Aus der Abteilung für pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin (Prof. Dr. med. T. Paul) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Subklinische, thrombotische Veränderungen an biologischen Herzklappenprothesen in Pulmonalisposition

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Philipp Konstantin Jewgenow

aus

Berlin

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. Wolfgang Brück
Referent:	Prof. Dr. med. Matthias Sigler
Ko-Referent:	Prof. Dr. med. Theodoros Tirilomis
Datum der mündlichen Prüfung:	29.09.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Subklinische, thrombotische Veränderungen an biologischen Herzklappenprothesen in Pulmonalisposition" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 27.09.2022 Philipp Konstantin Jewgenow

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

**Jewgenow P**, Schneider H, Bokenkamp R, Horer J, Cleuziou J, Foth R, Horke AP, Eicken A, Paul T, Sigler M (2019): Subclinical thrombus formation in bioprosthetic pulmonary valve conduits. Int J Cardiol <u>281</u>, 113-118

**Jewgenow P**, Schneider H, Ruschewski W, Hörer J, Horke A, Foth R, Tirilomis T, Paul T, Sigler M (2015): Thromben am Ansatz von RV-PA-Conduit-Taschenklappen. Thorac Cardiovasc Surg <u>63</u>, DGPK-V0005

Sigler M, Cleuziou J, Schubert S, Foth R, Michel-Behnke I, Scheidmann R, **Jewgenow P**, Paul T, Schmiady M (2019): Pathogenesis of Endocarditis in Bioprosthetic Heart Valves— Re-evaluation of the Current Concept. Thorac Cardiovasc Surg <u>67</u>, DGPK-V41

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Kongenitale Herzfehler und der Pulmonalklappenersatz	
1.2 Biologische Pulmonalklappenprothesen	
1.2.1 Allograft	
1.2.1.1 Homograft	
1.2.2 Aenogram	
1.2.2.2 Contegra® Pulmonary Valved Conduit	
1.2.2.3 Freestyle® Aortic Root Bioprosthesis	6
1.2.2.4 Biocor® Stented Heart Valve System	7
1.2.2.5 Melody® Transcatheter Pulmonary Valve	8
1.3 Biologische Pulmonalklappenprothesen in vivo	
1.4 Thromben und Endokarditis	
1.5 Ziel der Arbeit	
2 Material und Methoden	
2.1 Präparataufarbeitung und technische Ausrüstung	
3 Ergebnisse	14
3.1 Patienten	
3.2 Makroskopie	
3.2.1 Keine Endokarditis	
3.2.2 Endokarditis	
3.3 Histologie	
3.3.1 Thrombusverteilung	
3.3.2 Endokarditis	
3.3.3 Neo-Endothelialisierung	
3.4 Meaikamentose antithrombotische Therapie	
4 Diskussion	26
4.1 Prävalenz von Thrombus-Auflagerungen bei biologischen Klappenim	plantaten 26
4.2 Hinweise auf subklinische Thromben bei bioprothetischen Herzklappe Verfahren	en durch Bildgebende 26
4.3 Histopathologische Untersuchung der Thrombenbildung	
4.4 Pathogenese der subklinischen Thrombenbildung	

\_

5 Literaturverzeichnis	
4.8 Limitationen der Arbeit	
4.7 Zusammenfassung und klinische Konsequenzen	
4.6 Antithrombotische Therapiestrategien	
4.5 Mögliche Relevanz für die Pathogenese der Endokarditis	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hancock®-Conduit, Quelle: Medtronic Inc	4
Abbildung 2: Contegra®-Conduit, Quelle: Medtronic Inc	5
Abbildung 3: Freestyle® Bioprosthesis, Quelle: Medtronic Inc	6
Abbildung 4: Biocor® Stented Heart Valve System, Quelle: St. Jude Medical Inc	7
Abbildung 5: Melody® Transcatheter Pulmonary Valve (McElhinney und Hennesen	
	8
Abbildung 6: Makroskopische Aufnahme von BPV nach Explantation: ohne Endokarditis	
Jewgenow et al. 2019)1	8
Abbildung 7: Makroskopische Aufnahme von Klappenconduits nach Explantation: mit	
Endokarditis (Jewgenow et al. 2019)1	9
Abbildung 8: Histologischer Nachweis subklinischer Thromben, Färbung nach	
Richardson2	0
Abbildung 9: Histologischer Nachweis einer Thrombenbildung (Jewgenow et al. 2019)2	1
Abbildung 10: Immunohistochemischer Nachweis von Fibrinablagerungen (Jewgenow et	
1. 2019)	2
Abbildung 11: Immunohistochemischer Nachweis von Endothelzellen (Jewgenow et al.	
	3
Abbildung 12: Kontrolproben2	4

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Patientendaten1
--

## Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
BPV	bioprosthetic pulmonary valve
CCD	charge-coupled device
CD31	cell differentiation antigen 31
DGPK	Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie und angeborene
	Herzfehler e.V.
HRP	horseradish peroxidase
INR	international normalized ratio
PET	Polyethylenterephthalat
PI	Pulmonalklappeninsuffizienz
PS	Pulmonalklappenstenose
PTFE	Polytetrafluoroethylen
RVOT	right ventriclular outflow tract
VKA	Vitamin-K-Antagonist

## 1 Einleitung

#### 1.1 Kongenitale Herzfehler und der Pulmonalklappenersatz

Herzfehler sind häufige Fehlbildungen beim menschlichen Neugeborenen. Die Prävalenz beträgt 8 bis 10 von 1000 Lebendgeborenen (van der Linde et al. 2011). Dank des medizinischen Fortschritts der vergangenen Jahrzehnte erreicht heute ein Großteil der Betroffenen das Erwachsenenalter (Warnes et al. 2008).

Der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt (*right ventriclular outflow tract*, RVOT) und die Pulmonalklappe sind bei vielen Herzfehlern mit betroffen. Pathologien treten auf Klappenebene auf, zum Beispiel im Sinne einer angeborenen Pulmonalklappenstenose oder in Form komplexer kardialer Fehlbildungen, wie der Fallotschen Tetralogie (Franklin et al. 2006). Je nach Vitium ergeben sich entsprechende Behandlungsoptionen, welche die Herstellung einer möglichst physiologischen Zirkulation als Ziel haben. Diese können die Rekonstruktion oder den Ersatz einer Herzklappe als zentralen Therapieansatz beinhalten. Die Implantation eines klappentragenden Conduits in Pulmonalklappenposition ist eine der am häufigsten durchgeführten chirurgischen Prozeduren bei Menschen mit angeborenen Herzfehlern (Hörer et al. 2013).

Die katheterinterventionelle Pulmonalklappenimplantation wird als weniger invasive Methode im Vergleich zum chirurgischen Vorgehen stets in Erwägung gezogen (Alkashkari et al. 2018; Ansari et al. 2015; Borik et al. 2015). Die erste chirurgische Implantation eines Conduits zwischen rechtem Ventrikel und Pulmonalarterien wurde 1964 durchgeführt (Rastelli et al. 1965). Die erste perkutane Pulmonalklappenimplantation beim Menschen erfolgte im Jahr 2000 (Bonhoeffer et al. 2000a; Bonhoeffer et al. 2000b).

Es hat viele Fortschritte in der Pulmonalklappenchirurgie und dem katheterinterventionellen Herzklappenersatz gegeben. Komplikationen nach Implantation biologischer Herzklappen sind noch immer durch fortschreitende Degeneration, die begrenzte Haltbarkeit und eine erhöhte Inzidenz für Endokarditis gekennzeichnet (Hörer 2018). Ziele der aktuellen Forschung sind deshalb die Ursachen dieser noch ungelösten

Probleme auszumachen und aufgrund der Erkenntnisse einen möglichst physiologischen Ersatz zu entwickeln.

#### 1.2 Biologische Pulmonalklappenprothesen

Für die Herstellung einer möglichst physiologischen Kontinuität zwischen dem rechten Ventrikel und der Pulmonalarterie werden hauptsächlich biologische Pulmonalklappenprothesen (*bioprosthetic pulmonary valve*, BPV) eingesetzt. Diese sind entweder tierischen Ursprungs und in eine Gefäßprothese eingenäht oder vollständige menschliche oder tierische Herzklappen mit umgebendem Gewebe, d.h. Resten von Infundibulum und Gefäß des Spenders.

Die Verwendung von mechanischen Klappen wird aufgrund des im kleinen Kreislauf zwischen rechter Herzkammer und Lunge zusätzlich erhöhten Thromboserisikos nach Herzklappenersatz als problematisch angesehen (Haas et al. 2005; Warnes et al. 2008). Unter bestimmten Voraussetzungen und der strengen Einhaltung einer notwendigen Antikoagulation kann deren Einsatz in der Pulmonalklappenchriurgie auch sinnvoll sein (Dehaki et al. 2019; Dunne et al. 2015; Egbe et al. 2015; Stulak et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse der histologischen Analyse von sechs verschiedenen BPV ausgewertet. Die einzelnen Prothesen werden im Folgenden kurz vorgestellt. Die BPV lassen sich übergeordnet in Allograft (d.h. vom Menschen stammendes Transplantat) und Xenograft (d.h. Transplantat tierischen Ursprungs) unterteilen.

#### 1.2.1 Allograft

#### 1.2.1.1 Homograft

Ein Homograft ist eine explantierte menschliche Aorten- oder Pulmonalklappe. Diese Art Prothese fand seine erste Anwendung 1962, allerdings zunächst in Aortenklappenposition (Ross 1962). In der Vorbereitung zur Transplantation wird der Allograft antibiotisch behandelt und anschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (Götz et al. 2009). Heutzutage kommt teilweise auch die Dezellularisierung zur Anwendung. Darunter versteht man ein aufwendiges laborchemisches Verfahren, welches zelluläre und damit potentiell antigenpräsentierende Bestandteile der Spenderklappe weitgehend entfernt, bis schließlich nur das Bindegewebegerüst bleibt (Aubin 2018; Cebotari et al. 2011).

#### 1.2.2 Xenograft

1.2.2.1 Hancock® Bioprosthetic Valved Conduit

Die Bioprothese Hancock® (Medtronic Inc., Minneapolis, USA) ist porcinen Ursprungs und fand ihre erste Anwendung beim Menschen 1973 (Bowman et al. 1973). Das Modell der Firma Medtronic steht in verschiedenen Ausführungen und Größen zur Verfügung. Allen gemeinsam ist der Aufbau: eine porcine (vom Schwein stammende) Aortenklappe, welche in die Mitte eines Kunststoffschlauches eingenäht ist. Verwendeter Kunststoff ist ein Polyester: Polyethylenterephthalat (PET, Handelsname Dacron®, DuPont, Wilmington, USA). Zur mechanischen Unterstützung wird ein Metall-Ring um den Anulus der Klappe eingenäht (siehe Abbildung 1).

In der Vorbereitung zur Transplantation wird das porcine Gewebe mit Glutaraldehyd  $(C_5H_8O_2)$  sterilisiert und mechanisch stabilisiert. Dieses Verfahren wird auch bei den unten beschriebenen Xenografts angewandt.



Abbildung 1: Hancock®-Conduit, mit freundlicher Genehmigung von Medtronic GmbH

#### 1.2.2.2 Contegra® Pulmonary Valved Conduit

Das Contegra®-Conduit der Firma Medtronic Inc. ist seit 1998 verfügbar und wurde zunächst unter dem Namen Venpro® vertrieben. Dieser biologische Conduit besteht aus einer bovinen (vom Rind stammenden) *Vena jugularis* mit enthaltener dreitaschiger Venenklappe und ist allein für die Rekonstruktion des RVOT bei angeborenen Herzfehlern oder den Conduitersatz vorgesehen (siehe Abbildung 2). Besonderheit ist der natürliche Bau: die Venenklappe muss nicht erst in ein Conduit eingenäht werden (Sfyridis et al. 2011).



Abbildung 2: Contegra®-Conduit, mit freundlicher Genehmigung von Medtronic GmbH

#### 1.2.2.3 Freestyle® Aortic Root Bioprosthesis

Die Freestyle®-Prothese (Medtronic Inc.) ist vom Hersteller ursprünglich für den Aortenklappenersatz vorgesehen und fand 1992 ihre erste Anwendung in klinischen Studien. Eine Verwendung der Prothese in der Pulmonalklappenchirurgie ist nicht unüblich (Novick et al. 2004; Ramanan et al. 2015). Die Klappe ist porcinen Ursprungs und zeichnet sich durch ihre natürliche Physiognomie aus (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3: Freestyle® Bioprosthesis, mit freundlicher Genehmigung von Medtronic GmbH

#### 1.2.2.4 Biocor® Stented Heart Valve System

Die Biocor®-Klappe der Firma St. Jude Medical (St. Jude Medical Inc., St. Paul, MN, USA) wurde 1981 vorgestellt. Heute wird sie als Epic® Aortic Stented Tissue Valve der Firma Abbott angeboten (siehe Abbildung 4). Sie ist eine porcine Composite-Klappe, d.h. sie ist aus drei einzelnen heterogenen Taschenklappen und Perikardgewebe zusammengesetzt und in einem Stent montiert. Der Einsatz dieser Herzklappe zur RVOT-Rekonstruktion ist eher unüblich, Einzelfälle sind jedoch beschrieben (Chen et al. 2013).



Abbildung 4: Epic® Aortic and Mitral Stented Tissue Valve, mit freundlicher Genehmigung von Abbott Structural Heart

#### 1.2.2.5 Melody® Transcatheter Pulmonary Valve

Die Melody®-Klappe (Medtronic Inc.) wird zur perkutanen Pulmonalklappenimplantation verwendet, d.h. diese biologische Prothese wird per Rechtsherzkatherter im RVOT platziert. Sie besteht aus einer bovinen Jugularvenenklappe, welche in ein Stent-Gerüst aus einer Platin-Iridium Legierung eingenäht ist (siehe Abbildung 5). Die Melody® Transcatheter Pulmonary Valve der Firma Medtronic wurde im Rahmen der ersten perkutanen Pulmonalklappenimplantation bei einem Menschen durch Bonhoeffer *et al.* entwickelt (Bonhoeffer et al. 2000a; Bonhoeffer et al. 2000b) und ist seit 2006 verfügbar (McElhinney und Hennesen 2013).



Abbildung 5: Melody® Transcatheter Pulmonary Valve, mit freundlicher Genehmigung von Medtronic GmbH

#### 1.3 Biologische Pulmonalklappenprothesen in vivo

*In vivo* haben biologische Prothesen nur eine begrenzte Haltbarkeit. Dies wirkt sich bei betroffenen Patienten negativ auf die Lebensqualität aus, da Hospitalisationen, zunehmend komplexere Interventionen und Reoperationen langfristig unvermeidbare Konsequenzen sind. Die Haltbarkeit, d.h. die Zeit bis zu einer notwendigen Reoperation, ist abhängig von der verwendeten Prothese und beträgt bei BPV durchschnittlich 10 bis 15 Jahre (Boethig et al. 2007; Breymann et al. 2009; Brown et al. 2005; Dearani et al. 2003; Lee et al. 2011; Siddiqui et al. 2009; Yuan et al. 2008).

Der entscheidende Prozess, welcher zum Funktionsverlust der Klappen führt, ist die zunehmende strukturelle Degeneration. Eine Ursache dafür ist die Vorbehandlung mit Glutaraldehyd vor der Implantation. Durch das Aldehyd werden zwar Sterilisierung, Gewebe-Stabilisierung sowie eine geringere Antigenpräsentation erreicht, es kommt jedoch auch zu einer Mineralisierung von natürlich enthaltenem Calcium und Phosphat (Kim et al. 1999; Schoen und Levy 2005). Die Klappen befinden sich zudem durch die physiologische Blutzirkulation in Systole und Diastole unter kontinuierlicher mechanischer Beanspruchung. Der fortschreitende Funktionsverlust äußert sich in der Bildgebung als Stenose, Insuffizienz oder einer Kombination von beidem. Klinisch können sich bei den Patienten je nach Schweregrad der Klappendysfunktion u.a. Thoraxschmerzen, Dyspnoe, Einschränkungen der Belastbarkeit, periphere Ödeme, Palpitationen und Herzrasen, also Zeichen einer Herzinsuffizienz zeigen.

Neben der durch Degenration limitierten Lebensdauer fehlt biologischen und mechanischen Herzklappen im Vergleich zu nativem Gewebe das Potential zum Wachsen. Eine Stenose kann daher auch relativ durch das schlichte Herauswachsen aus einem Conduit bei pädiatrischen Patienten entstehen. Forschung im Bereich des sogenannten Tissue-Engineerings widmet sich u.a. diesem Problem. Dabei werden biologische Gewebegerüste bis hin zu komplexen anatomischen Strukturen wie Herzklappen im Labor hergestellt und mit autologen Stammzellen *in vitro* besiedelt. Diese Klappen sollen sich nach Transplantation möglichst ähnlich nativer Klappen verhalten. Bis heute konnten jedoch noch keine endgültig zufriedenstellenden Ergebnisse hervorgebracht werden (Aubin 2018; Fioretta et al. 2018; Mendelson und Schoen 2006; Shinoka und Miyachi 2016; Vesely 2005; Zhu et al. 2018).

#### 1.4 Thromben und Endokarditis

Patienten mit mechanischen und biologischen Herzklappenprothesen haben ein hohes Endokarditisrisiko. Endokarditiden von Herzklappenprothesen gelten als schwerste Form dieser Erkrankung mit einer Mortalität von bis zu 40% und machen 10-30% aller Endokarditiden aus (Habib et al. 2015; Hoen und Duval 2013). Diese Erkrankung ist in Diagnostik, Therapie und Prävention nach wie vor sehr komplex und eine große Herausforderung für die Medizin. Die Genese der Endokarditis bei Patienten mit einer biologischen Herzklappe zu verstehen, ist für deren Behandlung von entscheidender Relevanz.

Biologische Prothesen sind weniger thrombogen als mechanische Herzklappenprothesen und benötigen daher auch keine konsequente Antikoagulation (Baumgartner et al. 2018). Warum Patienten mit BPV ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Endokarditis haben, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Grundsätzlich wird als Ursache für die Entwicklung einer Endokarditis die Entstehung einer thrombotischen Ablagerung im Bereich des Herzens angenommen (Habib et al. 2015). Bei einer Bakteriämie, welche z.B. nach kleinen Verletzungen von Haut und Schleimhaut auftreten kann, zirkulieren Erreger im Blut, so dass in der Folge eine Endokarditis durch Infiltration thrombotischer Vegetationen mit Bakterien entstehen kann (Habib et al. 2015; Hoen und Duval 2013).

Klinische Studien konnten eine hohe Inzidenz von subklinischen Thrombusformationen in bioprothetischen Herzklappen in Aortenklappenposition zeigen (Chakravarty et al. 2017; Makkar et al. 2015). Makkar *et al.* zeigten, dass sich die Klappenbeweglichkeit stenotischer aortaler Bioprothesen mit eingeschränkter Klappenbeweglichkeit nach antithrombotischer Therapie verbesserte. Dies wurde als Hinweis auf subklinische Klappenthrombosen als Ursache für die Stenosierungen gewertet. Sonographisch oder in der Computertomographie konnten lokale Thrombusformationen jedoch nicht dargestellt werden. Eine gezielte histopathologische Untersuchung von Bioprothesen auf subklinische Thromben ist unseres Wissens nach bisher noch nicht erfolgt.

#### 1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine Serie von human explantierten BPV, welche keine klinischen oder bildgebenden Hinweise auf Thrombose *in vivo* zeigten, auf das Vorhandensein von subklinischen Thromben zu untersuchen und aus den Ergebnissen mögliche Informationen über die Pathogenese der Endokarditis bei Menschen mit biologischen Pulmonalklappen-conduits abzuleiten.

Nach standardisiertem Protokoll wurden Präparate von 6 verschiedenen explantierten Prothesentypen zunächst makroskopisch beurteilt, histopathologisch aufgearbeitet und anschließend mikroskopisch untersucht.

Hauptaugenmerk bei der histopathologischen Auswertung lag auf folgenden Phänomenen:

- Thrombotische Veränderungen
- Entzündliche Läsionen
- Endothelialisierung

Die Ergebnisse wurden interdisziplinär diskutiert und mit der Literatur verglichen.

### 2 Material und Methoden

#### 2.1 Präparataufarbeitung und technische Ausrüstung

Insgesamt wurden 47 explantierte BPV an unser Labor für die histopathologische Analyse gesandt und nach dem folgenden Prozedere aufgearbeitet. Der erste Schritt erfolgt noch am Ort der Explantation: nach der chirurgischen Entnahme der Conduits, wurden diese mit einer Natrium-Chlorid-Lösung gespült und anschließend in Formaldehyd (4% Phosphat-gepuffert) fixiert.

In unserem Labor wurden die Präparate danach in synthetischem Kunstharz (Methylmethacrylate, Technovit 9100, KULZER&Co, Wehrheim, Deutschland) eingebettet und gehärtet. Es folgten Schnitte von 0,8 mm Dicke mittels Diamanten-Schneidemaschine (300CP, Exakt GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Schnitte wurden daraufhin auf 10-30 µm herunter geschliffen, um eine mit dem Lichtmikroskop auswertbare Dicke zu erreichen. Dafür wurde eine Rotations-Schleifmaschine (400CS, Exakt GmbH, Norderstedt) verwendet.

Die histologische Standard-Färbung wurde mit Richardson-Blue durchgeführt (Richardson et al. 1960). Für die immunohistochemischen Färbungen mussten die entstandenen Schnittpräparate zunächst wieder vom Kunststoff befreit werden, wie zuletzt von unserer Forschungsgruppe ausführlich beschrieben (Quentin et al. 2009). Die Bindung von Primärantikörpern wurde durch die Verwendung von mittels Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Als Primärantikörper kamen ein monoklonaler Antikörper gegen Fibrin (*monoclonal mouse anti-Human antifibrin*, American Diagnostica Inc., Stamford, CT, USA, 1:500) sowie ein monoklonaler Antikörper gegen CD31 (*cell differentiation antigen 31*, Clone JC70A, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, 1:50) zur Anwendung. Als Sekundärantikörper diente ein HRP-markierter Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (*rabbit anti-mouse Ig*, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, 1:100). Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte mittels Diaminobenzidin-Substratlösung. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurde Hämalaun verwendet. Die histologischen Abbildungen wurden mit einer Mikroskopkamera und der dazugehörigen Computer-Software aufgenommen (CCD-Farb Kamera: Color View II und Analysis 3.2, Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland). Weiterhin wurden die histologischen Präparate mit einem automatischen virtuellen Mikroskopscanner (Olympus AS110 Fluorescence Virtual Slide Microscope Scanner, Olympus Europa Holding GmbH) digitalisiert.

Als Kontrollgruppe wurden fünf native porcine Pulmonalklappen von gesunden und unbehandelten deutschen Hausschweinen verwendet. Die porcinen Klappen wurden nach der Explantation in Formaldehyd fixiert und anschließend für die histologische Auswertung in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom geschnitten und mittels Hämatoxylin-Eosin-Lösung gefärbt. Auch bei dieser Kontrollgruppe kam in der Auswertung die o.g. Mikroskopkamera und der o.g. Mikroskopscanner zum Einsatz.

Die verwendeten klinischen Daten wurden den Patientenakten entnommen. Die informierte Einwilligung zur Studienteilnahme wurde von jedem Patienten, bzw. deren Sorgeberechtigten eingeholt. Bei der Verarbeitung und Dokumentation jeglicher Daten dieser Studie wurde nach den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki gehandelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden 47 BPV von 46 Patienten aus drei verschiedenen medizinischen Zentren in Deutschland (Göttingen, München, Stuttgart) und einem Zentrum in den Niederlanden (Leiden) untersucht. Alle Conduits waren im RVOT von Patienten mit angeborenen Herzfehlern implantiert. Die Herzfehler der Patienten betrafen zumeist direkt deren native Pulmonalklappe durch fehlerhafte anatomische Verhältnisse im Sinne einer Stenose, Insuffizienz oder Atresie. Bei neun eingeschlossenen Patienten lag eine Erkrankung der Aortenklappe zugrunde, sodass im Rahmen einer Ross-Operation deren Pulmonalklappe die fehlerhafte Aortenklappe. In Pulmonalisposition wird i.d.R. als Ersatz ein Klappen-tragendes Conduit implantiert. In der vorliegenden Studie wurde diese Therapie bei neun Patienten angewandt.

Wir analysierten 23 Hancock®-Conduits, sieben Homografts, sieben Contegra®-Conduits, sieben Melody®-Klappen, zwei Freestyle®-Prothesen sowie eine Biocor®-Prothese. Zwei der untersuchten Conduits wurden von demselben Patienten entnommen, bei diesem wurde initial eine Hancock® Prothese implantiert, welche im Verlauf gegen eine größere Prothese getauscht werden musste.

Klinische Daten der Patienten wurden aus den Patientenakten bezogen. Informationen zum Alter bei Implantation, Implantationsdauer und Indikationen für die Explantation sind in Tabelle 1 zusammengefasst (Jewgenow et al. 2019). Hauptgrund für eine Explantation war eine Conduitstenose (44/47), bei fast einem Viertel (11/47) lag zusätzlich eine Insuffizienz vor. Bei sechs der Patienten lag zum Zeitpunkt der Explantation eine Endokarditis vor. Bei keinem der Patienten zeigten sich in den echokardiographischen Untersuchungen vor Explantation Zeichen von thrombotischen Veränderungen an den klappentragenden Conduits.

Das Ethikvotum (Nummer: 2018108) der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Titel "Untersuchung von

Gewebereaktionen auf kardiovaskuläre Implantate unter besonderer Berücksichtigung von Neo-Endothelialisierung, Analyse neugebildeter Gewebe (Zellen, Extrazellulärmatrix) sowie Differenzierung von Entzündungsreaktionen beim Menschen" liegt der vorliegenden Studie zugrunde.

Typ der Klappe	o der Klappe		Hancock®	Homograft	Contegra®	Melody®	andere	Gesamt
Anzahl	n		23	7	7	7	3	47
Alter bei Implantation in Monaten	Mittelwert / Median		20 / 12	125 / 68	39 / 31	216 / 238	276 / 184	89 / 39
Implantationsdauer in Monaten	Median (Min Max.)		40,3 (9,1 - 189,2)	96,2 (6,2 - 182,6)	60,5 (14,9 - 141,9)	41,0 (22,1 - 62,9)	41,3 (30,4 - 51,1)	42,0 (6,2 - 1892)
	PS	n	22	7	6	6	3	44
Grund für Explantation	PI	n	7	1	2	1	/	11
	Endokarditis	n	1	/	1	4	/	6
Subklinische Thromben im Klappensinus	n (%)		21 (91,3)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	2 (66,6)	44 (93,6)
VKA-Therapie zum Zeitpunkt der Explantation	n		1*	/	/	1	/	2
Thrombus trotz VKA- Therapie	n		1	/	/	1	/	2
ASS-Therapie zum Zeitpunkt der Explantation	n		6	2	2	1	/	11
Thrombus trotz ASS-Therapie	n		5	2	2	1	/	10

Tabelle 1: Zusammenfassung der Patientendaten (Jewgenow et al. 2019)

PS=Pulmonalklappentenose; PI=Pulmonalklappeninsuffizienz

\* International normalized ratio (INR) war außerhalb des therapeutischen Bereichs (INR < 2), laut medizinischer Aufzeichnung Antikoagulation mit Warfarin

#### 3.2 Makroskopie

#### 3.2.1 Keine Endokarditis

In der makroskopischen Auswertung zeigten sich bei 41 Patienten die explantierten Conduits intakt. Insbesondere die Ränder der Taschenklappen waren frei von Thromben. Ferner gab es keine makroskopischen Hinweise auf thrombotische Veränderungen anderenorts (siehe Abbildung 6).

In der im Verlauf durchgeführten histopathologischen Auswertung zeigten sich in der Gruppe ohne Endokarditis nur drei Präparate ohne thrombotisches Material im Klappensinus. Diese waren makroskopisch von den anderen 38 Präparaten nicht zu unterscheiden gewesen.



Abbildung 6: Makroskopische Aufnahme von BPV nach Explantation: ohne Endokarditis (Jewgenow et al. 2019)

Präparate ohne makroskopischen Befund einer Thrombenbildung oder Endokarditis. Histologisch konnte jedoch Thrombenmaterial im Klappensinus nachgewiesen werden. Melody®-Klappe (a und c), Hancock®-Conduit (b und d), Biocor®-Klappe (e) und Contegra®-Conduit (f).

#### 3.2.2 Endokarditis

Im Vergleich dazu zeigten alle sechs Conduits der Patienten mit nachgewiesener Endokarditis makroskopisch sichtbare parietale Verdickungen der Klappen sowie in variierender Ausprägung typische Läsionen: fibrinöse, warzenartige Auflagerungen und Ulzerationen der Taschen (siehe Abbildung 7). Korrelierend zur Morphologie wird die Endokarditis infektiöser Genese auch als ulceropolypös beschrieben.



Abbildung 7: Makroskopische Aufnahme von Klappenconduits nach Explantation: mit Endokarditis (Jewgenow et al. 2019)

Melody®-Klappe (a und b) mit Endokarditis: partiell verdicktes Gewebe der Taschenklappen, jedoch keine größeren Endokarditisvegetationen und keine Thromben sichtbar.

#### 3.3 Histologie

#### 3.3.1 Thrombusverteilung

In der histopathologischen Untersuchung konnte man bei 44 von 47 Präparaten parietale wandständige Formationen von thrombotischem Material der sonst unauffälligen Semilunarklappen feststellen (siehe Abbildung 8 und 9). Die Thromben zeigten die typische Zusammensetzung von parietalen Thromben: amorphes Gewebe bestehend aus Fibrinnetzen, teils mit eingelagerten Zellen der hämatopoetischen Reihe (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten). Der Nachweis von Fibrin gelang mittels immunhistochemischer Färbung (siehe Abbildung 10). Bei den 41 Präparaten von Patienten ohne Endokarditis wurden keine weiteren thrombotischen Veränderungen des Conduitendothels, wandständig sowie an den Taschen festgestellt.



Abbildung 8: Histologischer Nachweis subklinischer Thromben, Färbung nach Richardson

Homograft, Implantationsdauer: 6 Monate, Grund für Explantation: Stenose. (a) Übersichtsdarstellung des explantierten Präparates, (b) Klappensinus, (c) thrombotische Auflagerungen im Klappensinus.



Abbildung 9: Histologischer Nachweis einer Thrombenbildung (Jewgenow et al. 2019)

Subklinische Thrombenbildung am Klappensinus (Färbung nach Richardson; Pfeile verweisen auf Thromben; schwarze Bereiche: Stentverstärkungen). Klappentyp und Implantationsdauer: (a) Contegra®/65 Monate; (b) Melody®/63 Monate; (c) Hancock®/13 Monate; (d) Hancock®/18 Monate; (e) Hancock®/38 Monate; f Hancock®/14 Monate.



Abbildung 10: Immunohistochemischer Nachweis von Fibrinablagerungen (Jewgenow et al. 2019)

Thrombennachweis durch immunohistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Fibrin (positive Fibrinfärbung in braun). Klappentyp und Implantationsdauer: (a) Hancock®/12 Monate; (b) Homograft/6 Monate; (c) Melody®/49 Monate; (d) Melody®/63 Monate.

#### 3.3.2 Endokarditis

Anders zeigten sich dagegen die sechs Präparate mit nachgewiesener infektiöser Endokarditis. Hier wurden thrombotische Vegetationen nicht nur im Bereich der Klappenansätze in den *Sinus vasalvae*, sondern auch in unterschiedlichem Ausmaß an anderen Stellen auf den Semilunarklappen sowie der Conduitwand nachgewiesen. Allein die BPV mit Endokarditis waren histologisch durch akute Inflammation definiert, d.h. sowohl die parietalen Vegetationen als auch das angrenzende Gewebe war von granulozytären und lymphozytären Zellen infiltriert. Die Thromben der Klappen ohne Endokarditis wiesen im Vergleich nur in geringem Ausmaß eingeschlossene Entzündungszellen auf. Die halbmondförmigen Ränder (*Lunulae valvarum semilunarum*) aller Conduitklappen waren frei von Endokarditisläsionen, ebenso wenig fanden sich größere Ulzerationen oder Risse.

#### 3.3.3 Neo-Endothelialisierung

In allen untersuchten Präparaten zeigte sich in der histologischen Begutachtung intaktes Endothel. Eine Neo-Endothelialisierung, d.h. die Besiedelung der Bioprothesen mit empfängereigenen Endothelzellen, wurde zudem in allen Conduits demonstriert, die mit einem Endothelmarker immunhistochemisch untersucht wurden (siehe Abbildung 11). Dafür wurden Antikörper gegen CD31 (cell differentiation antigen 31) verwendet. CD31, auch als PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) bezeichnet, ist ein membranständiges Glykoprotein, welches bei v.a. Adhäsionsprozessen mit hämatopoetischen Zellen, so zum Beispiel der transendothelialen Migration von Leukozyten in Entzündungsreaktionen, eine Rolle spielt und in hoher Konzentration auf Endothelzellen zu finden ist (Newman 1997; Pusztaszeri et al. 2006). Zum histologischen Nachweis von Endothel eignet sich CD31 sehr gut und spielt in diesem Zusammenhand vor allem bei immunhistochemischen Klassifikationen von Tumoren eine Rolle (Hornick 2013).



Abbildung 11: Immunohistochemischer Nachweis von Endothelzellen (Jewgenow et al. 2019)

Immunohistochemische Färbung mit Antikörpern gegen CD31 zeigen das Vorhandensein von Endothelzellen (positive Färbung in braun). Klappentyp und Zeitraum zwischen Implantation und Explantation: (a) Freestyle®/41 Monate; (b) Melody®/22 Monate; (c) Contegra®/15 Monate; (d) Hancock® /15 Monate.

#### 3.3.4 Kontrollgruppe: native porcine Herzklappen

Die Anatomie und Mikroanatomie menschlicher Herzklappen ist bekannt und mehrfach ausführlich beschrieben worden. Es gibt keine Hinweise auf thrombotische Veränderungen in den *Sinus valsalvae* gesunder nativer Semilunarklappen (Misfeld und Sievers 2007), dennoch wollten wir unsere Ergebnisse mit nativen Pulmonalklappen vergleichen. Als Kontrollgruppe dienten fünf native porcine Pulmonalklappen, welche sich aufgrund der Ähnlichkeit zur humanen Anatomie sehr gut dafür eignen (Crick et al. 1998). Die Schweineklappen wurden nach beschriebenem Protokoll in unserem Labor aufgearbeitet und histologisch untersucht. Es zeigten sich bei allen Präparaten intaktes Endothel und keine Hinweise auf Thrombose oder Entzündungsreaktionen (siehe Abbildung 12).



#### Abbildung 12: Kontrolproben

Hematoxylin/Eosin-Färbung von nativen porcinen Pulmonalklappen verschiedener Tiere (a - d). Basis des Klappensinus ohne Zeichen defekter Intima oder thrombotischen Materials.

#### 3.4 Medikamentöse antithrombotische Therapie

Zum Zeitpunkt der Explantation befanden sich elf Patienten unter dauerhafter Thrombozytenaggregationshemmung und zwei weitere wurden mit einem Vitamin-K-Antagonist (VKA) antikoaguliert (Tabelle 1). Trotz antithrombotischer Therapien konnten bei beiden Präparaten der mit VKA sowie bei zehn von elf der mit Thrombozytenaggregationshemmern behandelten Patienten thrombotische Veränderungen nachgewiesen werden.

Den Labordaten bei Aufnahme vor Explantation war zu entnehmen, dass einer der antikoagulierten Patienten (Hancock®-Conduit) eine *international normalized ratio* (INR) außerhalb des therapeutischen Bereichs (INR < 2) hatte. Bei dem zweiten Patienten mit VKA-Dauertherapie in der Anamnese, zeigten sich in der Laborhistorie keine subtherapeutischen INR-Werte vor Explantation seiner Melody®-Klappe.

### 4 Diskussion

In der vorgelegten Studie wurde unseres Wissens erstmalig eine größere Anzahl an human explantierten BPV histologisch auf Thrombenablagerungen im Bereich des Klappensinus untersucht. Obwohl die Patienten zum Zeitpunkt der Explantation keine klinischen oder bildgebenden Hinweise auf Thrombose ausgebildet hatten, konnten wir bei 44 der 47 untersuchten Präparate eine Thrombenbildung nachweisen. Da ursächlich eine Verletzung des Endothels histologisch und mittels Immunhistochemie ausgeschlossen werden konnte, wird angenommen, dass veränderte rheologische Eigenschaften die Ablagerungen induziert haben könnten. Die histopathologischen Befunde könnten die Entstehung von Endokarditis nach Implantation von bioprothetischen Klappen erklären und Ansätze zu deren Prophylaxe bieten.

#### 4.1 Prävalenz von Thrombus-Auflagerungen bei biologischen Klappenimplantaten

thrombembolische Ereignisse biologischem Klappenthrombosen und nach Pulmonalklappenersatz sind vergleichsweise seltene Komplikationen, welche normalerweise nur postoperativ und bis zur vollständigen Besiedlung des Transplantats mit autologen Endothelzellen auftreten können (Baumgartner et al. 2018; Nishimura et al. 2014; Roudaut et al. 2007; Siddiqui et al. 2009). Konträr zu dieser Annahme stehen unsere Ergebnisse der histologischen Begutachtung von 47 nicht selektierten BPV der vorliegenden Arbeit. An den Ansätzen der Semilunarklappen auf der pulmonalen Seite der Conduits zeigte sich eine hohe Prävalenz an subklinischen parietalen Thromben (93%). Es kann angenommen werden, dass diese subklinischen Befunde nur mittels einer zielgerichteten histologischen Analyse erhoben werden konnten.

# 4.2 Hinweise auf subklinische Thromben bei bioprothetischen Herzklappen durch Bildgebende Verfahren

Makkar *et al.* (2015) untersuchten kardiale Computertomographie-Scans von Patienten mit implantierten aortalen Bioprothesen und konnten eine reduzierte Beweglichkeit der Semilunarklappen bei einer klinischen Studie (22 von 55 Patienten, 40%) sowie der Auswertung von Daten von zwei Zentren (17 von 132 Patienten, 13%) feststellen. Nach Initiierung einer medikamentösen Antikoagulation konnten die Autoren in

Kontrolluntersuchungen dokumentieren, dass sich die Beweglichkeit der Bioprothesen bei allen Patienten unter Antikoagulation (11 von 11 Patienten) und nur bei einem Patienten ohne Antikoagulation (1 von 10 Patienten) normalisierte und vermuteten so thrombotische Veränderungen als Ursache für die Klappenfunktionseinschränkungen (Makkar et al. 2015). Mit diesen Ergebnissen als Grundlage konnte in einer Studie mit signifikanten Patientenzahlen das Ergebnis reproduziert werden (Chakravarty et al. 2017). Vergleichbar mit der hier vorgestellten Studie, sah man auch bei diesen Patienten weder klinische noch echokardiographische Hinweise auf Thrombose.

#### 4.3 Histopathologische Untersuchung der Thrombenbildung

Es gibt verschiedene Publikationen zu histologischen Untersuchungen biologischer Conduits. Dabei lag der Schwerpunkt der Analysen zumeist auf Degeneration und Inflammation sowie in seltenen Fällen klinisch relevanten Thrombosen. Von subklinischen Thromben am Klappenansatz wird insgesamt nicht berichtet.

Schoen (1995) berichtet in seinem Review über die Pathologien mechanischer und biologischer Herzklappen von großen thrombotischen Ablagerungen, welche bei BPV meist auf Seiten des Ausflusses der Klappen zu finden sind. Ob auch die *Sinus valsalvae* betroffen sein können, wird nicht konkretisiert, Bildmaterial wird nicht zur Verfügung gestellt.

Zwei histologische Studien von Yahagi *et al.* (2017, 2018) bestätigen ebenfalls die vergleichsweise niedrige Inzidenz von klinisch relevanten Klappenthrombosen nach katheterinterventionellem biologischem Aortenklappenersatz. Die Autoren untersuchten 22 durch Ballondilatation implantierbare und 21 selbstexpandierende biologische Aortenklappenprothesen nach Autopsie *post mortem* oder chirurgischer Explantation. Eine symptomatische Klappenthrombose wurde in jeweils einem Fall (<5%) und subklinische moderate Thrombosen auf den Segeln in unter 20% diagnostiziert. Alle anderen Fälle waren in der Histologie frei von Thromben. Es wurden jedoch nur drei Bereiche untersucht: die als "inflow" (proximal der Klappe) und die als "outflow" (distal der Klappe) bezeichnete Region der Conduits, sowie die Klappenkommissuren. Dabei gelang der histopathologische Nachweis von adhärenten Thromben und Neointimabildung in der Conduitwand sowie den Taschenklappen. Die Autoren entwickelten eine Skala zur

histopathologischen Einschätzung des Schweregrades der thrombotischen Veränderungen (Yahagi et al. 2018; Yahagi et al. 2017).

Neves *et al.* (1995) haben u.a. histologische Unterschiede der Immunantwort zwischen aortalen Grafts von fünf herztransplantierten Patienten, sechs biologischen aortalen Conduits und einem Autograft untersucht. Die biologischen Conduits wiesen Zeichen von Degeneration und entzündlicher Infiltration auf, von thrombotischen Veränderungen wurde nicht berichtet. Im Gegensatz dazu konnte in einer Untersuchung von 40 explantierten Homografts durch Koolbergen *et al.* (2002), in der gezielt nach Immunreaktionen gesucht wurde, nur eine minimale immunologisch vermittelte Entzündungsreaktion gesehen werden. Ein Grund für die geringere Immunantwort wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass die Transplantate in hohem Maße an Spenderzellen sowie der natürlichen Gewebestruktur verloren hatten und dadurch vermutlich weniger immunogen waren. Trotz zum Teil fehlendem Endothel wird von Thrombenablagerungen nicht berichtet, ob speziell der Klappensinus mituntersucht wurde, wird nicht erwähnt.

In ihrer Studie zur Untersuchung von Degenerationsmechanismen bioprothetischer Herzklappen konnten Sakaue *et al.* (2018) eine vermehrte Einlagerung von Fibrinogen und Plasminogen mittels biochemischer und immunhistochemischer Nachweismethoden innerhalb des Gewebes der Taschenklappen einer explantierten aortalen Bioprothese zeigen. Beide Proteine sind wichtige Bestandteile des Gerinnungssystems und könnten ursächlich für das Fortschreiten der Klappendegeneration sein. Insbesondere die Fibringeneinlagerung könnte zur Thrombenbildung und veränderten Mobilität der Taschenklappen beigetragen haben. Yamamoto *et al.* (2020) beschrieben ebenfalls eine proteinöse Infiltration der Klappensegel bis hin zur Kalzifikation der Klappe bei stenosebedingtem Klappenversagen. Sie untersuchten histologisch 15 Klappensegel von fünf insuffizienten Conduits und vergleichend von 12 intakten Klappen. Die Thrombenbildung stand jedoch auch hier nicht im Fokus.

Zu erwähnen ist auch die Studie von Kasimir *et al.* (2006), die in-vitro die Eigenschaften von zellfreien xenogenen Klappen in Bezug auf Entzündungsprozesse und Thrombozytenaktivierung analysierte. Es wurde gezeigt, dass auch zellfreie xenogene Materialien die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten induzieren können. Eine

"Besiedlung" des Klappenmaterials mit humanen Endothelzellen kann diese entzündlichen Effekte reduzieren (Kasimir et al. 2006).

In einer dieser Arbeit vorausgegangenen Dissertation unserer Forschungsgruppe in Göttingen zur histopathologischen Untersuchung zur Biokompatibilität von 24 explantierten Pulmonalklappenconduits (Homografts, Contegra®-Conudits und Hancock®-Conduits) konnte Göbbert mittels Immunhistochemie analog zu der vorliegenden Arbeit eine komplette Endothelialisierung der Conduits feststellen (Göbbert 2009). Zudem geht sie konkret auf die Entwicklung einer subendothelialen, hauptsächlich aus Bindegewebe und fibromuskulären Zellen bestehenden Gewebeschicht ein, welche als Pseudointima bezeichnet wird. Göbbert vermutete anhand ihrer Untersuchungen, dass ein entscheidender Zwischenschritt bei der Ausbildung dieser, mit der Intima autologer Gefäße vergleichbaren Gewebeschicht, die Bildung wandständiger thrombotischer Strukturen sei. In Bezug auf die Biokompatibilität der Implantate konnte bei allen Präparaten eine Immunreaktion im Sinne von Inflammation festgestellt werden. Dabei fiel auf, dass diese Reaktionen bei Xenografts im Vergleich zu Homografts ausgeprägter war und die Entzündungsreaktionen zu einer vermehrten Ausprägung thrombotischer Pseudointima führte. Analog zu der vorliegenden Arbeit konnte auch Göbbert zum Teil thrombotisches Material im Klappensinus der Präparate feststellen. Die Häufigkeit dieses Befundes wurde jedoch nicht quantifiziert.

Butany *et al.* (2004) zeigen in einer histopathologischen Abbildungen eines explantierten Homografts u.a. Thrombenablagerungen im Klappensinus, es wird jedoch nicht näher auf diesen Befund eingegangen. In einer histopathologischen Untersuchung von 14 Aortenklappenprothesen beschreiben Nair *et al.* (2012) schwere und über 30% der Klappenoberfläche bedeckende Thromben im Klappensinus und auf der aortalen Seite in vier Präparaten. In allen Präparaten wurden chronische Entzündungsreaktion gegen das porcine Graftgewebe festgestellt und deren Pathogenese ausführlich diskutiert, auf die gefundenen Thromben wurde nicht näher eingegangen.

#### 4.4 Pathogenese der subklinischen Thrombenbildung

Gründe für die hohe Prävalenz von Thromben am Ansatz der BPV in dieser Arbeit, können nur vermutet werden. Der Virschowschen Trias nach bilden sich Thromben durch die Veränderung der (a) Blutzusammensetzung, durch (b) Endothelzellschädigungen oder (c) Hämostase. Ob Prädispositionen für Thrombosen oder unphysiologische Blutzusammensetzungen vorlagen, wurde im Detail nicht untersucht. Das nahezu ubiquitäre Vorkommen von subklinischen Thromben lässt jedoch Gerinnungsstörungen als Ursache unwahrscheinlich erscheinen. Mittels histologischer Untersuchung sowie immunhistochemischer Färbungen konnten wir intaktes Endothel in den Präparaten unserer Studie nachweisen. Wir vermuten daher, dass die Hauptursache für die Bildung subklinischer Thromben Hämostase ist. Diese These wird durch Hasler und Obrist (2018) unterstützt, welche aortalen Blutfluss kernspinntomographisch untersuchten und eine Stase im Sinus implantierter Bioprothesen im Vergleich zu nativen Aortenklappen darstellen konnten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an nativen porcinen Pulmonalklappen unserer Kontrollgruppe lassen sich mit der Vermutung zusätzlich gut vereinbaren. Soweit wir wissen, wurden thrombotische Ablagerungen an nativen Pulmonalklappen noch nie ohne vorangegangene Operation oder Katheterintervention beschrieben. Es ist nicht anzunehmen, dass in den Sinus nativer Pulmonalklappen *per se* Hämostase-fördernde Verhältnisse bestehen könnten.

#### 4.5 Mögliche Relevanz für die Pathogenese der Endokarditis

Aktuell wird angenommen, dass Thromben, welche sich an verletztem Endothel gebildet haben, die Ansiedelung von Bakterien begünstigen und somit ursächlich für die Entstehung einer Endokarditis sind (Habib et al. 2009). Diese Theorie entstammt tierexperimenteller Modelle, in denen Fibrinablagerungen an künstlich geschädigtem Endothel bakteriell infiltriert wurden (Durack 1975; Fitzgerald et al. 2006; Garrison und Freedman 1970; Herzberg 1996; Keynan und Rubinstein 2013; Veloso et al. 2011).

Die in unserer Studie fast ausschließlich nicht infektiösen thrombotischen Vegetationen im Sinus der BPV geben Grund zu der Annahme, dass die durch Stase verursachte Fibrinkondensation den primären Ausgangspunkt für die Entstehung einer infektiösen Endokarditis darstellt. Diese These wird durch eine weitere Untersuchung unserer Forschungsgruppe unterstützt: in einer gezielten histopathologischen Untersuchung von 19 beim Menschen aufgrund von Endokarditis explantierten BPV konnten bei 18 der Präparate Endokarditisläsionen im Klappensinus festgestellt werden. Die Läsionen waren, analog zu unserer Arbeit, durch thrombotisches Material infiltriert mit Entzündungszellen gekennzeichnet. Die Läsionen fanden sich in geringerem Ausmaß an anderen Strukturen der BPV, so zeigten sich die *Lunulae valvarum semilunarum* weitaus weniger betroffen. Es wird also geschlussfolgert, dass weniger die Scherkräfte des Blutflusses und daraus resultierende Endothelschäden die Grundlage für Thromben sind, sondern vielmehr die ungünstigen rheologischen Verhältnisse in den *Sinus valsalvae* von BPV (Sigler et al. 2019).

#### 4.6 Antithrombotische Therapiestrategien

Sowohl der Klappentyp als auch deren anatomische Lokalisation und das patientenspezifische Thromboserisiko und Blutungsneigung determinieren die notwendige Intensität und Dauer der antithrombotischen Therapiestrategien (Dangas et al. 2016). Derzeit differenziert man zwischen zwei antithrombotischen Therapiestrategien basierend auf ihren Wirkmechanismen: Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten oder direkte orale Antikoagulation und Thrombozytenaggregationshemmung (Acetylsalicylsäure allein oder dual in Kombination mit einem Adenosin-Diphosphat-P2Y12-Rezeptor-Blocker) (Dangas et al. 2016). Jedoch wird laut der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie und angeborene Herzfehler e.V. vor allem für Kinder eine dauerhafte orale Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten als suboptimal angesehen. Diese Patientengruppe neigt aufgrund der erhöhten körperlichen Aktivität zu Traumata, sodass unter einer Antikoagulation vermehrt Blutungskomplikationen auftreten können. Weiterhin würde eine medikamentöse Antikoagulation eine regelmäßige Gerinnungskontrolle erfordern, welche die Lebensqualität zusätzlich einschränken würde. Direkte orale Antikoagulantien sind für die Antikoagulation nach mechanischem Klappenersatz generell nicht zugelassen (DGPK 2020).

Obwohl der positive Effekt der Antikoagulation in der Prävention und Behandlung einer bioprothetischen Klappenthrombose weithin anerkannt ist, wird die Intensität, die optimale Therapiedauer und das additive Risiko der Antikoagulationstherapie noch diskutiert. Es existieren noch keine einheitlichen Handlungsempfehlungen (Petrescu et al. 2020). In der Praxis wird meistens eine Antikoagulation mit VKA für 3-6 Monate vorgenommen und anschließend Acetylsalicylsäure (ASS) für die Dauer von wenigstens einem Jahr verabreicht (DGPK 2020). In Göttingen wird, so wie in den meisten anderen Herzzentren, postoperativ eine Plättchenhemmung mit ASS angewandt. Die empfohlene Therapiedauer von sechs Monaten beruht auf der Annahme, dass die Endothelialisierung zu diesem Zeitpunkt vollständig abgeschlossen ist (Göbbert 2009).

Die in der vorgelegten Studie hohe Inzidenz von subklinischer Thrombenbildung und deren potenzieller Einfluss auf eine Endokarditis erfordern zuverlässige und auch langfristige präventive antithrombotische Maßnahmen, wie duale Plättchenhemmer oder eine Kombination mit einer Antikoagulationstherapie. Elf unserer 46 Patienten wurden mit ASS bis zur Explantation ihres Pulmonalklappenconduits behandelt. Nur bei einem dieser Patienten konnten wir einen Thromben-freien Klappensinus nachweisen. Somit scheint es fraglich, ob ASS allein für eine effektive Prävention der Thrombenbildung ausreichend ist. Eine duale thrombozytenaggregationshemmende Therapie wird auch durch die Studie von Chakravaty et al. (2017) unterstützt. Ebenso berichteten Egbe et al. (2015), dass eine thrombozytenaggregationshemmende Therapie allein nicht ausreichend war, um eine Reduktion der Thrombenbildung an bioprothetischen Klappen nach der chirurgischen Implantantation zu erzielen. Im Gegensatz dazu zeigte Baudisch (2010) in ihrer Dissertation, dass keine thrombotischen Ereignisse auftraten, wenn postoperativ eine niedrigdosierte ASS-Medikation über 6 Monate verabreicht wurde. Ebenso empfehlen Boudjemline et al. (2003) eine postoperative thrombozytenaggregationshemmende Therapie für mindestens 6 – 12 Monate nach bioprothetischem Pulmonalklappenersatz mit Contegra®-Conduits, um frühe Thrombosen der BPV zu verhindern.

Die VKA-Behandlung wird grundsätzlich als hoch effektiv für die Thrombenprävention (Dangas et al. 2016) und auch zur Restoration der Klappenmobilität (Makkar et al. 2015) eingeschätzt. Jedoch gibt es Berichte, dass eine Antikoagulationstherapie bei Patienten nicht immer ansprach. Petrescu et al. (2020) untersuchten den Einfluss der Antikoagulationstherapie auf die Langlebigkeit der Prothesen mit Fokus auf das Wiederauftreten von Thrombosen, thromboembolische Ereignisse und die Gesamtmortalität. Sie zeigten, dass weder Warfarin noch direkte orale Antikoagulantien das Risiko einer Thrombenbildung vollständig eliminierten. Ein Viertel der Patienten (14 Aorten-, 2 Mitral-, 4 Trikuspidal- und 1 Pulmonalklappe) sprachen auf die Antikoagulationstherapie nicht an. Zusätzlich beschrieben sie, dass bei Patienten unter Antikoagulation ein signifikant höheres Blutungsrisiko im Vergleich zu den Kontrollpersonen (12% vs. 2%) auftrat (Petrescu et al. 2020).

Wir konnten ebenfalls bei beiden Patienten, die eine VKA-Medikation zum Zeitpunkt der der Conduit-Explantation erhalten hatten, Thromben im Klappensinus feststellen. Sicherlich ist die geringe Fallzahl (n = 2) nicht ausreichend, um weitergehende Schlussfolgerungen zu ziehen, aber zumindest unterstützt dieser Befund die Vorbehalte gegenüber Antikoagulationstherapien bei Kindern (DGPK 2020).

#### 4.7 Zusammenfassung und klinische Konsequenzen

Subklinische thrombotische Veränderungen auf der pulmonalen Seite der Klappenansätze biologischer Pulmonalisconduits konnten in dieser Arbeit mit hoher Prävalenz dokumentiert werden. Die Informationen wurden mittels histologischer Auswertung und immunhistochemischer Spezialfärbungen gewonnen. Intaktes Endothel konnte in den untersuchten Präparaten festgestellt werden. Daraus ergibt sich der Verdacht, dass der Hauptgrund für die hohe Inzidenz von Endokarditiden bei Patienten mit BPV die Infiltration mit pathogenen Erregern der maßgeblich durch diastolische Stase in den *Sinus valsalvae* entstehenden parietalen thrombotischen Veränderungen ist.

Eine diskussionswürdige Erkenntnis ist zudem, dass eine thrombozytenaggregationshemmende Therapie nach biologischem Pulmonalklappenersatz bei 10 untersuchten Patienten eine Ausbildung beschriebener Thromben nicht verhindern konnte. Weitere Studien inklusive histopathologischer Auswertungen explantierter BPV werden notwendig sein, um die hier dokumentierten Ergebnisse zu bestätigen. Schlussendlich empfehlen sich prospektive Studien, welche die Auswirkungen einer therapeutischen medikamentösen Antikoagulation für die Prävention von Pulmonalklappenthrombosen untersuchen.

Außerdem sollten auch Empfehlungen zu allgemeinen Maßnahmen der Thromboseprävention bei betreffenden Patienten nicht unerwähnt bleiben. Die Verbesserung der rheologischen Eigenschaften des Blutes, u.a. durch körperliche Bewegung und ausreichende tägliche Flüssigkeitszufuhr, könnten Bestandteil zukünftiger Forschungen sein.

#### 4.8 Limitationen der Arbeit

Untersucht wurde eine nicht selektierte Gruppe von Patienten. Verglichen mit anderen histologischen Arbeiten ist die Anzahl der untersuchten Conduitpräparate als signifikant anzusehen. Insgesamt wurden sechs verschiedene BPV Typen analysiert. Für vergleichende Aussagen unter den verschiedenen Conduittypen ist die Anzahl zu gering.

### 5 Literaturverzeichnis

Alkashkari W, Alsubei A, Hijazi ZM (2018): Transcatheter Pulmonary Valve Replacement: Current State of Art. Curr Cardiol Rep <u>20</u>, 27

Ansari MM, Cardoso R, Garcia D, Sandhu S, Horlick E, Brinster D, Martucci G, Piazza N (2015): Percutaneous Pulmonary Valve Implantation: Present Status and Evolving Future. J Am Coll Cardiol <u>66</u>, 2246-2255

Aubin H (2018): Extrazelluläre Matrixgerüste auf Basis von dezellularisiertem nativem Gewebe. Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie <u>32</u>, 520-527

Baudisch AK: Rekonstruktion des rechtsventrikulären Ausflusstraktes mit dem bovinen klappentragenden Contegra®-Conduit: Mittelfristige Ergebnisse. Med. Diss. Berlin. 2010

Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, Iung B, Lancellotti P, Lansac E, Munoz DR, et al. (2018): 2017 ESC/EACTS Guidelines for the Management of Valvular Heart Disease. Rev Esp Cardiol (Engl Ed) <u>71</u>, 110

Boethig D, Goerler H, Westhoff-Bleck M, Ono M, Daiber A, Haverich A, Breymann T (2007): Evaluation of 188 consecutive homografts implanted in pulmonary position after 20 years. Eur J Cardiothorac Surg <u>32</u>, 133-142

Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z, Hausse AO, Aggoun Y, Bonnet D, Sidi D, Kachaner J (2000a): Transcatheter implantation of a bovine valve in pulmonary position: a lamb study. Circulation <u>102</u>, 813-816

Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z, Merckx J, Aggoun Y, Bonnet D, Acar P, Le Bidois J, Sidi D, Kachaner J (2000b): Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction. Lancet <u>356</u>, 1403-1405

Borik S, Crean A, Horlick E, Osten M, Lee KJ, Chaturvedi R, Friedberg MK, McCrindle BW, Manlhiot C, Benson L (2015): Percutaneous pulmonary valve implantation: 5 years of follow-up: does age influence outcomes? Circ Cardiovasc Interv <u>8</u>, e001745

Boudjemline Y, Bonnet D, Massih TA, Agnoletti G, Iserin F, Jaubert F, Sidi D, Vouhe P (2003): Use of bovine jugular vein to reconstruct the right ventricular outflow tract: early results. J Thorac Cardiovasc Surg <u>126</u>, 490-497

Bowman FO, Jr., Hancock WD, Malm JR (1973): A valve-containing dacron prosthesis. Its use in restoring pulmonary artery-right ventricular continuity. Arch Surg <u>107</u>, 724-728

Breymann T, Blanz U, Wojtalik MA, Daenen W, Hetzer R, Sarris G, Stellin G, Planche C, Tsang V, Weissmann N, et al. (2009): European Contegra multicentre study: 7-year results after 165 valved bovine jugular vein graft implantations. Thorac Cardiovasc Surg 57, 257-269

Brown JW, Ruzmetov M, Rodefeld MD, Vijay P, Turrentine MW (2005): Right ventricular outflow tract reconstruction with an allograft conduit in non-ross patients: risk factors for allograft dysfunction and failure. Ann Thorac Surg <u>80</u>, 655-663; discussion 663-654

Butany J, Ahluwalia MS, Nair V, David TE (2004): Cryopreserved pulmonary homograft: postimplant changes. Cardiovasc Pathol <u>13</u>, 59-61

Cebotari S, Tudorache I, Ciubotaru A, Boethig D, Sarikouch S, Goerler A, Lichtenberg A, Cheptanaru E, Barnaciuc S, Cazacu A, et al. (2011): Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. Circulation <u>124</u>, S115-123

Chakravarty T, Sondergaard L, Friedman J, De Backer O, Berman D, Kofoed KF, Jilaihawi H, Shiota T, Abramowitz Y, Jorgensen TH, et al. (2017): Subclinical leaflet thrombosis in surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves: an observational study. Lancet <u>389</u>, 2383-2392

Chen XJ, Smith PB, Jaggers J, Lodge AJ (2013): Bioprosthetic pulmonary valve replacement: contemporary analysis of a large, single-center series of 170 cases. J Thorac Cardiovasc Surg <u>146</u>, 1461-1466

Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH (1998): Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. J Anat <u>193 (Pt 1)</u>, 105-119

Dangas GD, Weitz JI, Giustino G, Makkar R, Mehran R (2016): Prosthetic Heart Valve Thrombosis. J Am Coll Cardiol <u>68</u>, 2670-2689

Dearani JA, Danielson GK, Puga FJ, Schaff HV, Warnes CW, Driscoll DJ, Schleck CD, Ilstrup DM (2003): Late follow-up of 1095 patients undergoing operation for complex congenital heart disease utilizing pulmonary ventricle to pulmonary artery conduits. Ann Thorac Surg <u>75</u>, 399-410; discussion 410-391

Dehaki MG, Al-Dairy A, Rezaei Y, Omrani G, Jalali AH, Javadikasgari H, Dehaki MG (2019): Mid-term outcomes of mechanical pulmonary valve replacement: a single-institutional experience of 396 patients. Gen Thorac Cardiovasc Surg <u>67</u>, 289-296

DGPK (2020): Kongenitale Aortenklappenstenose. S2k Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie und angeborene Herzfehler e.V. http://www.kinderkardiologie.org/fileadmin/user\_upload/Leitlinien/LL\_vAS\_2020\_11\_25 \_final.pdf; abgerufen am 31.12.2020

Dunne B, Xiao A, Litton E, Andrews D (2015): Mechanical prostheses for right ventricular outflow tract reconstruction: a systematic review and meta-analysis. Ann Thorac Surg <u>99</u>, 1841-1847

Durack DT (1975): Experimental bacterial endocarditis. IV. Structure and evolution of very early lesions. J Pathol <u>115</u>, 81-89

Egbe AC, Pislaru SV, Pellikka PA, Poterucha JT, Schaff HV, Maleszewski JJ, Connolly HM (2015): Bioprosthetic Valve Thrombosis Versus Structural Failure: Clinical and Echocardiographic Predictors. J Am Coll Cardiol <u>66</u>, 2285-2294

Fioretta ES, Dijkman PE, Emmert MY, Hoerstrup SP (2018): The future of heart valve replacement: recent developments and translational challenges for heart valve tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med <u>12</u>, e323-e335

Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D (2006): The interaction of bacterial pathogens with platelets. Nat Rev Microbiol <u>4</u>, 445-457

Franklin RC, Beland MJ, Krogmann ON, International Society for Nomenclature of P, Congenital Heart D (2006): Mapping and coding of nomenclatures for paediatric and congenital heart disease. Cardiol Young <u>16</u>, 105-106

Garrison PK, Freedman LR (1970): Experimental endocarditis I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene catheter in the right side of the heart. Yale J Biol Med <u>42</u>, 394-410

Göbbert J: Biokompatibilitätsuntersuchung von Conduits für den Pulmonalklappenersatz. Med. Diss. Göttingen. 2009

Götz W, Mendler N, R. L: Homograft Bank in der Herzchirurgie. In: Wintermantel E, Ha SW (Hrsg): Medizintechnik. Springer, Berlin, Heidelberg 2009

Haas F, Schreiber C, Horer J, Kostolny M, Holper K, Lange R (2005): Is there a role for mechanical valved conduits in the pulmonary position? Ann Thorac Surg <u>79</u>, 1662-1667; discussion 1667-1668

Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, Moreillon P, de Jesus Antunes M, Thilen U, Lekakis J, et al. (2009): Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. Eur Heart J <u>30</u>, 2369-2413

Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta JP, Del Zotti F, Dulgheru R, El Khoury G, Erba PA, Iung B, et al. (2015): 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). Eur Heart J <u>36</u>, 3075-3128

Hasler D, Obrist D (2018): Three-dimensional flow structures past a bio-prosthetic valve in an in-vitro model of the aortic root. PLoS One <u>13</u>, e0194384

Herzberg MC (1996): Platelet-streptococcal interactions in endocarditis. Crit Rev Oral Biol Med <u>7</u>, 222-236

Hoen B, Duval X (2013): Clinical practice. Infective endocarditis. N Engl J Med <u>368</u>, 1425-1433

Hörer J (2018): Current spectrum, challenges and new developments in the surgical care of adults with congenital heart disease. Cardiovascular diagnosis and therapy <u>8</u>, 754-764

Hörer J, Vogt M, Wottke M, Cleuziou J, Kasnar-Samprec J, Lange R, Schreiber C (2013): Evaluation of the Aristotle complexity models in adult patients with congenital heart disease. Eur J Cardiothorac Surg <u>43</u>, 128-134; discussion 134-125

Hornick JL: Practical Soft Tissue Pathology: A Diagnostic Approach; Saunders 2013

Jewgenow P, Schneider H, Bokenkamp R, Hörer J, Cleuziou J, Foth R, Horke AP, Eicken A, Paul T, Sigler M (2019): Subclinical thrombus formation in bioprosthetic pulmonary valve conduits. Int J Cardiol <u>281</u>, 113-118

Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Nigisch A, Dekan B, Wolner E, Weigel G, Simon P (2006): Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. J Heart Valve Dis <u>15</u>, 278-286; discussion 286

Keynan Y, Rubinstein E (2013): Pathophysiology of infective endocarditis. Curr Infect Dis Rep <u>15</u>, 342-346

Kim KM, Herrera GA, Battarbee HD (1999): Role of glutaraldehyde in calcification of porcine aortic valve fibroblasts. Am J Pathol <u>154</u>, 843-852

Koolbergen DR, Hazekamp MG, de Heer E, Bruggemans EF, Huysmans HA, Dion RA, Bruijn JA (2002): The pathology of fresh and cryopreserved homograft heart valves: an analysis of forty explanted homograft valves. J Thorac Cardiovasc Surg <u>124</u>, 689-697

Lee C, Park CS, Lee CH, Kwak JG, Kim SJ, Shim WS, Song JY, Choi EY, Lee SY (2011): Durability of bioprosthetic valves in the pulmonary position: long-term follow-up of 181 implants in patients with congenital heart disease. J Thorac Cardiovasc Surg <u>142</u>, 351-358

Makkar RR, Fontana G, Jilaihawi H, Chakravarty T, Kofoed KF, De Backer O, Asch FM, Ruiz CE, Olsen NT, Trento A, et al. (2015): Possible Subclinical Leaflet Thrombosis in Bioprosthetic Aortic Valves. N Engl J Med <u>373</u>, 2015-2024

McElhinney DB, Hennesen JT (2013): The Melody(R) valve and Ensemble(R) delivery system for transcatheter pulmonary valve replacement. Ann N Y Acad Sci <u>1291</u>, 77-85

Mendelson K, Schoen FJ (2006): Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. Ann Biomed Eng <u>34</u>, 1799-1819

Misfeld M, Sievers HH (2007): Heart valve macro- and microstructure. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci <u>362</u>, 1421-1436

Nair V, Law KB, Li AY, Phillips KR, David TE, Butany J (2012): Characterizing the inflammatory reaction in explanted Medtronic Freestyle stentless porcine aortic bioprosthesis over a 6-year period. Cardiovasc Pathol <u>21</u>, 158-168

Neves J, Monteiro C, Santos R, Martins A, Ramos S, Ramos T, Calta C, Rueff J, Melo JQ (1995): Histologic and genetic assessment of explanted allograft valves. Ann Thorac Surg <u>60</u>, S141-145

Newman PJ (1997): The biology of PECAM-1. J Clin Invest 100, S25-29

Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Guyton RA, O'Gara PT, Ruiz CE, Skubas NJ, Sorajja P, et al. (2014): 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol <u>63</u>, 2438-2488

Novick WM, Anic D, Lora Solf A, Arboleda Torres M, Nino De Guzman Leon I, Reid RW, Di Sessa TG (2004): Medtronic Freestyle valve for right ventricular reconstruction in pediatric Ross operations. Ann Thorac Surg <u>77</u>, 1711-1716

Petrescu I, Egbe AC, Ionescu F, Nkomo VT, Greason KL, Pislaru C, Pellikka PA, Connolly HM, Pislaru SV (2020): Long-Term Outcomes of Anticoagulation for Bioprosthetic Valve Thrombosis. J Am Coll Cardiol <u>75</u>, 857-866

Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT (2006): Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. J Histochem Cytochem <u>54</u>, 385-395

Quentin T, Poppe A, Bar K, Sigler A, Foth R, Michel-Behnke I, Paul T, Sigler M (2009): A novel method for processing resin-embedded specimens with metal implants for immunohistochemical labelling. Acta Histochem <u>111</u>, 538-542

Ramanan S, Doll N, Boethig D, Tafer N, Horke A, Roques X, Hemmer WB, Roubertie F (2015): Pulmonary-Valve Replacement in Adults: Results With the Medtronic Freestyle Valve. Ann Thorac Surg <u>100</u>, 1047-1053

Rastelli GC, Ongley PA, Davis GD, Kirklin JW (1965): Surgical Repair for Pulmonary Valve Atresia with Coronary-Pulmonary Artery Fistula: Report of Case. Mayo Clin Proc <u>40</u>, 521-527

Richardson KC, Jarett L, Finke EH (1960): Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. Stain Technol <u>35</u>, 313-323

Ross DN (1962): Homograft replacement of the aortic valve. Lancet 2, 487

Roudaut R, Serri K, Lafitte S (2007): Thrombosis of prosthetic heart valves: diagnosis and therapeutic considerations. Heart <u>93</u>, 137-142

Sakaue T, Nakaoka H, Shikata F, Aono J, Kurata M, Uetani T, Hamaguchi M, Kojima A, Uchita S, Yasugi T, et al. (2018): Biochemical and histological evidence of deteriorated bioprosthetic valve leaflets: the accumulation of fibrinogen and plasminogen. Biol Open <u>7</u>

Schoen FJ (1995): Approach to the analysis of cardiac valve prostheses as surgical pathology or autopsy specimens. Cardiovasc Pathol <u>4</u>, 241-255

Schoen FJ, Levy RJ (2005): Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. Ann Thorac Surg <u>79</u>, 1072-1080

Sfyridis PG, Avramidis DP, Kirvassilis GV, Zavaropoulos PN, Papagiannis JK, Sarris GE (2011): The contegra(R) valved heterograft conduit for right ventricular outflow tract reconstruction: a reliable solution. Hellenic J Cardiol <u>52</u>, 501-508

Shinoka T, Miyachi H (2016): Current Status of Tissue Engineering Heart Valve. World J Pediatr Congenit Heart Surg <u>7</u>, 677-684

Siddiqui RF, Abraham JR, Butany J (2009): Bioprosthetic heart valves: modes of failure. Histopathology <u>55</u>, 135-144

Sigler M, Cleuziou J, Schubert S, Foth R, Michel-Behnke I, Scheidmann R, Jewgenow P, Paul T, Schmiady M (2019): Pathogenesis of Endocarditis in Bioprosthetic Heart Valves—Re-evaluation of the Current Concept. Thorac Cardiovasc Surg <u>67</u>, DGPK-V41

Stulak JM, Mora BN, Said SM, Schaff HV, Dearani JA (2016): Mechanical Pulmonary Valve Replacement. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu <u>19</u>, 82-89

van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, Roos-Hesselink JW (2011): Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. J Am Coll Cardiol <u>58</u>, 2241-2247

Veloso TR, Amiguet M, Rousson V, Giddey M, Vouillamoz J, Moreillon P, Entenza JM (2011): Induction of experimental endocarditis by continuous low-grade bacteremia mimicking spontaneous bacteremia in humans. Infect Immun <u>79</u>, 2006-2011

Vesely I (2005): Heart valve tissue engineering. Circ Res 97, 743-755

Warnes CA, Williams RG, Bashore TM, Child JS, Connolly HM, Dearani JA, Del Nido P, Fasules JW, Graham TP, Jr., Hijazi ZM, et al. (2008): ACC/AHA 2008 Guidelines for the Management of Adults with Congenital Heart Disease: Executive Summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of adults with congenital heart disease). Circulation <u>118</u>, 2395-2451

Yahagi K, Torii S, Ladich E, Kutys R, Romero ME, Mori H, Kolodgie FD, Popma JJ, Virmani R, Finn AV (2018): Pathology of self-expanding transcatheter aortic valves: Findings from the CoreValve US pivotal trials. Catheter Cardiovasc Interv <u>91</u>, 947-955

Yahagi K, Ladich E, Kutys R, Mori H, Svensson LG, Mack MJ, Herrmann HC, Smith CR, Leon MB, Virmani R, et al. (2017): Pathology of balloon-expandable transcatheter aortic valves. Catheter Cardiovasc Interv <u>90</u>, 1048-1057

Yamamoto Y, Yamagishi M, Maeda Y, Asada S, Hongu H, Fujita S, Yaku H (2020): Histopathologic Analysis of Explanted Polytetrafluoroethylene-Valved Pulmonary Conduits. Semin Thorac Cardiovasc Surg <u>32</u>, 990-999

Yuan SM, Mishaly D, Shinfeld A, Raanani E (2008): Right ventricular outflow tract reconstruction: valved conduit of choice and clinical outcomes. J Cardiovasc Med (Hagerstown) <u>9</u>, 327-337

Zhu AS, Xie P, Nong J, Rong MZ, Zhang MQ, Guo YM (2018): 3D N-doped carbon framework with embedded CoS nanoparticles as highly active and durable oxygen reduction and evolution electrocatalyst. Nanotechnology <u>29</u>, 465402

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Matthias Sigler für das Vertrauen und die Überlassung des interessanten Projektes, für die permanente fachliche und persönliche Unterstützung und Motivation sowie seine Geduld während der vergangenen Jahre.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiter:innen der pädiatrischen Kardiologie und Intensivmedizin und insbesondere bei den technischen Mitarbeiterinnen unseres Labors, Andrea Poppe und Karin Baer.

Ich bedanke mich bei meinen akademischen Lehrer:innen und Kolleg:innen, welche mich im Studium und in meiner Berufstätigkeit zur Wahl des Facharztes für Kinder- und Jugendmedizin mit Schwerpunkt Kinderkardiologie motiviert haben. Stellvertretend möchte ich hier Prof. Katharina Schmitt, Dr. Birgit Farahwaschy, Dr. Friederike Danne, Dr. Oliver Miera, Dr. Björn Peters, Prof. Stanislav Ovroutski, Prof. Stephan Schubert, Dr. Mustafa Yigitbasi, Prof. Felix Berger, Prof. Thomas Paul, Prof. Theodoros Tirilomis, sowie erneut Prof. Matthias Sigler danken.