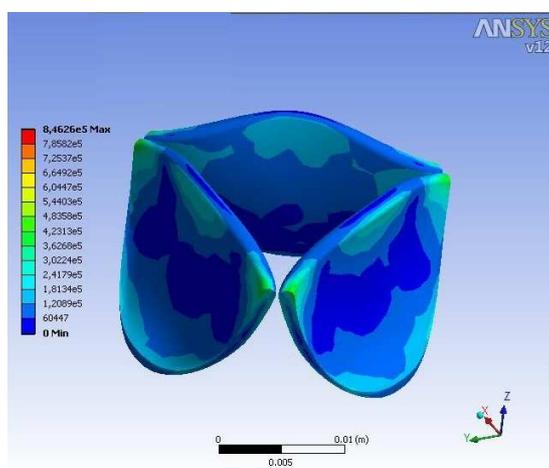
(c) 80 ms



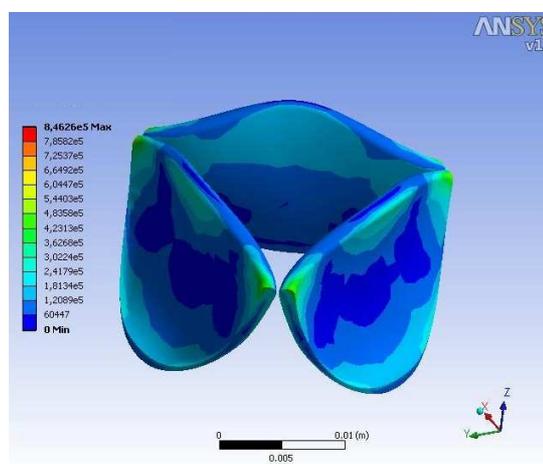
(d) 168 ms

Abbildung A.16: Geometrie D mit Deformation.

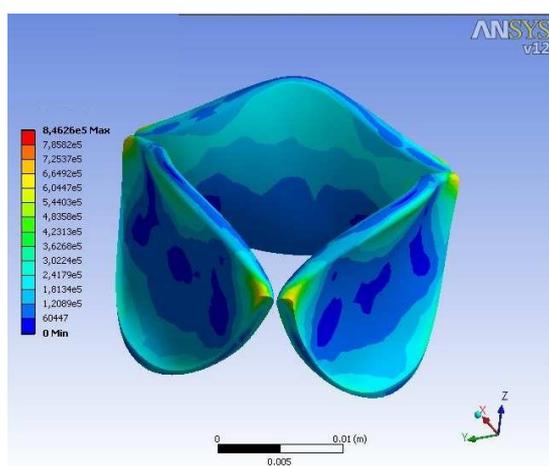
von Mises-Spannungsverteilung



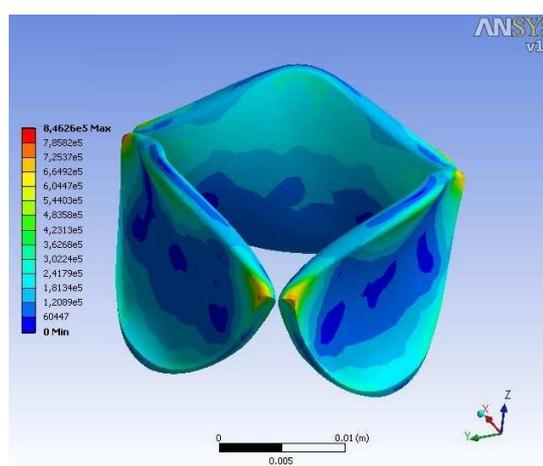
(a) 20 ms



(b) 40 ms



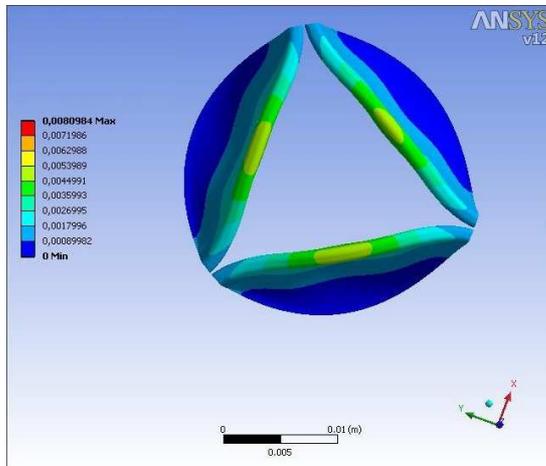
(c) 80 ms



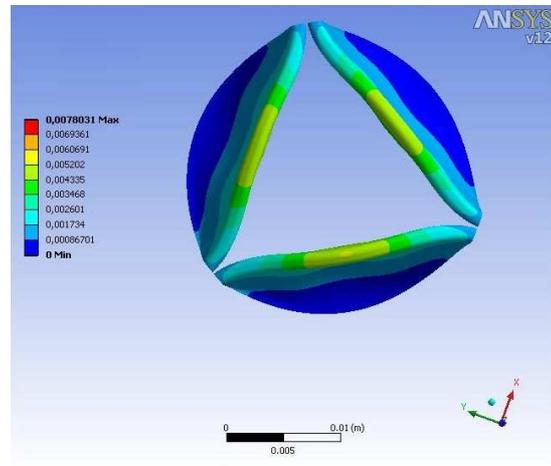
(d) 168 ms

Abbildung A.17: Geometrie D mit von Mises-Spannungsverteilung.

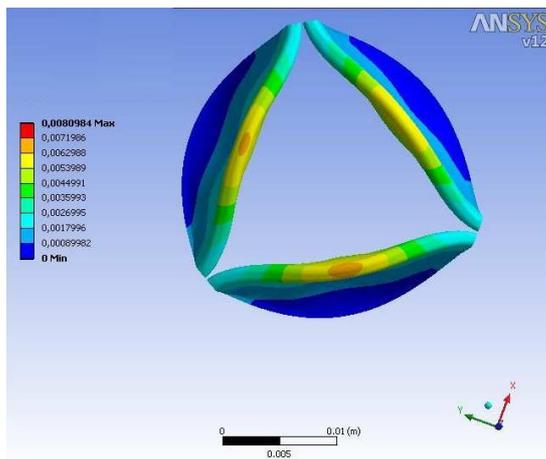
Einfluss der Kalzifizierung



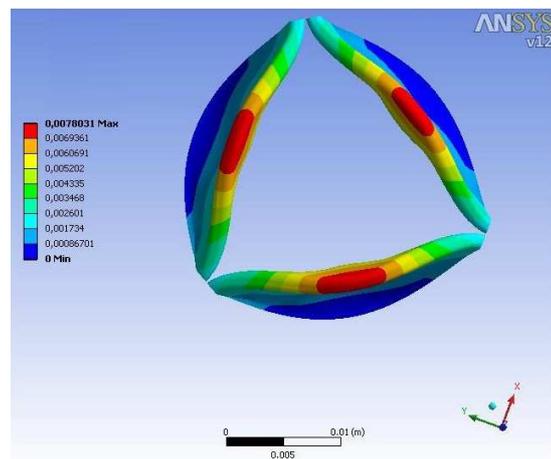
(a) 20 ms



(b) 40 ms

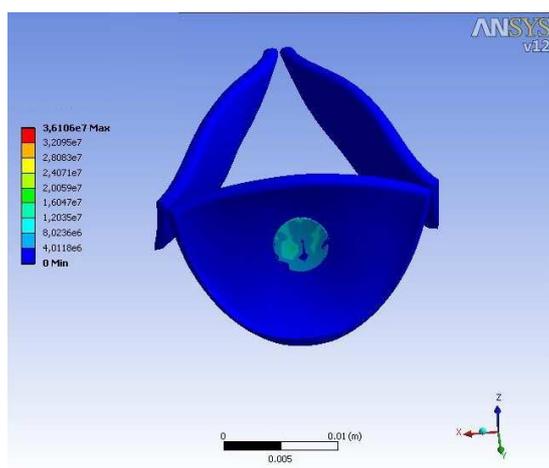


(c) 80 ms

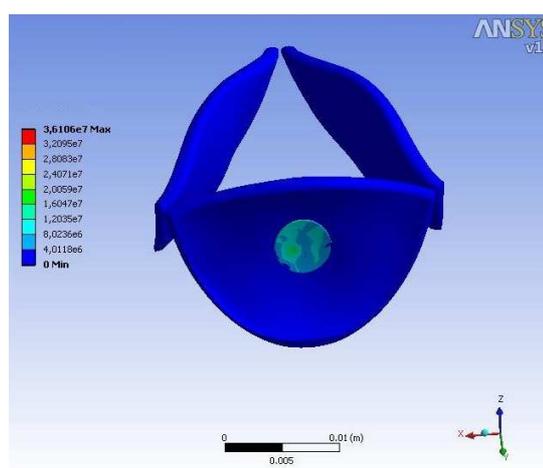


(d) 168 ms

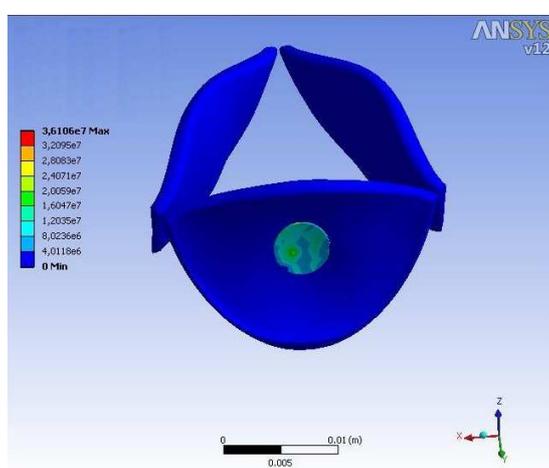
Abbildung A.18: Geometrie D mit Kalzifizierung 1 und Deformation.



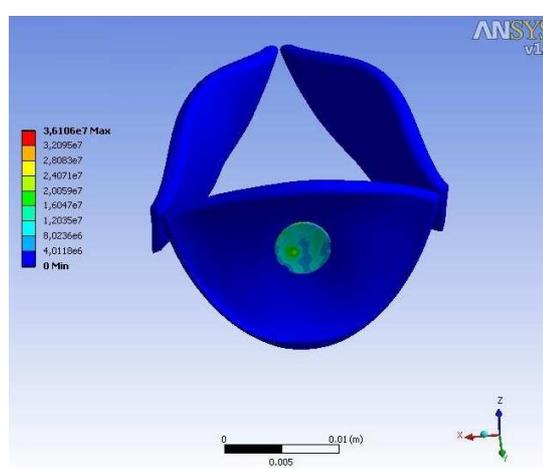
(a) 20 ms



(b) 40 ms

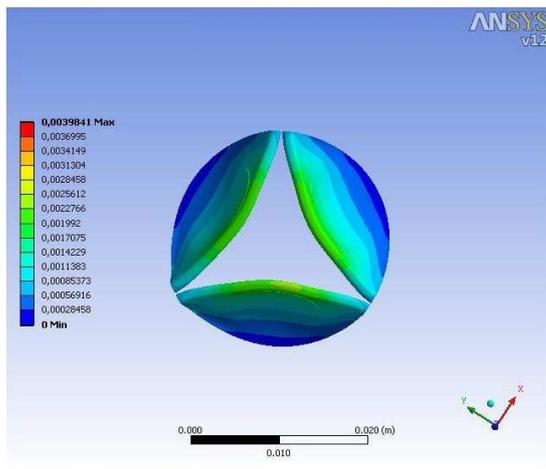


(c) 80 ms

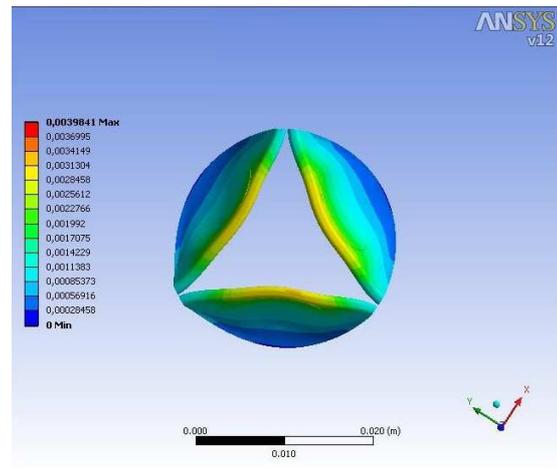


(d) 168 ms

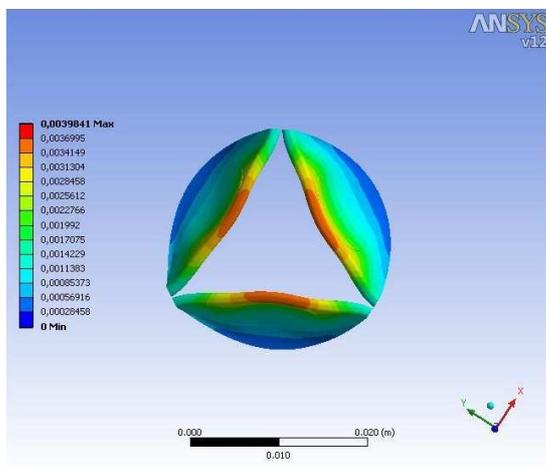
Abbildung A.19: Geometrie D mit Kalzifizierung 1 und von Mises-Spannungsverteilung.



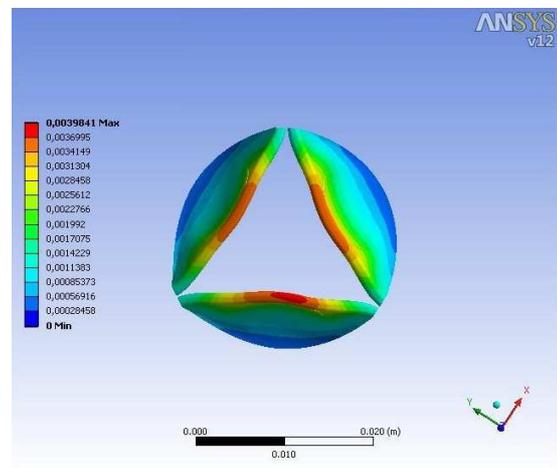
(a) 20 ms



(b) 40 ms



(c) 80 ms



(d) 168 ms

Abbildung A.20: Geometrie D mit Kalzifizierung 2 und Deformation.

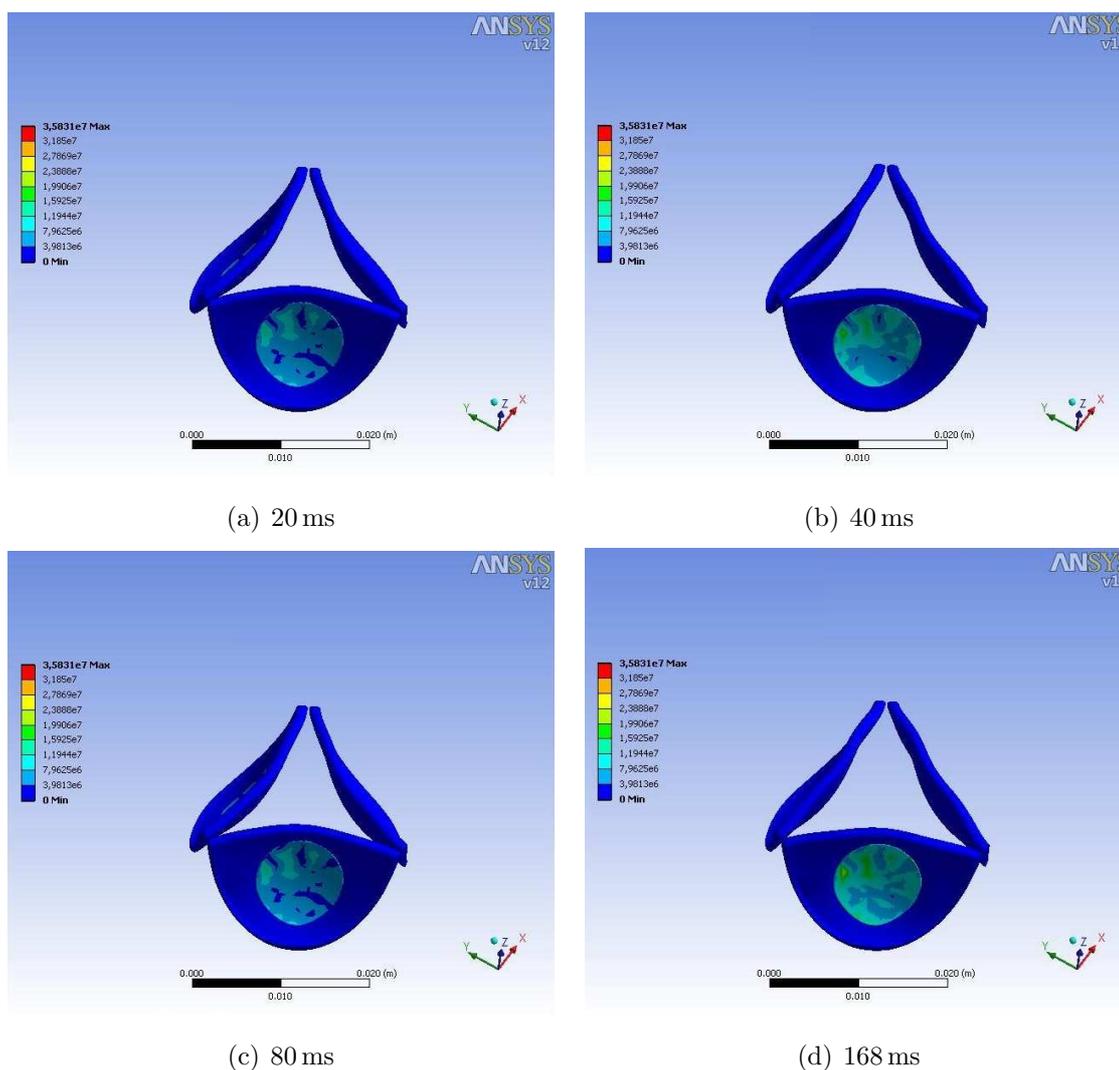


Abbildung A.21: Geometrie D mit Kalzifizierung 2 und von Mises-Spannungsverteilung.

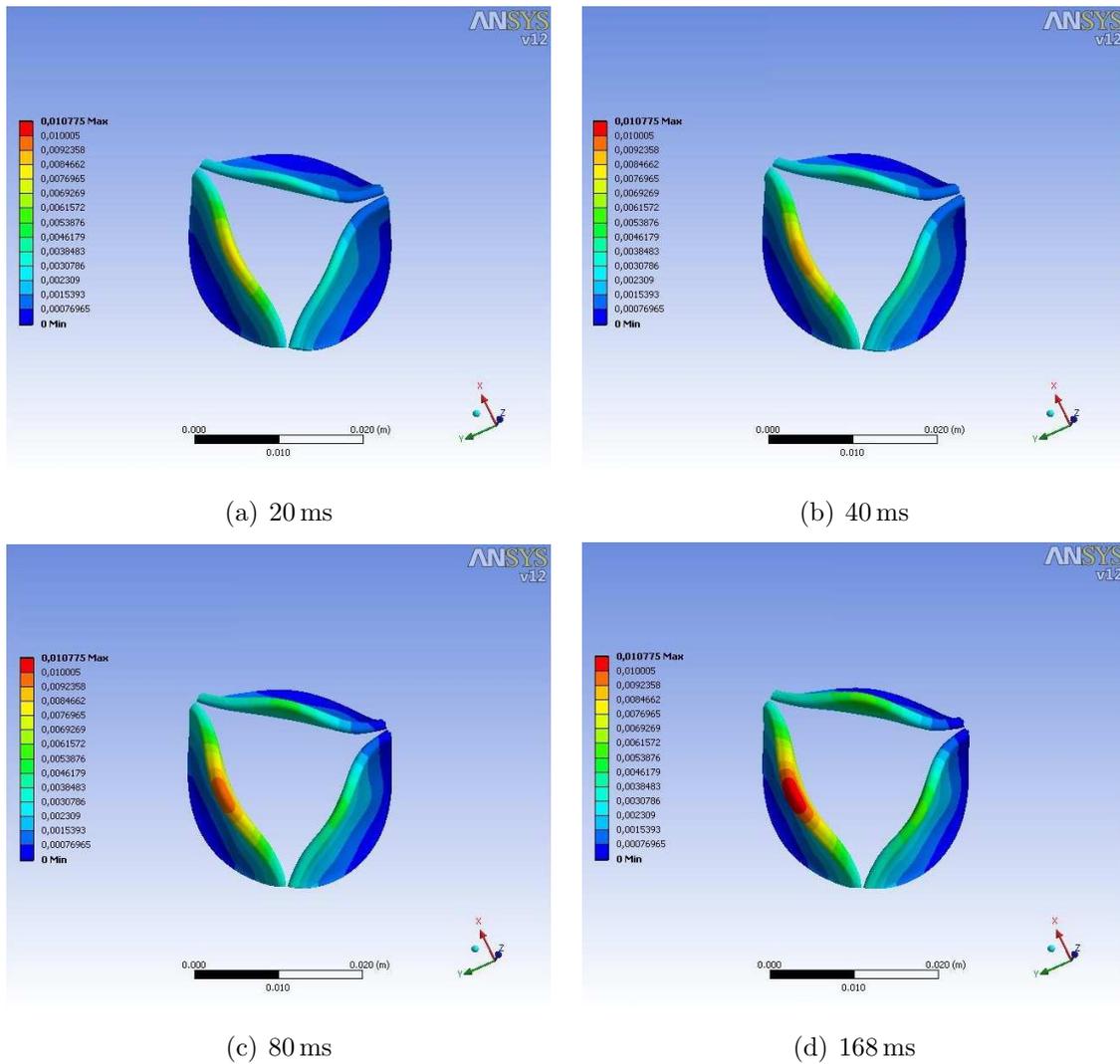


Abbildung A.22: Geometrie D mit Kalzifizierung 1 und Deformation.

FEM-Modell	in vivo Daten [160]
Öffnungszeit: 20 ms	21,1 ms \pm 8,6 ms
Zeitpunkt max. Öffnung: 168 ms	164 ms \pm 9,7 ms

Tabelle A.18: Vergleich der berechneten Daten mit in vivo Daten

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tanja Samira Büschenfeld, geb. Wadouh
Geburtsdatum: 27. Dezember 1980
Geburtort: Hannover
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

08/87 – 06/91 Grundschule Am Sandberge, Hannover
08/91 – 06/93 Orientierungsstufe Lüerstraße, Hannover
08/93 – 07/97 Gymnasium Sophienschule, Hannover
09/97 – 07/98 James I. O'Neill Highschool,
Highland Falls, New York, USA
08/98 – 06/00 Gymnasium Bismarckschule, Hannover
Juni 2000 allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium:

10/00 – 07/01 Diplomstudiengang Maschinenbau,
Technische Universität Ilmenau
10/01 – 12/06 Diplomstudiengang Maschinenbau,
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Dezember 2006 Diplomprüfung

Berufstätigkeit:

01/07 – 05/11 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Institut für Mehrphasenprozesse der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Leitung: Prof. Dr.-Ing. B. Glasmacher, M. Sc.

Hannover, im Dezember 2012