

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

# **Charakterisierung der zirkulierenden Erythrozyten vor und nach TAVI**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Juliane Jokiel  
2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Tobias Zeus

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Bernhard Korbmacher

Für meine Mama

„The future belongs to those who believe in the beauty of their dreams“

Eleanor Roosevelt

Teile dieser Dissertation wurden bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht:

**MedRxiv:**

Christine Quast, Florian Bönner, Amin Polzin, Verena Veulemans, Isabella Gyamfi Poku, Ramesh Chennupati, Magdalena Nankinova, Nicole Staub, **Juliane Joki**el, Fabian Keyser, Jasmina Hoffe, Katrin Becker, Pia Leuders, Saif Zako, Ralf Erkens, Christian Jung, Ulrich Flögel, Michael Neidlin, Ulrich Steinseifer, Sven Thomas Niepmann, Sebastian Zimmer, Martin Feelisch, Tobias Zeus, Malte Kelm. (2022). Aortic valve stenosis induced occult hemoglobin release promotes endothelial dysfunction. <https://doi.org/10.1101/2022.12.01.22282891>

**Circulation:**

Quast, C., Bönner, F., Polzin, A., Veulemans, V., Chennupati, R., Gyamfi Poku, I., Pfeiler, S., Kramser, N., Nankinova, M., Staub, N., Zweck, E., **Joki**el, J., Keyser, F., Hoffe, J., Witkowski, S., Becker, K., Leuders, P., Zako, S., Erkens, R., Jung, C., ... Kelm, M. (2024). Aortic Valve Stenosis Causes Accumulation of Extracellular Hemoglobin and Systemic Endothelial Dysfunction. *Circulation*, 150(12), 952–965. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.123.064747>

## Zusammenfassung (deutsch)

**Einleitung:** Die Aortenklappenstenose (AS) ist einer der häufigsten, klinisch relevanten Herzklappenfehler der Welt und ist aufgrund ihres hohen kardiovaskulären Risikos mit einer hohen Mortalität verbunden. In einem früheren tierexperimentellen Modell wurde gezeigt, dass Mäuse mit AS eine endotheliale Dysfunktion entwickeln. Wir vermuteten daher, dass die zugrunde liegende Hypothese auch auf den Menschen übertragbar ist. Diese Hypothese besagt, dass turbulente Blutflussveränderungen in der Aorta bei AS zu einer Freisetzung von zellfreiem Hämoglobin führen. Dies verringert die NO-Bioverfügbarkeit im Organismus und verursacht eine endotheliale Dysfunktion.

**Hypothese:** Die Hypothese der folgenden Arbeit lautete, dass die turbulenten Strömungen bei AS eine Fragmentierung der Erythrozyten (RBC) verursachen, wodurch Hämoglobin ins Plasma freigesetzt wird. Dies führt zu einem erhöhten NO-Verbrauch im Blut und damit im Folgenden zu endothelialer Dysfunktion. Es wurde angenommen, dass der Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI)-Eingriff in der Lage ist die Freisetzung von freiem Hämoglobin und die Integrität der Erythrozyten wieder zu normalisieren und damit die endotheliale Dysfunktion zu vermindern.

**Methoden:** Für die Versuche der vorliegenden Promotionsarbeit wurde Blut von Patienten der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD), die an einer hochgradigen Aortenklappenstenose erkrankt sind, verwendet. Zusätzlich wurden die Patienten für die statistische Auswertung nach den zuvor definierten Variablen Alter, Geschlecht, Körpergröße und -gewicht, Raucherstatus und den Erkrankungen Diabetes, arterielle Hypertonie und Niereninsuffizienz befragt. Zur Charakterisierung der humanen RBCs und ihrer Integrität und die Frage, ob dies post-Intervention reversibel ist, wurde Blut von AS-Patienten einen Tag vor und ein- bis drei Tage nach TAVI mittels Durchflusszytometrie analysiert. Um herauszufinden, ob sich Hämoglobin-Werte bei Patienten mit AS und ohne unterscheiden, wurde bei Patienten einen Tag vor und ein bis drei Tage nach TAVI Blut abgenommen, aufbereitet und dann mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) das Hämoglobin bestimmt. Als letztes wollten wir, nachdem man eine deutliche Erhöhung des freien Hämoglobins bei AS-Patienten sehen konnte, herausfinden, wo der Ursprung dieser Hämoglobin-Erhöhung ist. Zu diesem Zweck wurde AS-Patienten daher intraprozedural an vier Entnahmestellen Blut abgenommen und die Hämoglobin- und Haptoglobin-Werte bestimmt und verglichen.

**Ergebnisse:** Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass AS-Patienten eine erhöhte Anzahl eryptotischer Zellen aufweisen, was auf eine Schädigung der Erythrozytenmembran und eine mögliche Fragmentierung hindeutet. Darüber hinaus zeigten die Experimente einen Trend zu erhöhten Werten von freiem Hämoglobin bei AS-Patienten, was mit der Hypothese vereinbar ist, dass turbulente Strömungsveränderungen bei Menschen mit Aortenstenose zur Freisetzung von zellfreiem Hämoglobin beitragen könnten. Die Untersuchung deutete außerdem auf einen Gradienten des extrazellulären Hämoglobins (eHb) entlang der Aortenklappe hin, wobei die Konzentrationen in der aufsteigenden Aorta signifikant höher waren als im linksventrikulären Ausflusstrakt. Die beobachteten Konzentrationsunterschiede stützen daher die Annahme, dass Erythrozytenschäden zumindest teilweise während der Passage durch die Klappe und/oder stromaufwärts in der supra- und subvalvulären aufsteigenden Aorta auftreten könnten. Darüber hinaus deuten sowohl der Rückgang der eryptotischen Zellen als auch die tendenzielle Abnahme des freien Hämoglobinspiegels nach TAVI darauf hin, dass die durch turbulente Strömungsgeschwindigkeiten verursachte Belastung der Erythrozyten nach Klappenersatz reversibel sein könnte und sich die Endothelfunktion dadurch unmittelbar verbessern könnte.

**Schlussfolgerung:** Zusammenfassend deuten die Befunde dieser Arbeit darauf hin, dass die Aortenklappenstenose selbst eine Akkumulation von eHb im Plasma infolge der Erythrozytenfragmentierung begünstigen könnte und dass dieser Effekt nicht allein auf begleitende Risikofaktoren oder Komorbiditäten zurückzuführen ist. Dies könnte die beobachtete endotheliale Dysfunktion und deren postinterventionelle Verbesserung erklären. Die Daten der vorliegenden Studie tragen somit zu einem besseren Verständnis der endothelialen Dysfunktion bei AS-Patienten bei und könnten angesichts der zunehmenden Indikationen und Optionen für Klappenprothesen, insbesondere bei immer jüngeren Patienten, hilfreich für die Entwicklung neuer Aortenklappenprothesen sein.

## Zusammenfassung (englisch)

**Background:** Aortic valve stenosis (AS) is one of the most common, clinically relevant heart valve defects in the world and is associated with high mortality due to its high cardiovascular risk. In a previous animal model, it was shown that mice with aortic valve stenosis exhibit endothelial dysfunction. We therefore suspected that the hypothesis demonstrated in the mouse model, in which endothelial dysfunction is based on the turbulent changes in blood flow in aortic valve stenosis and the resulting release of cell-free Hb (eHb), which leads to a reduction in NO bioavailability, is also applicable to humans.

**Hypothesis:** The hypothesis of the present study was that turbulent blood flow in AS causes fragmentation of erythrocytes (RBCs), leading to the release of hemoglobin into the plasma. This, in turn, results in increased NO consumption in the blood and consequently endothelial dysfunction. It was assumed that transcatheter aortic valve implantation (TAVI) could normalize the release of free hemoglobin and restore erythrocyte integrity, thereby reducing endothelial dysfunction.

**Methods:** For the experiments conducted in this doctoral thesis, blood samples were collected from patients with AS at the Department of Cardiology, Pulmonology, and Angiology of the university hospital Düsseldorf (UKD). For statistical analyses, patients were additionally surveyed regarding predefined variables, including age, sex, height, weight, smoking status, and the presence of diabetes, arterial hypertension, or renal insufficiency. To characterize human red blood cells (RBCs) and assess their integrity, as well as to determine whether any observed changes are reversible post-intervention, blood from AS patients was analyzed by flow cytometry one day before and one to three days after TAVI. To examine potential differences in hemoglobin levels between patients with and without AS, blood samples were collected one day before and one to three days after TAVI, processed, and hemoglobin concentrations determined using ELISA. Finally, given the significant increase in free hemoglobin observed in AS patients, the origin of this hemoglobin elevation was investigated. Blood samples were taken intraprocedural from AS patients at four distinct sampling sites, and hemoglobin and haptoglobin levels were measured and compared.

**Results:** The results of the present study demonstrate that patients with AS exhibit an increased number of eryptotic cells, indicating damage to the erythrocyte membrane and

potential fragmentation. Furthermore, the experiments showed a trend toward elevated levels of free hemoglobin in AS patients, which is consistent with the hypothesis that turbulent flow alterations in individuals with aortic stenosis may contribute to the release of cell-free hemoglobin. The analysis also suggested a gradient of extracellular hemoglobin (eHb) across the aortic valve, with significantly higher concentrations in the ascending aorta compared to the left ventricular outflow tract. These observed concentration differences therefore support the notion that erythrocyte damage may occur at least partially during passage through the valve and/or upstream in the supra-avalvular ascending aorta. Moreover, both the reduction in eryptotic cells and the trend toward decreased free hemoglobin levels after TAVI indicate that the stress on erythrocytes caused by turbulent flow velocities may be reversible following valve replacement.

**Conclusion:** In summary, the findings of this study suggest that aortic stenosis itself may promote the accumulation of eHb in the plasma due to erythrocyte fragmentation, and that this effect is not solely attributable to concomitant risk factors or comorbidities. This could explain the observed endothelial dysfunction and its post-interventional improvement. The data from the present study therefore contribute to a better understanding of endothelial dysfunction in patients with AS and may be valuable for the development of new aortic valve prostheses, particularly given the increasing indications and options for valve replacement in progressively younger patients.

## Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer
AS	Aortenklappenstenose
BH4	Tetrahydrobiopterin (BH4)
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein-2
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
EC	endothelial cell
ECM	Extracellular matrix
eHb	Zellfreies Hämoglobin
ET-1	Endothelin-1
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FAD	Flavinadenindinukleotid
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FMN	Flavinmononukleotid
FSC	Forward Scatter
GAG	Glykosaminoglykane
Hb	Hämoglobin
HbA	Adultes Hämoglobin
HbO <sub>2</sub>	Oxyhämoglobin
Hp	Haptoglobin
IL-6	Interleukin 6
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MetHb	Methämoglobin
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
NaCl	Natriumchlorid

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbicarbonat
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOS	nitric oxide synthase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anionen
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PKG	Proteinkinase G
PS	Phosphatidylserin
PVL	Paravalvuläre Leckage
RBC	red blood cell
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
sGC	Lösliche Guanylatcyclase
SMC	smooth muscle cell
SNO-Hb	S-Nitroso-Hämoglobin
SSC	Side Scatter
TAVI	Transfemoral aortic valve implantation
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
VEC	Vascular endothelial cell
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VIC	Valvular interstitial cell
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	AORTENKLAPPENSTENOSE.....	1
1.1.1	Pathophysiologie.....	3
1.1.2	Möglichkeiten der Therapie.....	8
1.1.3	TAVI.....	10
1.2	DAS KARDIOVASKULÄRE SYSTEM.....	12
1.2.1	Wichtigkeit des Endothels.....	15
1.2.2	Endotheliale Dysfunktion.....	17
1.2.3	Rolle der Erythrozyten und des Hämoglobins.....	19
1.3	ZIELE DER ARBEIT.....	26
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
2.1	MATERIAL.....	28
2.1.1	Patientenkohorte.....	28
2.1.2	Blutentnahme.....	28
2.1.3	Pufferlösungen.....	29
2.1.4	Probenvorbereitung für ELISA.....	30
2.1.5	Geräte.....	31
2.1.6	Reagenzien.....	32
2.2	METHODEN.....	33
2.2.1	FACS.....	33
2.2.2	ELISA.....	39
2.2.3	Periprozedurale Blutentnahmen.....	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>42</b>
3.1	FACS.....	42
3.2	ELISA.....	46
3.3	PERIPROZEDURALE BLUTENTNAHMEN.....	48
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>57</b>
4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	57
4.2	VERÄNDERUNGEN VON ERYTHROZYTEN UNTER SCHERBELASTUNG.....	57
4.3	HÄMOLYSE BEI AS-PATIENTEN.....	61
4.4	EINFLUSS DER TAVI AUF TRANSVALVULÄRE eHB-KONZENTRATIONEN.....	63
4.5	LIMITATIONEN DER STUDIE.....	68
4.6	AUSBLICK.....	72
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>85</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1: PATHOPHYSIOLOGIE DER AS .....	5
ABB. 2: ANALYSIERTE ASPEKTE DER STUDIE.....	27
ABB. 3: BILD DES VERWENDETEN FACS-GERÄTES.....	33
ABB. 4: PRINZIP EINES FACS .....	33
ABB. 5: EXEMPLARISCH VORGENOMMENES GATING AN EINER GEMESSENEN PROBE .....	38
ABB. 6: CD71 FÄRBUNG AUF RBCs ZEIGT AN, DASS DIE ANZAHL JUNGER ERYTHROZYTEN NACH TAVI ABNAHM (N=24 VOR BZW. NACH TAVI).....	43
ABB. 7: CD235A-POSITIVE FÄRBUNG AUF RBCs ZEIGT AN, DASS DIE STRUKTURELLE STABILITÄT NACH TAVI ERHALTEN BLEIBT (N=24 VOR BZW. NACH TAVI).....	44
ABB. 8: ANNEXIN V-POSITIVE FÄRBUNG AUF RBCs ZEIGT AN, DASS DIE ERYPTOSE NACH TAVI ABNAHM (N=24 VOR BZW. NACH TAVI).....	45
ABB. 9: ZELLFREIES HÄMOGLOBIN (N=20 VOR BZW. NACH TAVI).....	47
ABB. 10: ZELLFREIES HÄMOGLOBIN VOR UND NACH TAVI GEMESSEN AUF HÖHE DES LV, KLAPPENEBENE, AORTA ASCENDENS UND AORTA DESCENDENS (N=57 VOR BZW. N= 55 VOLLSTÄNDIG POSTIMPLANTATIV NACH TAVI).....	52
ABB. 11: HAPTOGLOBIN VOR UND NACH TAVI GEMESSEN AUF HÖHE DES LV, KLAPPENEBENE, AORTA ASCENDENS UND AORTA DESCENDENS (N=57 VOR BZW. N= 55 VOLLSTÄNDIG POSTIMPLANTATIV NACH TAVI).....	56

## TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: GERÄTE .....	31
TABELLE 2: FACS-REAGENZIEN.....	32
TABELLE 3: ELISA- REAGENZIEN .....	32
TABELLE 4: MIXED-EFFECTS-ANALYSE DES eHB VOR TAVI .....	49
TABELLE 5: MIXED-EFFECTS-ANALYSE DES eHB NACH TAVI .....	50
TABELLE 6: MIXED-EFFECTS-ANALYSE DES HP VOR TAVI.....	54
TABELLE 7: MIXED-EFFECTS-ANALYSE DES HP NACH TAVI .....	55

# 1 Einleitung

## 1.1 Aortenklappenstenose

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die häufigste Todesursache in Europa dar (WHO, 2024). Die erworbene Aortenklappenstenose (AS) zählt dabei zu den häufigsten Herzklappenerkrankungen im Erwachsenenalter. Ihre Prävalenz liegt bei Personen über 75 Jahren schätzungsweise zwischen 3 % und 5 % (Osnabrugge et al., 2013). Die AS ist definiert als hämodynamisch relevante Verengung der Aortenklappe, verursacht durch strukturelle Veränderungen der valvulären Taschen der Aortenklappe. Die Ätiologie ist in den meisten Fällen degenerativ-kalzifizierend, wobei sich diese Prozesse mit steigendem Lebensalter zunehmend manifestieren. Vor dem Hintergrund einer alternden Bevölkerung nimmt die Inzidenz der AS kontinuierlich zu, was sowohl aus klinischer als auch aus gesundheitsökonomischer Perspektive von wachsender Bedeutung ist (Rayner & Adams, 2023). Zu den sekundären Ätiologien der AS zählen kongenitale Malformationen, vorrangig die bikuspidale Aortenklappe, welche mit einer Prävalenz von 0,5–2 % die häufigste angeborene Klappenanomalie darstellt (Siu & Silversides, 2010). Aufgrund ihrer morphologischen Abweichung von der trikuspidalen Normkonfiguration ist sie mit einer erhöhten mechanischen Belastung und beschleunigter degenerativer Remodellierung assoziiert, was typischerweise bereits im mittleren Erwachsenenalter zur Klappenstenose führt (Fedak et al., 2002). Darüber hinaus stellen rheumatisch bedingte Veränderungen eine relevante Ursache dar, bei denen es infolge immunvermittelter entzündlicher Prozesse nach Streptokokkeninfektionen zu klappenassoziierten Fibrosierungen, Adhäsionen sowie progressiver Kalzifikation kommt (Passos et al., 2020). Gemäß den aktuellen Leitlinien der European Society of Cardiology (Vahanian et al., 2022) sowie der American Heart Association/American College of Cardiology (Otto et al., 2021) erfolgt die Klassifikation der AS anhand quantitativer echokardiographischer Parameter. Zentrale Kriterien sind dabei die effektive Klappenöffnungsfläche, der mittlere transvalvuläre Druckgradient und die maximale Flussgeschwindigkeit. Eine leichte Stenose liegt vor, wenn die Öffnungsfläche mehr als 1,5 cm<sup>2</sup> beträgt, der mittlere Druckgradient unter 20 mmHg liegt und die Flussgeschwindigkeit weniger als 3,0 m/s beträgt. Werte im Bereich von 1,0 bis 1,5 cm<sup>2</sup> für die Öffnungsfläche, 20 bis 40 mmHg für den mittleren Druckgradienten und 3,0 bis 4,0 m/s für die Flussgeschwindigkeit entsprechen einer moderaten Stenose. Eine schwere AS wird definiert

durch eine Öffnungsfläche unter  $1,0 \text{ cm}^2$ , einen mittleren Druckgradienten von mehr als  $40 \text{ mmHg}$  sowie eine Flussgeschwindigkeit über  $4,0 \text{ m/s}$ . In besonders ausgeprägten Fällen, mit einer Öffnungsfläche unter  $0,6 \text{ cm}^2$ , einem mittleren Druckgradienten über  $60 \text{ mmHg}$  und Flussgeschwindigkeiten über  $5,0 \text{ m/s}$ , wird von einer sehr schweren AS gesprochen. Obgleich die transthorakale Echokardiographie das diagnostische Verfahren der ersten Wahl zur nicht-invasiven Beurteilung der AS darstellt und essenziell zur Beurteilung von Klappenmorphologie, Hämodynamik und Linksherzbelastung ist, erfolgt die Diagnosestellung in etwa  $42\%$  der Fälle erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium, wenn klinische Symptome manifest werden (Chiang et al., 2016). Meist geht der Erkrankung eine lange Latenzzeit voraus, die von einer klinisch unauffälligen Aortenklappenverkalkung gekennzeichnet ist. Daran schließt sich eine dystrophische Verkalkung, also die Ablagerung von Calcium in bereits geschädigtem Klappengewebe, sowie eine ektopische Verkalkung, das heißt eine Mineralisierung an einem für Knochen untypischen Ort, an, die zusammen zu einer fortschreitenden Verengung der Aortenklappe führen und so den Blutfluss in der Systole behindern. Daraus resultiert eine chronische Druckbelastung des linken Ventrikels, die sich klinisch durch Symptome wie Synkopen, Angina pectoris und Dyspnoe bemerkbar macht und letztlich zu einer Herzinsuffizienz führt. Derzeit gibt es keine kausale medikamentöse Therapie der Aortenklappenstenose, einzig der interventionelle oder operative Aortenklappenersatz zeigte bisher einen therapeutischen Effekt (Boskovski & Gleason, 2021). Dieser wurde für Hochrisikopatienten durch den Katheter-gestützten perkutanen Aortenklappenersatz, kurz TAVI genannt, abgelöst. Da die Erkrankung lange unbemerkt voranschreitet und nur interventionell oder durch eine Operation therapiert werden kann, ist es von hoher klinischer Bedeutung die genauen Auswirkungen gestörter Strömungsverhältnisse auf den gesamten Organismus zu verstehen. Während in einem vorherigen Experiment gezeigt werden konnte, dass es bei Mäusen mit einer induzierten AS zu einer endothelialen Dysfunktion kommt (Gyamfi-Poku, 2021), ist der Einfluss von AS auf die systemische endotheliale Funktion beim Menschen in der Literatur beschrieben (Horn et al., 2015), jedoch die Veränderung und der Einfluss von freiem Hämoglobin allein durch die Strömungsveränderungen bei AS unbekannt.

### 1.1.1 Pathophysiologie

Die AS ist eine chronisch progrediente, multifaktoriell bedingte degenerative Erkrankung, die durch eine strukturelle und funktionelle Beeinträchtigung der Aortenklappe mit konsekutiver hämodynamischer Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstrakts gekennzeichnet ist (Goldberg et al., 2007). Die Aortenklappe ist eine semilunare (halbmondförmige) Taschenklappe, die den linken Ventrikel von der Aorta trennt und während der Systole den unidirektionalen Blutfluss in den Körperkreislauf gewährleistet. Anatomisch besteht sie bei der Mehrzahl der Menschen aus drei Segeln – einer rechtskoronaren, einer linkskoronaren und einer nichtkoronaren Klappe, die sich in der Aortenwurzel, genauer in den Sinus valsalvae, befinden. Im gesunden Zustand ist die Klappe weniger als einen Millimeter dick und von einer Endothelschicht aus valvulären Endothelzellen (VECs) bedeckt. Diese fungieren nicht nur als physikalische Barriere, sondern erfüllen auch zentrale Funktionen in der Homöostase, Entzündungsregulation, Thromboseschutz und mechanosensitiven Signaltransduktion (Gross & Kugel, 1931; Schoen, 2005).

Histologisch lässt sich das Interstitium der valvulären Segel in drei differenzierte Schichten gliedern: die kollagenreiche Lamina fibrosa, welche zur Aorta hin orientiert ist, die glycosaminoglykanreiche Lamina spongiosa mit ihrer dämpfenden Funktion, sowie die elastinreiche Lamina ventricularis auf der ventrikulären Seite. Diese drei strukturellen Kompartimente gewährleisten synergistisch die erforderliche mechanische Stabilität und Flexibilität, die für den physiologischen Öffnungs- und Schließmechanismus der Klappe essenziell sind (Hinton & Yutzey, 2011; Vesely, 2005). Die dominierende Zellpopulation des Klappengewebes bilden die valvulären interstitiellen Zellen (valvular interstitial cells, VICs), welche innerhalb der extrazellulären Matrix (ECM) aller drei Schichten eine wesentliche Rolle bei der Homöostase und Gewebereparatur spielen (Rajamannan et al., 2005).

Die ECM dieser Schichten weist eine komplexe Zusammensetzung auf: Die Lamina fibrosa bildet die fibröse Basis der Klappensegel und besteht überwiegend aus dicht gepackten, parallel angeordneten Typ-I-Kollagenfasern. Diese Anordnung verleiht der Lamina fibrosa eine hohe Zugfestigkeit und steife mechanische Stabilität, wodurch sie primär für die Widerstandsfähigkeit gegenüber den während des systolischen Blutauswurfs auf die Klappe einwirkenden hohen Zug- und Scherkräften verantwortlich ist. Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften fungiert die Lamina fibrosa als tragende Komponente, die die

Formstabilität der Klappe gewährleistet und gleichzeitig einer Deformation unter Belastung entgegenwirkt (Sacks & Yoganathan, 2007).

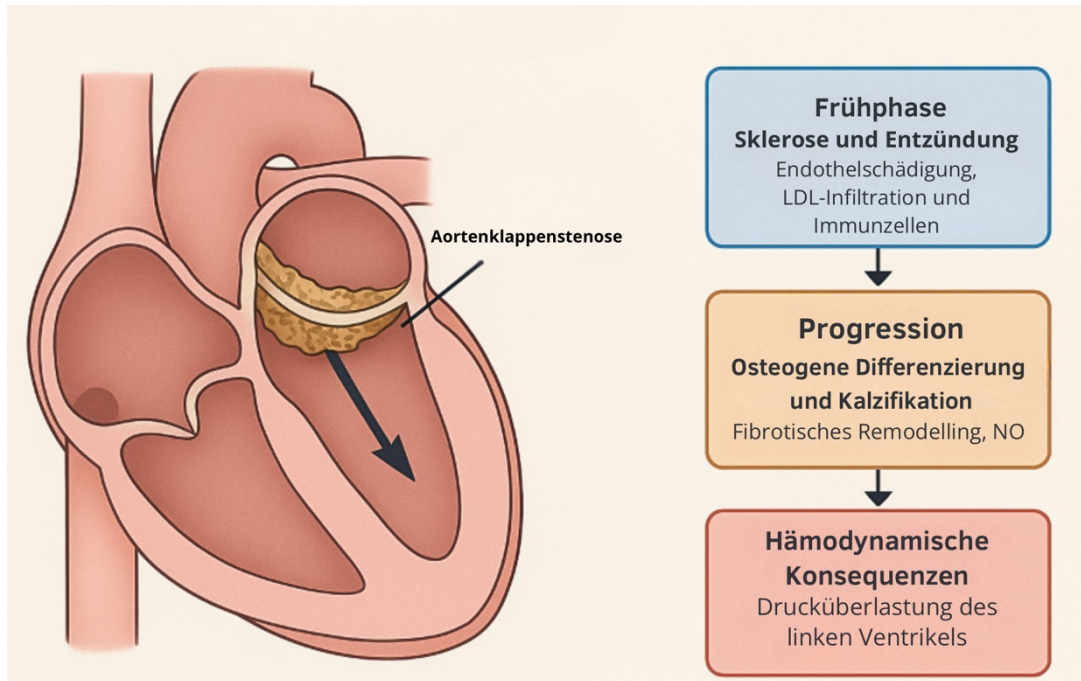
Die Lamina ventricularis, die dem Ventrikel zugewandt ist, zeichnet sich durch eine hohe Elastinkonzentration aus, deren Fasern radial zur Klappenöffnung ausgerichtet sind. Diese Elastinfasern verleihen der Ventricularis eine ausgeprägte Elastizität und Flexibilität, welche essenziell für die dynamischen Verformungen der Klappe während des Öffnungs- und Schließzyklus sind. Die Elastinmatrix ermöglicht eine reversible Dehnung und Rückstellung, wodurch die mechanischen Spannungen, die beim schnellen Umschlag vom geschlossenen zum geöffneten Zustand auftreten, effektiv abgefedert und gleichmäßig verteilt werden. Darüber hinaus trägt die Ventricularis durch ihre biomechanischen Eigenschaften zur Minimierung der Ermüdungsschäden im Klappengewebe bei und unterstützt so die langfristige Funktionalität der Klappe (Rajamannan et al., 2011; Sacks et al., 2009; Vesely, 1998).

Zwischen den beiden Schichten liegt als mittlere Schicht die Lamina spongiosa. Sie zeichnet sich durch eine hohe Konzentration an Glykosaminoglykanen (GAGs) aus, vornehmlich Hyaluronsäure sowie Chondroitin- und Dermatansulfaten. Diese hydrophilen Makromoleküle binden Wasser und bilden eine gelartige, viskoelastische Matrix (Simionescu et al., 2003). Diese Matrix wirkt biomechanisch als Dämpfer mechanischer Scherkräfte, reduziert die Reibung zwischen den äußeren Schichten und gewährleistet eine homogene Verteilung der Dehnungskräfte während des Klappenzyklus (Tseng & Grande-Allen, 2011). Somit trägt die Spongiosa entscheidend zur strukturellen Integrität bei und schützt die Lamina fibrosa und ventricularis vor mechanischer Überlastung und degenerativen Prozessen (Sacks & Yoganathan, 2007).

Lange Zeit wurde die AS überwiegend als eine passive, degenerative Alterserscheinung betrachtet, bei der es im Verlauf des natürlichen Alterungsprozesses zu einer mechanischen Abnutzung der Klappenstruktur und einer fortschreitenden Kalziumeinlagerung innerhalb der Klappensegel kommt. Diese Sichtweise wurde insbesondere durch die histopathologischen Befunde gestützt, die strukturelle Veränderungen wie Fibrose und dystrophe Verkalkungen zeigten (Mönckeberg, 1904). Im Zuge der molekularbiologischen und bildgebenden Weiterentwicklungen konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei der AS nicht um einen rein degenerativen, sondern vielmehr um einen hochkomplexen, aktiven, streng regulierten biologischen Prozess handelt, der durch komplexe

Wechselwirkungen aus mechanischen, entzündlichen und osteogenen Signalkaskaden charakterisiert ist (Otto & Prendergast, 2014; Pawade et al., 2015).

Die moderne Pathophysiologie der Aortenklappenstenose lässt sich in drei klar definierte, jedoch überlappende Phasen gliedern:



**Abb. 1: Pathophysiologie der AS**

### *1. Frühphase: Sklerose und Entzündung*

Die Erkrankung beginnt häufig mit einer asymptomatischen Aortenklappensklerose, definiert als strukturelle Verdickung der Klappensegel ohne hämodynamisch relevante Flussobstruktion. In Regionen hoher mechanischer Belastung insbesondere auf der aortalen, nichtkoronaren Seite der Klappensegel führen chronische mechanische Beanspruchungen durch erhöhte Scherkräfte, Turbulenzen und zyklische Dehnungen zu einer endothelialen Schädigung (Butcher et al., 2004; Chatzizisis et al., 2007). Die daraus resultierende erhöhte Permeabilität des Endothels begünstigt die Infiltration von oxidierten Lipoproteinen vor allem LDL in die subendotheliale Matrix. Diese Lipidakkumulation aktiviert proinflammatorische Signalwege, welche die Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten fördern (Goody et al., 2020). Die infiltrierenden Immunzellen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$ , die die lokale Entzündungsreaktion und VIC-Aktivierung verstärken (Mathieu & Boulanger, 2014; Otto et al., 1994).

## ***2. Progression: Osteogene Differenzierung und Kalzifikation***

Im weiteren Verlauf kommt es zu einer fibrotischen Remodellierung der extrazellulären Matrix. Gleichzeitig differenzieren VICs unter dem Einfluss der Entzündung in myofibroblastische bzw. osteoblastenähnliche Zelltypen. Diese exprimieren osteogene Marker wie Runx-related transcription factor 2 (Runx2), Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) und Osteopontin, die die Matrixverkalkung vorantreiben (Coté et al., 2013; Mohler et al., 2001). Die Kalzifikation verläuft entlang der ECM, insbesondere der Kollagenfasern der Lamina fibrosa, und führt zur Ablagerung hydroxylapatitähnlicher Kalzifikationen in der Spongiosa. (Pawade et al., 2015). Diese pathologischen Veränderungen ähneln der Atherosklerose, zeichnen sich jedoch durch eine stärkere osteogene Komponente aus.

Ein weiterer pathophysiologischer Aspekt betrifft die Dysregulation vaskulärer inhibitorischer Mechanismen, insbesondere die verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO), die auf eine gestörte Endothelfunktion zurückzuführen ist. NO wird im gesunden Endothel durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet und wirkt vasodilatatorisch, antientzündlich, antithrombotisch sowie antiproliferativ. Zudem hemmt NO direkt die osteogene Differenzierung von VICs und damit die Verkalkung der Klappensegel (Yuyun et al., 2018).

In der frühen Phase der Aortenklappenverkalkung ist die endotheliale NO-Produktion reduziert, was teilweise durch einen erhöhten oxidativen Stress erklärbar ist. Dabei kommt es zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ), welche NO zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) inaktivieren. Diese Reaktion führt nicht nur zur Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit, sondern auch zu zusätzlicher nitrosativ-oxidativer Zellschädigung (Miller et al., 2008; Richards et al., 2013).

Zudem trägt oxidativer Stress zum sogenannten eNOS-Uncoupling bei. Das eNOS-Uncoupling ist ein pathologischer Zustand, bei dem eNOS anstelle von NO vermehrt Superoxid produziert, wodurch ein Teufelskreis aus ROS-Produktion, endothelialer Dysfunktion und proverkalkenden Bedingungen entsteht (Förstermann & Sessa, 2012). Diese Reduktion von NO sowie die vermehrte Bildung freier Radikale fördern eine inflammatorische Mikroumgebung, die wiederum die osteogene Aktivierung der VICs über BMP-2, Runx2 und Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwege begünstigt (Byon et al., 2008; Towler, 2013).

Damit stellt der oxidative Stress nicht nur einen sekundären Schaden dar, sondern fungiert als aktiver Verstärker des degenerativen Umbauprozesses der Aortenklappe, der funktionell mit einer Einschränkung der Klappenöffnung und einem erhöhten systolischen Druckgradienten einhergeht (Greenberg et al., 2022). Zusammenfassend verringert die progressive Kalzifikation die Klappenflexibilität, reduziert die effektive Öffnungsfläche der Aortenklappe und erzeugt einen systolischen Druckgradienten zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta. Dieser Gradient ist umso höher, je kleiner die Klappenöffnungsfläche und je größer das Schlagvolumen ist.

### *3. Hämodynamische Konsequenzen: Drucküberlastung des linken Ventrikels*

Als Antwort auf die erhöhte Nachlast entwickelt sich eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie, die zunächst der Normalisierung der Wandspannung dient. Im weiteren Verlauf resultiert jedoch eine diastolische Dysfunktion mit verminderter Dehnbarkeit des Ventrikels und erhöhtem enddiastolischen Füllungsdruck. Aufgrund des gesteigerten myokardialen Sauerstoffbedarfs und der reduzierten Koronarperfusion kann es schließlich zur myokardialen Ischämie und systolischen Kontraktionsminderung kommen (Badiani et al., 2016). Sobald das terminale Stadium der Aortenklappenstenose mit dem Übergang in eine symptomatische Herzinsuffizienz erreicht ist, verschlechtert sich die Prognose signifikant und die Sterblichkeitsrate steigt erheblich an.

### 1.1.2 Möglichkeiten der Therapie

Angesichts der ausgeprägten klinischen Symptomlast sowie der erheblichen gesundheitsökonomischen Relevanz der Aortenklappenstenose kommt der Entwicklung wirksamer präventiver und therapeutischer Strategien eine zentrale Bedeutung zu. Trotz der Identifikation mehrerer klinischer und genetischer Risikofaktoren, die mit dem Auftreten und Fortschreiten der Aortenklappenstenose assoziiert sind, fehlt bislang ein validiertes und evidenzbasiertes Konzept zur Primär- oder Sekundärprävention. In den vergangenen Jahren wurden mehrere pharmakologische Ansätze zur medikamentösen Modulation der Krankheitsprogression untersucht, wobei sich die Forschung im Wesentlichen auf drei therapeutische Ansätze konzentrierte: Statine, Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE-Hemmer) sowie Bisphosphonate.

Aufgrund der pathohistologischen Ähnlichkeit zwischen initialen arteriosklerotischen Läsionen und den frühesten Läsionen einer degenerativen Aortenklappenerkrankung wurde anfänglich die Hypothese formuliert, dass Statine durch ihre lipidsenkenden und pleiotropen Effekte helfen könnten, das Fortschreiten der Aortenklappenstenose zu verzögern. Diese Annahme wurde durch präklinische Daten gestützt, blieb jedoch in klinischen Studien bislang unbelegt. Weder kleinere Studien wie SALTIRE (Cowell et al., 2005) noch groß angelegte randomisierte kontrollierte Studien wie SEAS (Rossebø et al., 2008) und ASTRONOMER (Chan et al., 2010) konnten einen signifikanten Einfluss zwischen den Cholesterinspiegeln und dem Fortschreiten der Aortenklappenstenose nachweisen. Auch eine spätere umfassende Post-Hoc-Analyse großer Statinstudien (TNT, IDEAL, SPARCL) kam zu dem Ergebnis, dass lipidsenkende Therapien weder die Inzidenz noch die Progression der AS wirksam beeinflussen (Arsenault et al., 2014).

Ein weiterer pharmakologischer Ansatz zur potenziellen Modulation des Krankheitsverlaufs der AS basiert auf der therapeutischen Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Arterielle Hypertonie stellt nicht nur eine häufige Komorbidität bei Patienten mit AS dar, sondern fördert infolge des erhöhten systemischen Drucks und der damit einhergehenden hämodynamischen Scherkräfte die endothelialen Mikroschädigungen und damit die Progression der valvulären Pathologie (Liakos et al., 2017). Vor diesem Hintergrund wurde postuliert, dass eine antihypertensive Therapie, insbesondere durch Hemmung des RAAS, das Fortschreiten der AS günstig beeinflussen könnte. Die Datenlage hierzu ist jedoch heterogen: Während einige Studien keinen signifikanten hämodynamischen Effekt einer ACE-Hemmer-Therapie nachweisen konnten

(Helske-Suihko et al., 2015), deuten andere auf potenzielle Vorteile hin, darunter eine Verzögerung der hämodynamischen Progression sowie eine Reduktion des Risikos für einen Aortenklappenersatz (Andersson & Abdulla, 2016). Dennoch ist anzumerken, dass sich ein Großteil der verfügbaren Evidenz auf die Anwendung von ACE-Hemmern nach erfolgtem operativem oder transkathetergestütztem Aortenklappenersatz fokussiert (Takagi et al., 2021). In Anbetracht dieser Einschränkungen lässt sich derzeit keine eindeutige Empfehlung zur primären medikamentösen Therapie der Aortenklappenstenose mit ACE-Hemmern ableiten.

Angesichts der nachgewiesenen osteoblastischen Differenzierung interstitieller Klappen-zellen als zentraler pathophysiologischer Mechanismus der valvulären Kalzifikation bei Aortenklappenstenose rückten Bisphosphonate, ursprünglich zur Behandlung der Osteoporose entwickelt, als potenzielle pharmakologische Interventionsmöglichkeit in den Fokus. Trotz der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen, die eine pharmakologische Intervention plausibel erscheinen lassen, konnte jedoch in klinischen Studien kein signifikanter Einfluss von Bisphosphonaten wie Alendronsäure oder des RANKL-Inhibitors Denosumab auf die Progression der Aortenklappenstenose nachgewiesen werden (Pawade et al., 2021).

Zusammenfassend besteht derzeit keine evidenzbasierte medikamentöse Therapieoption zur Modifikation des Krankheitsverlaufs der Aortenklappenstenose. Einzig der operative oder interventionelle Aortenklappenersatz konnte bislang einen gesicherten therapeutischen Nutzen zeigen. Insbesondere für Hochrisikopatienten hat sich der kathetergestützte perkutane Aortenklappenersatz (TAVI) als effektive Alternative zum chirurgischen Vorgehen etabliert (Leon et al., 2010).

### 1.1.3 TAVI

Transcatheter Aortic Valve Implantation, zu deutsch Kathetergestützter perkutaner Aortenklappenersatz ist ein erstmals von Alain Cribier im Jahre 2002 genutztes minimalinvasives Verfahren zur Behandlung der hochgradigen, symptomatischen AS, das sich dadurch auszeichnet, dass es keiner Sternotomie oder Herzstillstandes mittels Herz-Lungen-Maschine für den Aortenklappenersatz bedarf (Cribier et al., 2002). Ursprünglich wurde es daher für Patienten mit hohem Operationsrisiko, ältere Patienten über 75 Jahre, Betroffene mit vorausgegangener Herzoperation und Betroffene mit signifikanten Komorbiditäten entwickelt, für die ein herkömmlicher chirurgischer Eingriff mit einem unverhältnismäßig hohen perioperativen Risiko einherging (Patel et al., 2009; Reynolds et al., 2011). Die Prothese wird in der Regel transfemorale über die Arteria femoralis zum Herzen vorgebracht und an der Position der erkrankten Aortenklappe implantiert. Alternativ kommen bei anatomischen oder vaskulären Kontraindikationen transapikale, transaortale, transaxilläre oder transkarotidale Zugangswege zum Einsatz. Der transfemorale Zugang ist jedoch mit der geringsten Invasivität und der besten Patientenverträglichkeit assoziiert und wird daher in über 90 % der Fälle bevorzugt (Banks et al., 2020; Madigan & Atoui, 2018). Der Eingriff erfolgt zumeist in Lokalanästhesie mit oder ohne Sedierung unter fluoroskopischer Bildgebung (Oguri et al., 2014). Nach Punktion der Arteria femoralis erfolgt der Zugang mittels Seldinger-Technik, gefolgt von der Einführung eines Schleusensystems (Sheath), durch das der klappentragende Katheter retrograd zur nativen Aortenklappe vorgeschoben wird. Dort erfolgt die Implantation der biologischen Prothese, die in einem selbstexpandierenden oder ballonexpandierenden Stentgerüst verankert ist. Nach Positionierung an der nativen, verkalkten Aortenklappe erfolgt die Implantation durch Freisetzung der Prothese, wobei die native, stenosierte Klappe durch radiale Kräfte der neuen Klappe gegen die Aortenwand gedrückt wird und in situ verbleibt (Salinas et al., 2011; Smith et al., 2011). Im Unterschied zum chirurgischen Ersatz, bei dem auch mechanische Prothesen verwendet werden, kommen bei der TAVI ausschließlich biologische Klappen zum Einsatz. Mechanische Klappen, die aufgrund ihrer starren Struktur nicht über Katheter applizierbar sind, zeichnen sich zwar durch eine längere Haltbarkeit aus, haben jedoch durch ihre metallische Oberfläche eine gerinnungsaktivierende Wirkung und damit ein erhöhtes Thrombose- beziehungsweise Thromboembolierisiko (Chesebro et al., 1986). Um Komplikationen wie einen Schlaganfall zu vermeiden, muss daher mittels gerinnungshemmender Medikamente lebenslang antikoaguliert werden. Biologische Klappen hingegen, meist aus porcinen oder bovinen

Perikardgewebe gefertigt, wie sie bei der TAVI verwendet werden, sind weniger thrombogen und benötigen keine dauerhafte Antikoagulation. Sie haben allerdings auch eine begrenzte Haltbarkeit von zehn bis zwanzig Jahren und neigen insbesondere bei jüngeren Patienten schnell zur strukturellen Klappendegeneration. Die Langzeitdaten hinsichtlich Haltbarkeit und strukturellem Klappenversagen im Vergleich zu chirurgischen Bioprothesen werden aktuell noch durch laufende Studien ergänzt, wobei erste Ergebnisse eine gute Funktionalität auch über mehrere Jahre zeigen (Johnston et al., 2015). Die TAVI geht mit zahlreichen Vorteilen einher, darunter eine geringere Invasivität, eine reduzierte Hospitalisierungsdauer sowie eine schnellere postoperative Rekonvaleszenz (Burrage et al., 2017; Talanas et al., 2024). Trotz dieser Vorteile ist das Verfahren mit spezifischen Komplikationen assoziiert, insbesondere paravalvulären Leckagen (PVL), vaskulären Komplikationen an der Punktionsstelle sowie einem erhöhten Risiko für Schrittmacherpflichtigkeit (Masson et al., 2009). Eine der häufigsten ist die Störung des kardialen Reizleitungssystems, insbesondere der atrioventrikulären Überleitung, bedingt durch die enge anatomische Lagebeziehung der Aortenklappe zum His-Bündel und dem linken Tawara-Schenkel. Dies kann zu höhergradigen AV-Blockierungen führen, die die permanente Implantation eines Herzschrittmachers erforderlich machen. Zur Überwachung solcher Komplikationen verbleibt ein temporäres Schrittmachersystem postinterventionell in der Regel über einen Zeitraum von mindestens 24 bis 48 Stunden (Dawkins et al., 2008). Eine weitere Komplikation der TAVI ist das Auftreten von PVL, also Undichtigkeiten zwischen Prothese und nativem Klappenannulus, die durch unvollständige Apposition oder ungleichmäßige Verkalkung bedingt sein können. Moderate bis schwere PVL sind mit einer erhöhten Mortalität assoziiert und bedürfen gegebenenfalls einer Nachdilatation oder Reintervention (Kodali et al., 2015). Abschließend lässt sich festhalten, dass die TAVI sich in den letzten beiden Jahrzehnten von einer ursprünglich für Hochrisikopatienten reservierten Intervention zu einer evidenzbasierten Standardtherapie bei geeigneter Patientenselektion entwickelt hat. Trotz spezifischer prozeduraler Herausforderungen und laufender Studien zur Langzeithaltbarkeit zeigt das Verfahren bereits heute eine hohe klinische Effektivität und prognostische Relevanz. Die stetige Weiterentwicklung von Prothesendesign, Bildgebung und periinterventionellem Management dürfte die Sicherheit und Nachhaltigkeit des Verfahrens in den kommenden Jahren weiter optimieren.

## 1.2 Das kardiovaskuläre System

Das kardiovaskuläre System des menschlichen Körpers ist sowohl zuständig für den Transport von Blut als auch von Sauerstoff, Kohlendioxid, Nährstoffen und Abfallprodukten. Es besteht aus dem Herzen und einem verzweigten Röhrensystem, zu dem Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen zählen. Die Integrität seiner Komponenten ist essenziell für seine lebenswichtige Aufgabe, des sicheren und verlustfreien Transports von Blut. Die genaue Zusammensetzung dieser Gefäßschichten variiert in Abhängigkeit von der konkreten Funktion des Gefäßes. Trotz orts- und organspezifischer Variabilität liegt den Gefäßen ein allgemeingültiger Aufbau aus drei Schichten zugrunde:

### **Tunica Interna**

Die Tunica interna, auch als Intima bezeichnet, stellt die innerste Schicht der Gefäßwand dar und grenzt direkt an das Gefäßlumen, in dem das Blut zirkuliert. Sie besteht primär aus einer einschichtigen Lage von Endothelzellen, welche auf einer Basalmembran ruhen und durch die darunterliegende Lamina subendothelialis, eine dünne Schicht aus lockerem Bindegewebe, gestützt werden. Das Endothel bildet eine hochspezialisierte, selektive Barriere zwischen dem Blutstrom und dem umliegenden Gewebe und spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Stoff- und Zelltransports sowie der Gefäßpermeabilität. Es gewährleistet die kontrollierte Passage von Wasser, Ionen, Nährstoffen und Immunzellen und verhindert gleichzeitig das unkontrollierte Austreten von Blutzellen und Makromolekülen in das Interstitium (Aird, 2004; Pober & Sessa, 2007).

Die Integrität der Tunica interna wird maßgeblich durch spezialisierte Zell-Zell-Verbindungen bestimmt. Hierzu zählen Tight Junctions, welche den parazellulären Transport einschränken und die Dichtigkeit der Barriere erhöhen, Adherens Junctions, die für mechanische Stabilität und Zellkohäsion sorgen, sowie Gap Junctions, die den direkten interzellulären Austausch von Signalmolekülen und Ionen ermöglichen (Bazzoni & Dejana, 2004; Dejana et al., 2008). Die morphologische Vielfalt des Endothels spiegelt sich in seiner funktionellen Spezialisierung wider: Je nach Organ und Gefäßtyp wird zwischen kontinuierlichem, fenestriertem und diskontinuierlichem Endothel unterschieden. Während das kontinuierliche Endothel eine nahezu undurchlässige Schicht bildet, die in den meisten Blutgefäßen vorkommt, besitzt das fenestrierte Endothel kleine Poren, die einen schnellen Stoffaustausch erlauben und typischerweise in Organen mit hohem Stoffwechselbedarf wie den Nieren zu finden sind. Das diskontinuierliche Endothel weist größere

Lücken auf, die insbesondere in der Leber, Milz und im Knochenmark den Austausch großer Moleküle und Zellen ermöglichen (Aird, 2007).

### **Tunica Media**

Die optisch markanteste Schicht der Gefäßwand ist die Tunica media, insbesondere in größeren Arterien, wo sie hohen Druckbelastungen standhalten und gleichzeitig Elastizität bewahren muss. Die dominierenden Zellen der Tunica media sind die sogenannten glatten Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs), welche von einer Basalmembran sowie einer komplexen ECM umgeben sind. Diese Matrix besteht unter anderem aus Proteoglykanen, Elastin, Kollagen und weiteren Bindegewebsbestandteilen (Davis & Senger, 2005). Die SMCs spielen eine zentrale Rolle bei der Synthese von Elastin, dessen Organisation zu elastischen Fasern sowie bei der Produktion von Kollagenfaserschichten und einer proteoglykanreichen ECM. Diese strukturellen Komponenten sind zwischen Lamellen aus elastischen Fasern angeordnet (Owens, 1995; Wagenseil & Mecham, 2009). Analog zu den Endothelzellen (ECs) zeigen auch die SMCs eine erhebliche Heterogenität innerhalb des Gefäßsystems. Die Dehnbarkeit und Kontraktilität der Aortenwand, die sich während der Pulsation als Antwort auf das Herzzeitvolumen und die systolischen sowie diastolischen Druckveränderungen manifestiert, wird maßgeblich durch Elastin und die elastischen Fasern ermöglicht (Shadwick, 1999). Dabei steigt die Wandspannung proportional mit der Dehnung der elastischen Fasern an. Diese können sich um ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Länge ausdehnen und bieten so dem pulsierenden Blutdruck einen elastischen Widerstand, ohne erhebliche biomechanische Energie aufzuwenden. In der Tunica media mittelgroßer Arterien ist hingegen der Anteil an Elastin und elastischen Fasern reduziert, wohingegen die Dichte an glatten Muskelzellen und Kollagenfasern zunimmt, da diese Gefäße hauptsächlich der Verteilung des Blutes zu den Organen dienen (Humphrey, 2002; Humphrey, 2008).

### **Tunica Externa**

Die Tunica externa, auch als Adventitia bezeichnet, stellt die äußerste Schicht der Gefäßwand dar und besteht überwiegend aus lockerem Bindegewebe, das sowohl Kollagenfasern als auch elastische Fasern enthält. Diese Schicht verleiht den Blutgefäßen mechanische Stabilität, schützt sie vor äußeren Einflüssen und gewährleistet ihre Verankerung im umgebenden Gewebe. Bei größeren Gefäßen sind in der Tunica externa zudem kleine Gefäße, die sogenannten Vasa vasorum, vorhanden, welche die äußeren Schichten der

Gefäßwand mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (Mulligan-Kehoe, 2010). Funktional ist die Tunica externa entscheidend für die Aufrechterhaltung der Form und Festigkeit der Blutgefäße und trägt wesentlich dazu bei, ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Belastungen und Druckeinwirkungen sicherzustellen (Stenmark et al., 2013).

Obwohl alle Schichten der Gefäßwand – die Tunica externa, Tunica media und Tunica interna – wesentlich zum strukturellen Aufbau und zur mechanischen Stabilität der Blutgefäße beitragen, nimmt die Tunica interna eine besondere Stellung ein, da sie durch ihre dünne, einschichtige Auskleidung mit Endothelzellen eine zentrale Funktion in der Gefäßphysiologie übernimmt.

### 1.2.1 Wichtigkeit des Endothels

Das Endothel, eine einschichtige Lage spezialisierter Zellen, die die Innenwand aller Blut- und Lymphgefäße auskleidet, spielt eine zentrale Rolle im Herz-Kreislauf-System und ist für dessen Funktion unerlässlich. Die vielfältigen physiologischen Funktionen des Endothels wurden bereits in den frühen Forschungsarbeiten erkannt. Es erfüllt neben seiner klassischen Barrierefunktion eine Vielzahl weiterer Schlüsselaufgaben, darunter die Regulation der Gefäßpermeabilität, entzündungshemmende Wirkmechanismen, Angiogenese, die Steuerung der Hämostase sowie die dynamische Regulation des Gefäßtonus (Cines et al., 1998).

Als semipermeable Grenzschicht fungiert das Endothel als selektive Barriere zwischen dem zirkulierenden Blut und dem umgebenden Gewebe. Es kontrolliert den Austausch von Wasser, Ionen, Nährstoffen, Abfallprodukten sowie Immunzellen und sorgt gleichzeitig dafür, dass Blutbestandteile nicht unkontrolliert ins Interstitium übertreten (Malik et al., 1989). Diese Barrierefunktion wird sowohl durch universelle Mechanismen wie Tight Junctions und Adherens Junctions als auch durch spezifische Strukturen wie kontinuierliche, fenestrierte oder diskontinuierliche Endothelien gewährleistet, je nach Funktion des jeweiligen Organsystems (Aird, 2012).

Darüber hinaus spielt das Endothel eine zentrale Rolle bei der Angiogenese – der Neubildung von Blutgefäßen aus bestehenden Gefäßen. Über die Expression von Tyrosinkinaserzeptoren wie Tie-2, welche mit Angiopoietinen interagieren, sowie durch Reaktion auf proangiogene Faktoren wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), steuert es diesen Prozess, der besonders bei Geweberegeneration, Wundheilung und Tumorwachstum von Bedeutung ist (Maisonpierre et al., 1997).

In immunologischer Hinsicht wirkt das Endothel unter physiologischen Bedingungen antiinflammatorisch, indem es die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand unterdrückt. Im Falle von Gewebeschädigungen oder entzündlichen Reizen ist es jedoch in der Lage, proinflammatorische Signalstoffe wie Zytokine und Chemokine zu sezernieren, um eine gezielte Immunzellrekrutierung zu initiieren. Hierbei spielen die Weibel-Palade-Körper, sekretorische Granula endothelialer Zellen, eine Schlüsselrolle, da sie die schnelle Freisetzung von von-Willebrand-Faktor (vWF) und P-Selectin ermöglichen. Als Reaktion auf Thrombin sowie weitere Agonisten der endothelialen Oberflächenrezeptoren wie Histamin (H1-Rezeptor), Bradykinin (B2-Rezeptor), ATP (P2Y-Rezeptor) oder

Angiotensin II (AT1-Rezeptor) kommt es zur schnellen Exozytose von Weibel-Palade-Körpern. Dabei werden die Adhäsionsproteine vWF und P-Selectin gezielt an der Zelloberfläche von Endothelzellen in Bereichen mit Gefäßverletzungen und Entzündungen exprimiert (Lipowsky, 2012; Wagner et al., 1982).

Eine weitere essenzielle Funktion des Endothels besteht in der Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Verhinderung pathologischer Blutgerinnung. Dies geschieht vor allem über die Freisetzung antithrombotischer Moleküle wie Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO), welche nicht nur gerinnungshemmend, sondern auch gefäßerweiternd wirken. Das intakte Endothel ist somit ein zentraler Akteur in der Aufrechterhaltung eines flüssigen Blutstroms und verhindert die spontane Aktivierung des Gerinnungssystems (Radomski et al., 1987; Schölkens et al., 1979).

Die wohl bedeutendste Aufgabe des Endothels ist die Regulation des Gefäßtonus, also der Weite und Elastizität der Blutgefäße (Palmer et al., 1987). Diese Regulation erfolgt durch die kontrollierte Freisetzung vasoaktiver Substanzen. Vasodilatoren wie NO und PGI<sub>2</sub> fördern die Entspannung der glatten Gefäßmuskulatur und senken so den Blutdruck (Mitchell et al., 2008), während Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 (ET-1) oder der Plättchenaktivierende Faktor (PAF) eine Gefäßverengung auslösen. Auf diese Weise passt das Endothel den Blutfluss kontinuierlich an die metabolischen Bedürfnisse der Organe und die hämodynamischen Bedingungen an (Thorin & Clozel, 2010).

Die enorme Bandbreite an Funktionen, die das Endothel erfüllt, unterstreicht seine Schlüsselrolle als zentraler Regulator der Gefäßgesundheit. Wird dieses empfindliche Gleichgewicht gestört, kann das weitreichende Konsequenzen haben.

Bei einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen, darunter Arteriosklerose, Herzinsuffizienz, Hypertonie und Aortenklappenstenose, spielt die endotheliale Dysfunktion eine zentrale Rolle. Sie beschreibt einen pathologischen Zustand, in dem das Endothel seine schützenden, regulierenden und entzündungshemmenden Aufgaben nicht mehr in vollem Umfang erfüllen kann. Besonders kritisch ist die gestörte Produktion und verminderte Bioverfügbarkeit von NO. Ein Defizit an NO führt nicht nur zu einer übermäßigen Vasokonstriktion, sondern begünstigt auch die Entstehung von Entzündungen und thrombotischen Prozessen. Dadurch wird die Gefäßhomöostase erheblich beeinträchtigt – mit negativen Auswirkungen auf das gesamte kardiovaskuläre System.

### 1.2.2 Endotheliale Dysfunktion

Die Endotheliale Dysfunktion bezieht sich auf eine Störung der normalen Funktion des Endothels, der innersten Zellschicht von Blutgefäßen. Das Endothel spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Gefäßtonus, der Steuerung des Blutflusses, der Modulation der Blutgerinnung sowie der Kontrolle inflammatorischer Prozesse. Eine Beeinträchtigung dieser Funktion kann daher schwerwiegende Auswirkungen auf die kardiovaskuläre Gesundheit haben. Daher sind die Prävention und Therapie der endothelialen Dysfunktion entscheidend für die Reduktion des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen. Da die Aortenklappenstenose eng mit Arteriosklerose und weiteren kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist (Pohle et al., 2001), liegt die Vermutung nahe, dass die pathologischen Veränderungen nicht auf die Klappe beschränkt sind, sondern auch eine endotheliale Dysfunktion eine mögliche Rolle dabei spielt.

Die bahnbrechenden Experimente von Furchgott und Zawadzki (Furchgott & Zawadzki, 1980) wiesen erstmals einen aus dem Endothel stammenden Relaxationsfaktor nach, der sich später als NO herausstellte. Die verminderte Synthese, Freisetzung und/oder Aktivität von aus dem Endothel stammendem NO ist dabei das früheste und eines der wichtigsten Ereignisse, das eine endotheliale Dysfunktion kennzeichnet (Liao, 2013).

NO wird aus L-Arginin durch die Wirkung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) unter Mitwirkung von Cofaktoren wie Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), Flavinmononukleotid (FMN), Flavinaadenindinukleotid (FAD) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) synthetisiert. Dabei ist die Verfügbarkeit dieser Cofaktoren entscheidend. Ein Mangel an BH<sub>4</sub> führt beispielsweise zum „eNOS-Uncoupling“, bei dem statt NO vermehrt ROS produziert werden, was die endotheliale Dysfunktion weiter verschärft. NO diffundiert zu den glatten Muskelzellen der Blutgefäße, wo es die lösliche Guanylatcylase (sGC) aktiviert. Dies führt zur Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), welche die Proteinkinase G (PKG) aktiviert, die wiederum über mehrere Signalwege zur Ca<sup>2+</sup> Ausschüttung aus dem Zytosol führt. Dadurch resultiert nachfolgend eine Relaxation der glatten Muskelzellen, welche eine Vasodilatation bewirkt (Ignarro, 1996; Mombouli & Vanhoutte, 1999; Rosselli et al., 1998).

Ein wichtiger physiologischer Stimulus für die Aktivierung von eNOS ist die Scherspannung, die als mechanische Kraft auf das Endothel wirkt und so eine Anpassung der Organdurchblutung an veränderte hämodynamische Bedingungen ermöglicht (Balligand et

al., 2009). Zusätzlich wird die eNOS durch verschiedene Signalmoleküle wie Bradykinin, Adenosin, VEGF insbesondere unter hypoxischen Bedingungen und Serotonin, welches bei Thrombozytenaggregation freigesetzt wird, aktiviert (Dhananjayan et al., 2016).

Mechanische Scherspannung stellt einen der wichtigsten physiologischen Stimuli für eNOS dar. Niedrige oder oszillierende Scherspannung, wie sie in Gefäßregionen mit turbulenter Strömung vorliegt, führt zur Aktivierung proinflammatorischer Signalwege, insbesondere des Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B), was die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selectin erhöht und die Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen fördert. Dies initiiert und verstärkt lokale Entzündungsreaktionen und begünstigt die Entstehung atherosklerotischer Läsionen (Brasier, 2010; Liao, 2013).

Oxidativer Stress, charakterisiert durch eine Überproduktion von ROS wie Superoxid ( $O_2^-$ ) und Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), spielt eine Schlüsselrolle bei der endothelialen Dysfunktion. ROS reagieren mit NO zu  $ONOO^-$ , einem starken Oxidationsmittel, das Proteine, Lipide und DNA schädigt und die NO-Bioverfügbarkeit weiter vermindert. Zusätzlich führt  $ONOO^-$  zur Oxidation von BH<sub>4</sub>, was das eNOS-Uncoupling verstärkt und somit einen Teufelskreis der endothelialen Dysfunktion fördert (Förstermann & Sessa, 2012; Gao & Mann, 2009).

Des Weiteren modulieren proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) die Expression und Funktion von eNOS negativ und verstärken die oxidative Stressantwort. Zugleich wird durch diese Zytokine die Expression von prokoagulatorischen Faktoren wie Gewebefaktor (TF) erhöht, was eine prothrombotische Umgebung begünstigt (Pober & Sessa, 2007).

Zusammenfassend ist die endotheliale Dysfunktion ein komplexes Zusammenspiel aus vermindertem NO-Signal, erhöhter ROS-Produktion, Aktivierung proinflammatorischer Signalwege (z. B. NF- $\kappa$ B) und gestörter hämodynamischer Stimuli. Diese Veränderungen führen zu einer gestörten Gefäßhomöostase und spielen eine fundamentale Rolle in der Pathogenese zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen. Da Erythrozyten durch den Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid, die Regulation der NO-Bioverfügbarkeit sowie durch ihre Wechselwirkungen mit dem Endothel unmittelbar Einfluss auf Gefäßhomöostase und oxidativen Stress nehmen, kommt ihnen in der Entstehung und Progression der endothelialen Dysfunktion eine bislang oft unterschätzte Rolle zu.

### 1.2.3 Rolle der Erythrozyten und des Hämoglobins

Da eine eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit als Schlüsselfaktor der endothelialen Dysfunktion gilt, kommt Hämoglobin durch seine Fähigkeit zur NO-Bindung und -Inaktivierung eine zentrale Bedeutung für die Progression vaskulärer Störungen zu.

Hämoglobin ist das zentrale funktionelle Protein der RBCs und übernimmt die entscheidende Funktion des reversiblen Sauerstofftransport. Im oxygenierten Zustand verleiht es den RBCs und damit dem Blut seine typische rote Farbe. Molekular handelt es sich beim Hämoglobin um einen tetrameren Proteinkomplex, der aus vier Globinuntereinheiten besteht, von denen jede ein Häm-Molekül gebunden hat. Das Häm ist eine Komplexverbindung aus einem Porphyrinring und einem Eisen-Ion und fungiert als prosthetische Gruppe, die für die reversible Sauerstoffbindung im Hämoglobin verantwortlich ist. Neben Hämoglobin kommt Häm allerdings auch in anderen Proteinen, wie Myoglobin oder Cytochrom-c, als prosthetische Gruppe vor, wo es ebenfalls zentrale katalytische oder transportbezogene Funktionen übernimmt.

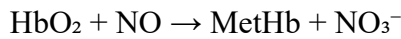
Die Fähigkeit des Hämoglobins zur Sauerstoffbindung ist eng mit den besonderen biomechanischen Eigenschaften der Erythrozyten verknüpft. Diese zeichnen sich durch ihre bikonkave Form, ein außergewöhnlich hohes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis sowie eine vom Zytosol weitgehend unabhängige Membran aus, die ihnen eine außergewöhnliche Verformbarkeit verleiht. Dadurch können sie sich verlängern, ihre Morphologie flexibel anpassen und effizient durch enge Kapillaren zirkulieren. Diese Verformbarkeit erleichtert den Gasaustausch mit metabolisch aktivem Gewebe, wird jedoch sowohl durch intrinsische Faktoren wie das Membranskelett und die molekulare Struktur der Zelle als auch durch extrazelluläre Einflüsse, insbesondere die Scherspannung, reguliert (An et al., 2002; Cicco & Pirrelli, 1999). Mechanosensitive Signalwege vermitteln hierbei eine „aktive“ Anpassung der Zellform (Simmonds et al., 2014). Während die Scherspannung im menschlichen Kreislauf physiologisch bei maximal etwa 15 Pa liegt, können RBCs in kreislaufunterstützenden Geräten (z. B. künstlichen Blutpumpen) deutlich höheren Belastungen von bis zu 1000 Pa ausgesetzt sein (Deutsch et al., 2006). Solche supraphysiologischen Kräfte beeinträchtigen die mechanischen Eigenschaften der Erythrozyten, reduzieren ihre Verformbarkeit, verschlechtern die Gewebedurchblutung und erhöhen zugleich die mechanische Fragilität der Zellen (Kameneva et al., 1999). Dies steigert das

Risiko einer Hämolyse und führt in der Folge zur intravasalen Freisetzung von Hämoglobin, das unmittelbar in den NO-Stoffwechsel eingreift (Simmonds et al., 2014).

Es gibt unterschiedliche Hämoglobintypen, die sich in der Zusammensetzung ihrer Globinketten unterscheiden, woraus eine Modulation der Sauerstoffaffinität folgt. Das adulte Hämoglobin (HbA) wird bereits in der Fetalperiode gebildet, wobei die Produktion nach der Geburt deutlich zunimmt. HbA besteht zu 95% aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ketten ( $\alpha_2\beta_2$ ), wodurch es vier Sauerstoffmoleküle gleichzeitig binden kann. Jedes  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin des Hämoglobins enthält einen sogenannten proximalen Histidinrest, der gemeinsam mit dem zweiwertigen Eisenatom im Zentrum des Häm-Moleküls die kovalente Bindung zwischen Häm und dem jeweiligen Globinmolekül ermöglicht. Wenn ein Sauerstoffmolekül an das Häm bindet, entstehen zusätzliche nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen dem zentralen Eisenatom des Häms, dem Sauerstoffmolekül und dem sogenannten distalen Histidinrest der Globinkette. Dabei wird das Sauerstoffmolekül zwischen dem Eisenatom und dem distalen Histidinrest positioniert. Durch die Sauerstoffbindung wird das zentrale Eisenatom in die Ebene des Protoporphyrinrings gezogen. Die Bindung von Sauerstoff führt zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des einzelnen Globinmoleküls und dadurch auch zu einer Anpassung der Quartärstruktur des gesamten Hämoglobins. Durch diese strukturellen Veränderungen erhöht sich mit jeder weiteren Oxygenierung die Affinität des Hämoglobins für Sauerstoff (Perutz, 1970). Dieses Phänomen der kooperativen Bindung ist die Grundlage für die sigmoidale Form der Sauerstoffbindungskurve und erlaubt eine effiziente  $O_2$ -Aufnahme in der Lunge sowie eine bedarfsorientierte Freisetzung im peripheren Gewebe. Dieser Vorgang, bei dem Sauerstoff an das zweiwertige Eisenion des Häms bindet, wird als Oxygenierung bezeichnet, und das Hämoglobin wird als oxygeniertes Hämoglobin oder Oxyhämoglobin bezeichnet. Wird die Bindungsstelle des Hämoglobins für Sauerstoff allerdings blockiert, ist die Versorgung des Organismus gefährdet (Perutz et al., 1998).

Neben seiner Funktion als Sauerstofftransporter spielt Hämoglobin auch eine zentrale Rolle in der Modulation der vaskulären Homöostase, insbesondere durch seine Interaktion mit endothelial gebildetem Stickstoffmonoxid. NO ist ein endogen gebildetes, hochreaktives gasförmiges Signalmolekül, das primär durch die eNOS aus L-Arginin synthetisiert wird. Es wirkt als potenter Vasodilatator, indem es in glatten Gefäßmuskelzellen die sGC aktiviert und darüber den intrazellulären cGMP-Spiegel erhöht. Ein wesentlicher

regulatorischer Mechanismus ergibt sich aus der Tatsache, dass Hämoglobin NO sowohl binden als auch metabolisieren kann. Insbesondere Oxyhämoglobin (HbO<sub>2</sub>) reagiert mit NO in einer schnellen Redoxreaktion zu Methämoglobin (MetHb), das keine Sauerstoffbindungs-fähigkeit mehr besitzt, und Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>):



Diese Reaktion führt zur schnellen Inaktivierung von NO und somit zu einer Reduktion seiner bioverfügbaren Konzentration (Gladwin et al., 2004; Herold et al., 2001). Schon Palmer et al. konnten zeigen, dass Hämoglobin die NO-induzierte Vasorelaxation in vitro hemmt, was dessen potenzielle Rolle als NO-Scavenger unterstreicht (Palmer et al., 1987).

Angesichts der hohen Affinität des Hämoglobins für NO stellt sich die Frage, wie NO im physiologischen Kontext seine vasodilatierende Wirkung entfalten kann, wenn es durch erythrozytäres Hb so rasch inaktiviert würde. Verschiedene Hypothesen wurden formuliert, um diesen Widerspruch zu erklären:

### **1. Transport und Freisetzung als S-Nitrosothiol (SNO-Hb):**

Stamler und Kollegen waren eine der Ersten, die die Hypothese aufstellten, dass NO im Hämoglobin kovalent an den Cysteinrest β93 gebunden und in Form eines S-Nitrosothiols (SNO-Hb) stabilisiert wird (Jia et al., 1996; Stamler et al., 1997). Diese gebundene Form bleibt gegenüber oxidativen Veränderungen durch das Häm weitgehend geschützt, ist jedoch in der Lage, unter hypoxischen Bedingungen – wie sie im Gewebe auftreten – NO freizusetzen. Auf diese Weise kann SNO-Hb lokal eine Vasodilatation bewirken und so die Gewebepfusion an den jeweiligen Sauerstoffbedarf anpassen (Verde et al., 2023; Zhang et al., 2015).

### **2. Diffusionsbarriere in Erythrozyten:**

In ihrer Arbeit zeigten Vaughn und Kollegen, dass die Erythrozytenmembran eine funktionelle Diffusionsbarriere für NO darstellt (Vaughn et al., 2000). Diese Barriere verlangsamt die Diffusion von endothelial freigesetztem NO in das Zellinnere der Erythrozyten und verhindert somit eine unmittelbare Reaktion mit dem intrazellulären Hämoglobin. Auf diese Weise bleibt ein Teil des NO im extrazellulären Raum verfügbar, um dort seine

vasodilatierenden Effekte an glatten Gefäßmuskelzellen auszuüben. Zusätzlich legen die Autoren nahe, dass auch andere strukturelle und biochemische Faktoren – etwa die Zusammensetzung des Plasmas sowie die dichte, negativ geladene Schicht der endothelialen Glykokalyx – eine zusätzliche Barriere darstellen könnten, die den Zugang von NO zum intrazellulären Hämoglobin weiter erschwert. Diese multiplen Schutzmechanismen könnten erklären, wie NO trotz der hohen Affinität des Hämoglobins für NO seine physiologischen Funktionen entfalten kann (Deonikar & Kavdia, 2013; Vaughn et al., 2001).

### 3. Kompartimentierung von NO:

Diese Hypothese besagt, dass NO nicht frei und gleichmäßig im Blutplasma verteilt vorliegt, sondern gezielt in bestimmten hydrophoben Mikrodomänen lokalisiert wird, die sich innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Zellmembran von Erythrozyten befinden. Diese Mikrodomänen schaffen eine Art geschützten Raum, in dem NO vor der unmittelbaren und schnellen Reaktion mit dem intrazellulären Hämoglobin geschützt ist. Durch diese räumliche Trennung wird verhindert, dass NO sofort vom Hämoglobin „gefangen“ und somit inaktiviert wird, bevor es seine Wirkung an den Zielstrukturen, etwa den glatten Muskelzellen der Gefäßwand, entfalten kann. Innerhalb dieser Mikrodomänen kann NO gezielt Signalkaskaden initiieren, die zur Entspannung der Gefäßmuskulatur führen und so die lokale Durchblutung und den Blutdruck regulieren. Darüber hinaus könnte diese Kompartimentierung die spezifische und effiziente Weiterleitung von NO-Signalen ermöglichen, indem sie das gasförmige Molekül von anderen reaktiven Molekülen und potenziellen Inhibitoren abschirmt. Diese gezielte Isolation und Fokussierung der NO-Signale unterstützt die feine Abstimmung der vaskulären Homöostase und erklärt, wie NO trotz seiner hohen Reaktivität gegenüber Hb in vivo eine physiologisch relevante Signalwirkung besitzt (Ju et al., 1997; Laude & Prior, 2004; Leo et al., 2020).

Unter physiologischen Bedingungen ist Hämoglobin ausschließlich intrazellulär innerhalb der RBCs lokalisiert. Im pathologischen Kontext, z. B. bei intravasaler Hämolyse wie bei Sichelzellanämie, Malaria oder mechanischer Hämolyse durch Herzklappenprothesen, gelangt freies Hämoglobin in den extrazellulären Raum, wo es ungepuffert auf NO trifft. Intravaskuläre Hämolyse beschreibt dabei den Zustand, in dem Erythrozyten im Blutkreislauf zerfallen und dabei ihre zellulären Bestandteile, insbesondere freies Hämoglobin, in das Plasma freisetzen. Dies kann immunologisch zum Beispiel bei

komplementvermittelter Lyse, parasitär beispielsweise durch Babesia oder mechanisch zum Beispiel durch Herzklappenprothesen bedingt sein (Jeffers et al., 2006).

Während intrazelluläres Hb antioxidative Schutzmechanismen besitzt, stellt freies ungebundenes Hämoglobin im extrazellulären Raum ein erhebliches Risiko dar, da es nicht nur NO mit hoher Affinität bindet und dadurch dessen vasodilatierende Wirkung neutralisiert, sondern durch die oxidative Labilität des Häms auch zur Bildung von ROS beiträgt (James et al., 2020). Diese Konstellation begünstigt vasokonstriktorische Effekte, erhöht die endotheliale Permeabilität, sorgt für eine prothrombotische Endothelaktivierung und entzündliche Zelladhäsion und trägt maßgeblich zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion bei (Meegan et al., 2021; Singla et al., 2017). Zusätzlich wird die endotheliale NO-Synthese durch oxidative Stressoren und Entzündungsmediatoren gehemmt, was die Dysfunktion weiter verschärft. Die Kombination aus verminderter NO-Produktion und verstärkter NO-Inaktivierung durch freies Hb stellt somit ein doppeltes Risiko für die vaskuläre Integrität dar (Minneci et al., 2005).

Um diese potenziell schädlichen Effekte freigesetzten Hämoglobins zu vermeiden, besitzt der Körper ein effektives Abwehrsystem, in dessen Zentrum das Plasmaprotein Haptoglobin steht. Haptoglobin ist ein Akute-Phase-Glykoprotein, das freies Hämoglobin mit hoher Affinität in einem stöchiometrischen Verhältnis (1:1 pro Hämoglobin-Dimer) bindet und dadurch sowohl dessen oxidative als auch seine NO-scavengende Wirkung neutralisiert. Der entstehende Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex wird anschließend durch den CD163-Rezeptor auf Makrophagen der Leber, Milz und des Knochenmarks erkannt und über Endozytose aufgenommen und abgebaut (Levy et al., 2010). Dieser Mechanismus erfüllt eine doppelte Schutzfunktion: Einerseits wird die Bioverfügbarkeit von NO bewahrt, was der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase dient, andererseits wird die toxische Wirkung des freien Häms reduziert, indem es schnell aus dem Kreislauf entfernt wird (Kristiansen et al., 2001).

Unter hyperhämolytischen oder chronischen Bedingungen kann die Bindungskapazität von Haptoglobin jedoch erschöpft sein. Das überschüssige freie Hb verteilt sich dann ungehindert in das Plasma und Gewebe, wo es oxidativen Bedingungen ausgesetzt ist. Dabei wird das Eisen(II)-Häm ( $\text{Fe}^{2+}$ ) des Hämoglobins zu Met-Hämoglobin ( $\text{Fe}^{3+}$ -Hb) oxidiert, welches instabil ist und Häm zusammen mit Globinketten freisetzen kann.

Dieses freie Häm verstärkt die Gewebeschädigung zusätzlich, indem es peroxidative Reaktionen sowie die Aktivierung von Entzündungskaskaden fördert (Obeagu et al., 2024).

Zum Schutz bindet das Plasmaprotein Hämopexin das freigesetzte Häm mit hoher Affinität und vermittelt über CD91-vermittelte Aufnahme in Hepatozyten und Makrophagen dessen Abbau (Hvidberg et al., 2005). Ist jedoch auch die Hämopexin-Kapazität erschöpft, lagert sich freies Häm an Albumin (Met-Hämalbumin) oder bleibt ungebunden. Ungebundenes Hb und Häm werden schließlich renal filtriert, wobei Eisen im proximalen Tubulus als Hämosiderin gespeichert wird. Eine chronische Überlastung führt zu Hämosiderinablagerungen, Fanconi-Syndrom und langfristig zu chronischem Nierenversagen (Fagoonee et al., 2005; Rother et al., 2005).

Wenn die Plasmakonzentrationen von freiem Hb oder Met-Hb die physiologischen Puffersysteme überschreiten, kommt es zur Hämoglobinurie, welches einen Marker einer ausgeprägten intravasalen Hämolyse darstellt. In dieser Situation wird nicht nur NO massiv gebunden und inaktiviert, sondern es entstehen zugleich direkte zytotoxische, proinflammatorische und prooxidative Effekte, die die Endothelfunktion zusätzlich kompromittieren (Rother et al., 2005). Damit trägt freies Hb wesentlich zur Progression endothelialer Dysfunktion und vaskulärer Schädigung bei.

Zusammenfassend ist Hämoglobin nicht nur essenziell für den Sauerstofftransport, sondern übernimmt auch eine zentrale Funktion in der präzisen Regulation der vaskulären NO-Signaltransduktion. RBCs agieren hierbei als dynamische Vermittler zwischen Sauerstoff- und NO-Homöostase. Die Fähigkeit des Hämoglobins, NO zu binden, zu speichern und unter bestimmten Bedingungen freizusetzen, verdeutlicht die komplexe Rolle der Erythrozyten in der Gefäßphysiologie. Pathologische Zustände, die zur Freisetzung von Hämoglobin aus RBCs führen, stören dieses Gleichgewicht massiv und fördern die Entstehung endothelialer Dysfunktion, was ein zentraler Ausgangspunkt kardiovaskulärer Erkrankungen ist. Ein tieferes Verständnis dieser Zusammenhänge eröffnet neue diagnostische und therapeutische Perspektiven für Erkrankungen, die mit gestörter NO-Bioverfügbarkeit einhergehen.

Vor diesem Hintergrund rückt die AS als klinisch relevantes Modell in den Fokus: Die durch hämodynamische Turbulenzen verursachte mechanische Schädigung von RBCs

könnte zur intravaskulären Freisetzung von Hämoglobin führen, welches wiederum die NO-Bioverfügbarkeit beeinträchtigt und eine endotheliale Dysfunktion begünstigt.

### 1.3 Ziele der Arbeit

Wie bereits beschrieben, zählt die AS zu den häufigsten erworbenen Herzklappenerkrankungen. Sie bleibt über einen längeren Zeitraum klinisch inapparent, manifestiert sich jedoch im weiteren Verlauf typischerweise in Form von Belastungsdyspnoe, belastungsinduzierter Angina pectoris und Synkopen. Diese Symptome gehen mit einer signifikant erhöhten Mortalität einher. Da bislang keine kausale medikamentöse Therapie existiert, erfordert die Erkrankung eine interventionelle oder chirurgische Klappenersatztherapie. In einem zuvor durchgeführten Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass es bei Mäusen mit einer experimentell induzierten AS zu einer endothelialen Dysfunktion kommt.

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Hypothese basiert auf Beobachtungen aus diesem Mausmodell. Die Hypothese lautet, dass bei Aortenklappenstenose die durch die hämodynamisch bedingte Klappenverengung entstehenden turbulenten Blutflussveränderungen zu einer mechanisch induzierten Fragmentierung von RBCs führen. Hierdurch wird zellfreies Hämoglobin in das Plasma freigesetzt, welches aufgrund seiner hohen Affinität zu NO dessen Bioverfügbarkeit reduziert. Dies führt zur Beeinträchtigung der endothelialen Funktion. Es wird angenommen, dass dieser pathophysiologische Mechanismus auch auf den Menschen übertragbar ist. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, Erythrozyten als potenzielle Quelle des zellfrei im Plasma zirkulierenden Hämoglobins bei Patienten mit AS zu charakterisieren. Dabei sollte geklärt werden, ob die Freisetzung von Hämoglobin durch RBCs nach einem Klappenersatz reversibel und somit potenziell therapeutisch korrigierbar ist.

Die Hypothese der folgenden Arbeit lautete, dass die turbulenten Strömungen bei AS eine mechanische Schädigung und Fragmentierung der RBCs verursachen, wodurch freies Hämoglobin ins Plasma freigesetzt wird. Dies führt zu einem erhöhten NO-Verbrauch im Blut und damit im Folgenden zu endothelialer Dysfunktion. Es wurde angenommen, dass der TAVI-Eingriff durch die Verbesserung der Flussverhältnisse zur Wiederherstellung der Endothelfunktion beitragen kann.

**Konkret wurden in dieser Arbeit die folgenden Aspekte analysiert:**

**1. Charakterisierung der Erythrozyten, ihrer Integrität und deren Reversibilität nach Intervention:**

Das erste Ziel der Studie war eine Charakterisierung der humanen RBCs und ihrer Integrität und die Frage, ob dies post-Intervention reversibel ist. Zu diesem Zweck wurde mittels Durchflusszytometrie Blut von AS-Patienten jeweils einen Tag vor und ein bis drei Tage nach TAVI untersucht, um strukturelle Veränderungen und die Integrität der Erythrozyten zu analysieren.

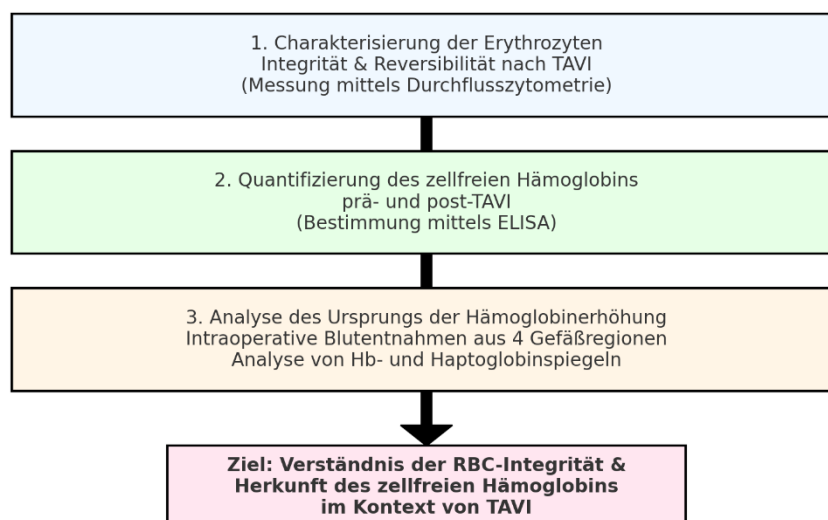
**2. Quantifizierung des zellfreien Hämoglobins im Plasma vor und nach TAVI:**

Zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Plasma wurde venöses Blut prä- und postinterventionell gewonnen, aufbereitet und mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantifiziert. Ziel war es, Unterschiede im zellfreien Hämoglobinspiegel bei Patienten mit und ohne AS zu erfassen

**3. Analyse des Ursprungs der Hämoglobinerhöhung:**

Zur Lokalisierung der Quelle des freigesetzten Hämoglobins wurden intraoperativ bei AS-Patienten Blutproben aus vier distinkten vaskulären Entnahmestellen gewonnen. Anschließend wurden Hämoglobin- und Haptoglobinspiegel analysiert, um Rückschlüsse auf die Herkunft des zellfreien Hämoglobins und dessen möglicher Zusammenhang mit der mechanischen Hämolyse zu ziehen.

**Analysierte Aspekte der Studie**



**Abb. 2: Analysierte Aspekte der Studie**

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Patientenkohorte**

Für alle Experimente der vorliegenden Promotionsarbeit wurde Blut von Patienten der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des UKD, die an einer hochgradigen Aortenklappenstenose erkrankt sind, verwendet. Die Probengewinnung erfolgte im Rahmen einer Studie, welche von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf überprüft und genehmigt wurde (Nr. 2019-559). Zusätzlich wurde der Patient für die statistische Auswertung nach den zuvor definierten Variablen Alter, Geschlecht, Körpergröße und -gewicht, Raucherstatus und den Erkrankungen Diabetes, arterielle Hypertonie und Niereninsuffizienz befragt.

#### **2.1.2 Blutentnahme**

Die Blutprobe wurde einen Tag vor dem TAVI-Eingriff und ein bis drei Tage nach dem TAVI-Eingriff beim jeweiligen Patienten abgenommen. Das Blut wurde mit einer möglichst kurzen Stauungszeit beim liegenden Patienten in einem Heparin-Röhrchen abgenommen. Die möglichst kurze Stauzeit wurde favorisiert, um einen Konzentrationsanstieg von Blutzellen, Makromolekülen und proteingebundenen Substanzen und gleichzeitig eine Hyperfibrinolyse zusätzlich zu den Veränderungen in der Gerinnungsanalytik zu vermeiden. Bei allen Patienten wurde Blut im Liegen abgenommen, um Lagewechselbedingte Veränderungen der Blutzellkonzentration zu vermeiden. Ein Wechsel vom Liegen zum Stehen erhöht den effektiven Filtrationsdruck und führt zu Flüssigkeitsverschiebungen vom Intravasalraum ins Interstitium (Hämokonzentration), während der Wechsel vom Stehen zum Liegen zu einer Hämodilution führt. Das Heparin-Röhrchen wurde verwendet, damit durch die Antikoagulanzen die Gerinnungskaskade blockiert werden konnte, bis alle Blutentnahmen einer Sequenz vollständig waren.

### 2.1.3 Pufferlösungen

#### *FACS-Puffer:*

Der für die Durchflusszytometrie verwendete Puffer wurde selbst hergestellt und bestand aus 0,5 % bovinem Serumalbumin (BSA) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufgelöst. Dann wurde der Puffer steril durch einen 0,45- $\mu\text{m}$ -Filter filtriert, um mögliche Zellaggregate oder Partikel zu entfernen, die die Detektion stören könnten. Der FACS-Puffer wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert und wöchentlich frisch angesetzt, um mikrobielles Wachstum und Proteinaggregation zu verhindern. Der Puffer dient mehreren Zwecken: Zum einen minimiert BSA unspezifische Bindungen von Antikörpern an Zelloberflächen und Kunststoffmaterialien der Röhrchen, wodurch die Signal-zu-Hintergrund-Ratio bei der Durchflusszytometrie verbessert wird. Zum anderen sorgt PBS für eine konstante Osmolarität und einen physiologischen pH-Wert, was die Zellmorphologie während der Probenverarbeitung stabil hält. Während der FACS-Analyse wurde der Puffer zum Resuspendieren der Zellen verwendet, um die Integrität der Zellsuspension aufrechtzuerhalten und reproduzierbare Messergebnisse zu gewährleisten.

#### *Aortenklappenpuffer für ELISA:*

Der Aortenklappenpuffer wurde speziell für die Probenvorbereitung im Rahmen des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet. Für die Herstellung wurde ein Liter destilliertes Wasser vom MilliQ® Reference Wasseraufbereitungssystem (Merck, Darmstadt, Germany) bei Raumtemperatur verwendet. Darin wurden 6,9 g Natriumchlorid (NaCl), 0,25 g Kaliumchlorid (KCl), 0,2 g Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ ), 2,09 g Natriumbicarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), 0,16 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) sowie 1,8 g Glucose gelöst. Die Zusammensetzung entspricht dabei physiologischen Salz- und Nährstoffkonzentrationen, wodurch die Zellen während der Probenvorbereitung vor osmotischem Stress geschützt und die Stoffwechselfunktion weitgehend aufrechterhalten wird. Das Gemisch wurde dann 10min lang mit Carbogen (5 %  $\text{CO}_2$  / 95 %  $\text{O}_2$ ) zur Einstellung des pH-Wertes begast. Dabei stand das Gefäß auf einer Platte, die den Inhalt mit einem Rührfischchen bei einer Geschwindigkeit von 300/min vermischt. Diese Begasung trägt dazu bei, den physiologischen pH-Wert zu stabilisieren und gleichzeitig eine ausreichende Sauerstoffsättigung sicherzustellen. Nach diesen 10min wurden zusätzlich 0,37g Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) hinzugegeben, da eine frühere Zugabe zur Ausfällung von Calciumverbindungen führen könnte. Das Gemisch wurde anschließend unter denselben Bedingungen erneut für 10min begast, um eine gleichmäßige Lösung und vollständige

Integration des Calciumions zu gewährleisten. Um eine einwandfreie Qualität des Puffers sicherzustellen, wurde die Lösung abschließend unter Unterdruck durch einen 0,45 µm-Filter filtriert. Diese Filtration entfernt Partikel und mögliche Aggregationen, wodurch die Probenintegrität während der späteren Analyse gewahrt bleibt. Die Filtration unter Unterdruck erleichtert den Durchfluss und minimiert die Belastung des Filters. Der gefilterte Puffer wurde anschließend lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und sollte möglichst zeitnah verwendet werden, da sich insbesondere der pH-Wert über längere Lagerzeiten verändern kann. Hierbei sei angemerkt, dass der Puffer nur für den Tag der Herstellung sowie den darauffolgenden Tag zu verwenden ist, um stabile Untersuchungsverhältnisse insbesondere bzgl. des pH-Wertes zu gewährleisten und die Reproduzierbarkeit der ELISA-Analysen sicherzustellen.

#### **2.1.4 Probenvorbereitung für ELISA**

Zu Beginn der Probenaufbereitung wurde den Probanden jeweils Blut in EDTA-Röhrchen entnommen. Nach der vollständigen Sammlung aller Proben wurde das Blut in ein 10 ml Greiner-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C mit 800 U/min, einer Beschleunigung von 6 g/min und einer Bremsung von 3 g/min über 10 Minuten, um die verschiedenen Blutbestandteile zu separieren. Nach der Zentrifugation wurde das Plasma vorsichtig abpipettiert und durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff konserviert, bevor es bei -80 °C in der lokalen Biobank gelagert wurde, um eine spätere Verwendung zu gewährleisten. Im Anschluss daran wurde der Buffy-Coat, also die weiße Leukozytenschicht, die sich oberhalb der roten Blutkörperchen befindet, abpipettiert. Um die RBCs zu waschen, wurden 2 ml PBS hinzugegeben und die Röhrchen vorsichtig dreimal geschwenkt, um eine Durchmischung zu erreichen, ohne die Zellen zu schädigen. Nachfolgend wurde die Suspension erneut unter denselben Zentrifugationsbedingungen für 10 Minuten zentrifugiert. Das überstehende PBS wurde danach abgenommen und verworfen. Für die weitere Probenvorbereitung wurde eine Zellsuspension hergestellt, indem 1 ml gewaschene RBCs, 1,5 ml Aortenklappenpuffer und 2,5 µl Heparin hinzugegeben wurden, um einen Hämatokrit von 40 % einzustellen. Die Berechnung des Hämatokrits basiert auf folgender Überlegung:

$$\text{Hämatokrit (\%)} = \left( \frac{V_{RBC}}{(V_{RBC} + V_{Puffer})} \right) \times 100 = \left( \frac{1ml}{(1ml + 1,5ml)} \right) \times 100 \approx 40\%$$

Der minimale Einfluss des Heparins von 2,5 µl ist hierbei vernachlässigbar. Kleinere Pipettierabweichungen können den Hämatokrit leicht variieren lassen, der Wert liegt jedoch im physiologisch relevanten Zielbereich für Erwachsene. Dieser Hämatokrit gewährleistet so eine physiologisch relevante Zelldichte, die für die nachfolgende Inkubation und ELISA-Analyse geeignet ist. Außerdem könnte ein zu hoher Hämatokrit die Nährstoffversorgung und den Gasaustausch während der Inkubation beeinträchtigen, während ein zu niedriger Hämatokrit die Konzentration von zellgebundenen oder ausgeschiedenen Faktoren verringert. 40 % stellt hier einen Kompromiss dar. Diese Zellsuspension wurde anschließend für 6 Stunden bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine abschließende Zentrifugation für 10 Minuten unter den zuvor beschriebenen Bedingungen. Der Überstand wurde danach abpipettiert, durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff konserviert und bei -80 °C gelagert. Dieser Überstand stellte schließlich die vorbereitete Probe dar, die für die nachfolgenden ELISA-Analysen verwendet wurde.

### 2.1.5 Geräte

Für die Analysen mittels FACS und ELISA wurden die nachfolgenden Geräte verwendet.

**Tabelle 1: Geräte**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Scientific Heraeus, BBD 6620 CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Durchflusszytometrie (FACS)	BD FACSVerser Cell Analyzer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Magnetrührer	IKA IKAMAG RET Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikrotiterplatten-Lesegerät	FLUOstar Omega	BMG Labtech, Deutschland
Zentrifuge für 1,5 ml Eppis	Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge für 15 ml Tubes	Eppendorf Centrifuge 5910 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 2.1.6 Reagenzien

Für die Analysen mittels FACS und ELISA wurden die nachfolgenden Reagenzien verwendet. Die Auswahl der Reagenzien orientierte sich an den Anforderungen der jeweiligen Methode, um eine zuverlässige und reproduzierbare Detektion der Zielparameter zu gewährleisten.

**Tabelle 2: FACS-Reagenzien**

Antikörper / Reagenz	Hersteller	Verdünnung	Zweck
Annexin-5, PE/Cy7-Färbung	BioLegend (cat# 640951)	1:20	Nachweis apoptotischer bzw. eryptotischer Zellen
Annexin-V-Bindung Buffer	BioLegend (cat# 422201)	–	Unterstützung der Annexin-V-Bindung
CD235a, APC-Färbung	BioLegend (cat# 349114)	1:20	Markierung von Erythrozyten
CD71, FITC-Färbung	Miltenyi Biotec (cat# 130-098-779)	1:10	Nachweis von Transferrinrezeptoren
CD71, PE-Färbung	Miltenyi Biotec (cat# 130-099-219)	1:10	Nachweis von Transferrinrezeptoren
FACS-Puffer: 0,5 % BSA in PBS	Selbst hergestellt	–	Minimierung unspezifischer Bindungen, Zellmorphologie erhalten

**Tabelle 3: ELISA- Reagenzien**

Material / Reagenz	Hersteller / Zusammensetzung	Zweck
Aortenklappen-Puffer (1 Liter)	Siehe 2.1.3. Pufferlösungen	Physiologische Zellumgebung für die Probenvorbereitung
Carbogen (5 % CO <sub>2</sub> / 95 % O <sub>2</sub> )	–	pH-Stabilisierung während der PufferEinstellung
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS-Puffer)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	Lösungsmittel und Puffer für Wasch- und Verdünnungsschritte
Filter für Puffer (0,45 µm)	–	Entfernung von Partikeln
Heparin	–	Antikoagulation der Blutzellen
Human Hemoglobin ELISA Kit (ab157707)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Quantitative Bestimmung von Hämoglobin
Stickstoff	–	Schockgefrieren von Proben zur Lagerung

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 FACS

Die Durchflusszytometrie oder Fluorescence Activated Cell Sorting, kurz „FACS“, genannt, stellt eine hochsensitive Methode zur Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen dar. Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper lassen sich spezifische Moleküle auf oder in Zellen nachweisen und gleichzeitig verschiedene Zellpopulationen innerhalb einer heterogenen Probe differenzieren. Im Rahmen der Methodik werden zunächst spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet, wobei die Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Die Zellsuspension wird anschließend mittels hydrodynamischer Fokussierung durch eine schmale Flusszelle (Flow Cell) geleitet, sodass die Zellen einzeln und nacheinander an einem gebündelten Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge vorbeigeführt werden. Dabei erzeugen sie ein Streulicht. Es gilt je voluminöser die Zelle und je differenzierter die Strukturen im Zytoplasma, desto größer ist das entstehende Streulicht. Durch die Messung des Streulichts kann eine Aussage über die Anzahl und Verteilung der verschiedenen Zelltypen in der Probe getroffen werden und so die Zellen anhand ihrer spezifischen Zelleigenschaften weiter differenziert werden. Hierbei werden insbesondere zwei Parameter genutzt: der Forward Scatter (FSC) und der Side Scatter (SSC).



Abb. 3: Bild des verwendeten FACS-Gerätes

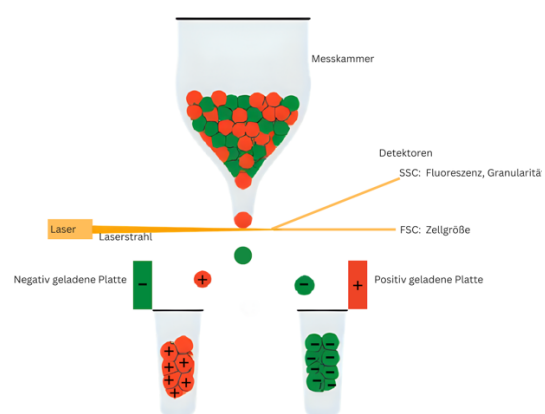


Abb. 4: Prinzip eines FACS

Der FSC ist ein Maß für die Größe der Zelle und wird oft genutzt, um eine grobe Unterscheidung nach der Zellgröße innerhalb einer heterogenen Population zu treffen. Es erfasst das Licht, das im geringen Winkel nach vorne gestreut wird, wenn eine Zelle den Laserstrahl passiert. Größere Zellen streuen dabei mehr Licht im Vorwärtswinkel als kleinere. Der SSC hingegen liefert Informationen zur Komplexität und Granularität der Zellen und ist hilfreich, um Zellen mit unterschiedlichen inneren Strukturen voneinander zu unterscheiden. Der SSC erfasst das Licht, das im 90°-Winkel von der Zelle gestreut wird. Zellen mit einem höherem Granulatgehalt oder einer komplexeren inneren Struktur erzeugen dabei eine stärkere seitliche Streuung und lassen sich so von weniger komplexen Zellen abgrenzen.

Die Blutproben wurden dann im Labor mit Annexin-V-Binding-Buffer im Verhältnis 1:500 verdünnt und resuspendiert. Dieser Puffer enthält Calciumionen (2,5 mM CaCl<sub>2</sub>), welche für die hochaffine Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin essenziell sind. Die Zusammensetzung des Puffers gewährleistet einen physiologischen pH-Wert und eine stabile Osmolarität, wodurch unspezifische Bindungen minimiert und reproduzierbare Messergebnisse ermöglicht werden. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden jeweils 100µl der Proben in FACS-Röhrchen aliquotiert. Im nächsten Schritt wurden in einem der FACS-Röhrchen die drei Antikörper CD71, CD235a und Annexin-5 im in Abschnitt 2.1.6 angegebenen Verdünnungsverhältnis angesetzt und resuspendiert. Bei der gleichzeitigen Anwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe kam es anfangs bei Einführung des Protokolls zur gegenseitigen Überlagerung der jeweiligen Fluoreszenz-Emissionsspektren, auch „Spillover“ genannt, bei dem die Emission eines Farbstoffs unerwünschterweise auch in jenem Detektionsbereich erfasst wurde, der eigentlich für die Erfassung der Emission eines anderen Farbstoffs vorgesehen war. Um mögliche Fehler bei der Kompensation zu vermeiden, wurde daher der ursprünglich mit Phycoerythrin (PE) gefärbte Antikörper CD71 durch einen mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Färbung ersetzt. Die Konzentration des zugegebenen Farbstoffs erfolgte dabei nach Hersteller-Angaben. Ein weiteres FACS-Röhrchen wurde als ungefärbte (unstained) Kontrolle ohne Antikörper verwendet und diente zur Überprüfung der Hintergrundfluoreszenz.

Um eine vollständige und stabile Anfärbung der Zellen zu gewährleisten erfolgte anschließend die 15-minütige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Inkubationszeit wurde in Vorversuchen optimiert. Ursprüngliche Tierversuche hatten eine Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C verwendet. Die systematische Variation von

Inkubationszeit und Temperatur zeigte jedoch, dass 15 Minuten bei Raumtemperatur reproduzierbare und valide Ergebnisse erbrachten, weshalb dieses Protokoll für die Patientenproben etabliert wurde. Danach wurden die Proben mit 100µl selbst hergestelltem FACS-Puffer aufgefüllt und erneut resuspendiert. Der verwendete FACS-Puffer bestand aus 0,5 % Bovines Serumalbumin (BSA) in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) aufgelöst. Zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen und zur Vermeidung von Zellaggregationen wurde der Puffer steril durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Der Puffer wurde wöchentlich frisch angesetzt und maximal sieben Tage verwendet, um mikrobielles Wachstum und eine mögliche Proteinaggregation zu verhindern. Dieser dient primär zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen und zur Erhaltung der Zellintegrität während der Analyse. BSA blockiert freie hydrophobe Bindungsstellen auf Zelloberflächen und Kunststoffmaterialien, wodurch unspezifische Protein-Protein-Interaktionen reduziert werden. Gleichzeitig sorgt das PBS für eine konstante Osmolarität und einen physiologischen pH-Wert, was die morphologische Stabilität der Zellen erhält. Der Puffer reduziert zudem Zellaggregation, erleichtert das Waschen der Proben und verbessert damit die Signal-zu-Hintergrund-Ratio bei der Fluoreszenzdetektion.

Die Expression der mit Antikörpern CD71, CD235a und Annexin-V gefärbten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. CD71, auch Transferrin-Rezeptor 1 genannt, ist ein auf der Zelloberfläche exprimiertes Protein, das den Eisentransport in die Zelle steuert. Es bindet an das eisenbindende Glykoprotein Transferrin und vermittelt so die Aufnahme von Eisenionen, welche essenziell für Hämoglobinsynthese, Zellwachstum und -teilung sind. Transferrin kann zwei Eisenionen transportieren, die über CD71 in die Zelle gelangen und dort für die Hämoglobinsynthese und weitere Stoffwechselprozesse benötigt werden. Besonders hohe CD71-Expression findet sich auf Zellen mit erhöhtem Eisenbedarf, wie erythroide Vorläuferzellen im Knochenmark, die Hämoglobin produzieren, sowie auf schnell teilenden Zellen, etwa Krebs- oder aktivierten Immunzellen. CD71 dient daher auch als Marker, um junge eisenaufnehmende Erythrozyten, die CD71 exprimieren, von älteren, CD71-negativen Erythrozyten zu unterscheiden.

CD235a, auch Glycophorin A genannt, ist ein Transmembran-Sialoglykoprotein mit zentraler Funktion auf der Oberfläche von Erythrozyten. Es fördert die strukturelle Stabilität und Flexibilität der Erythrozytenmembran, was für die Verformbarkeit der Zellen beim Durchtritt durch enge Kapillaren essenziell ist. Die Sialinsäure-Reste auf Glycophorin A

verleihen der Zelloberfläche eine negative Ladung, wodurch das Verkleben der Zellen untereinander und an den Gefäßwänden verhindert wird. Dies ermöglicht eine reibungslose Zirkulation der Erythrozyten im Blutstrom. Außerdem dient Glycophorin A als Bindungsstelle für bestimmte Pathogene wie den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* und spielt somit eine Rolle im Infektionsgeschehen, indem es Krankheitserreger bindet und andere Membranstrukturen schützt.

Annexin V ist ein Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin (PS), einem Phospholipid, das normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist. Bei Apoptose (programmiertem Zelltod) wird PS jedoch von der inneren auf die äußere Zellmembranseite verlagert und dadurch an der Zelloberfläche zugänglich. Durch diese Verlagerung kann Annexin V spezifisch an apoptotische Zellen binden und so zwischen apoptotischen und gesunden Zellen unterscheiden.

Anfangs konnten aufgrund der Eigenfluoreszenz der Zellen nur einzelne gefärbte Zellen während der Protokollentwicklung nachgewiesen werden. Unter Eigenfluoreszenz versteht man die natürliche Fluoreszenz, die bestimmte Zellkomponenten ohne zusätzliche Markierung emittieren, wenn sie durch Laserlicht angeregt werden. Diese Eigenfluoreszenz variiert je nach Zelltyp, Alter und Stoffwechszustand. Bei Zellen mit hoher Eigenfluoreszenz kann die Empfindlichkeit des FACS-Detektors eingeschränkt sein, da das Hintergrundsignal nur schwer von den spezifischen Markersignalen zu unterscheiden ist. Um die Eigenfluoreszenz zu verringern, wurden unmarkierte Zellen als Kontrolle eingesetzt, um das Signal anzupassen. Zusätzlich wurden Fluorophore mit höherer Signalintensität ausgewählt, um das spezifische Signal besser vom Eigenfluoreszenz-Hintergrund abzugrenzen.

Um Kontaminationen durch „Carry-over“, gemeint ist damit der unerwünschte Übertrag von Rückständen aus einer vorangehenden Messung auf die nachfolgende, zu vermeiden, wurden neben der routinemäßig erfolgten Dekontamination und intensiven Reinigung vor und nach Beendigung einer Messreihe daher während der Versuche weitere Maßnahmen wie die Messung von Reinstwasser unternommen.

Die Zytometriedaten wurden mittels der Datensoftware FlowJo v10.5.3 (FlowJo Software, Ashland, Oregon, Vereinigte Staaten) analysiert. Das Gating wurde manuell getätigt (siehe Abbildung 5). Zunächst wurden im Streudiagramm anhand von FSC und SSC Bereiche, sogenannte „Gates“, festgelegt, die definieren, welche Zellpopulation basierend

auf ihrer Streueigenschaften ausgewählt werden sollte. Das Streuungs-Gating ist besonders bei der Analyse von Blutzellpopulationen sehr nützlich, da das Blut aus Zellen unterschiedlicher Größe und Körnigkeit besteht. Danach ermöglichte ein Dichtediagramm der Vorwärtsstreuuhöhe (FSC-H) im Vergleich zur Vorwärtsstreufläche (FSC-A) unerwünschte Zellpopulationen wie Zelltrümmer oder doppelt markierte Zellen auszuschließen und somit die Präzision der Analyse zu erhöhen. Durch das Anlegen von Gates auf der Grundlage von Oberflächenmarkern konnten im Weiteren bestimmte Subpopulationen identifiziert werden, die einen bestimmten Marker exprimieren. Als Marker wurden im Vorfeld die Antikörper CD71, CD235a und Annexin-V ausgewählt. Dabei wird zusätzlich nach lebenden Zellen gefiltert, denn tote Zellen können klebrig sein und Farbstoffe aufnehmen, die nicht spezifisch für diese Zelle sind, was zu ungenauen Ergebnissen und falschen Schlussfolgerungen führt. Die ausgewählten Zellpopulationen wurden dann im Detail analysiert, wobei jedes Gate sicherstellte, dass die betrachteten Zellen die gewünschten Eigenschaften besitzen. Sobald das gewünschte Gating für eine Probe festgelegt wurde, konnte man es auf alle Proben anwenden, wobei immer überprüft wurde, dass keine gewünschten Zellen unbeabsichtigt ausgeschlossen wurden. Die Ergebnisse wurden in eine Microsoft Excel-Tabelle übertragen. Mittelwert, Standardabweichung und t-Test wurden statistisch erhoben. Für die Anfertigung der graphischen Darstellungen wurde die GraphPad-Software Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) verwendet.

komplett + Binding Buffer .fcs		101764
▼ cells	94,1	95731
▼ Single Cells	99,8	95531
AnnexinV +	0,049	47
CD71 +	0,85	809
CD235 +	99,9	95437
Q1: CD71 PE-A- , AnnexinV PE-Cy7-A+	0,030	29
Q2: CD71 PE-A+ , AnnexinV PE-Cy7-A+	0,038	36
Q3: CD71 PE-A+ , AnnexinV PE-Cy7-A-	0,23	218
Q4: CD71 PE-A- , AnnexinV PE-Cy7-A-	99,7	95248

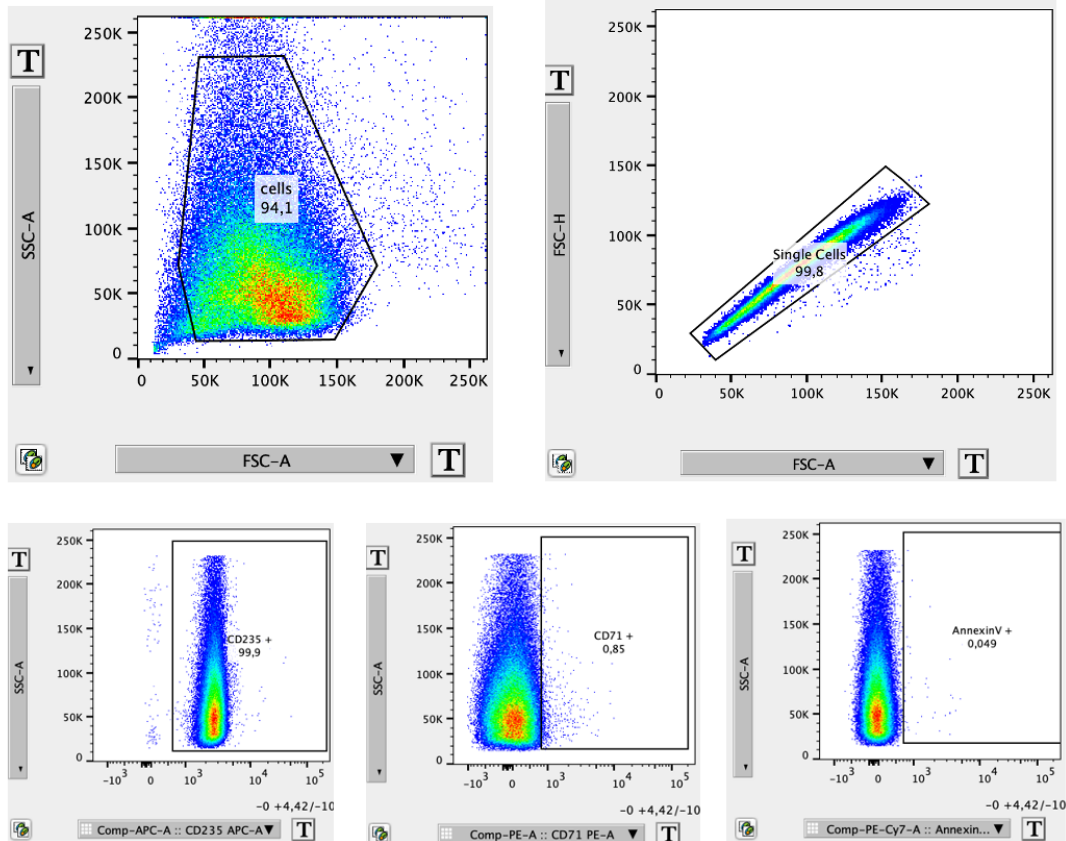


Abb. 5: Exemplarisch vorgenommene Gating an einer gemessenen Probe

### 2.2.2 ELISA

Für die Durchführung des ELISA wurden die Proben zunächst standardisiert aufbereitet, um eine homogene Zell- und Plasmafraktion zu erhalten und die Integrität der biologischen Proben sowie die Reproduzierbarkeit der nachfolgenden Analysen sicherzustellen. Insgesamt wurden 20 Probanden in das Experiment eingeschlossen.

Der ELISA-Test wurde gemäß den Herstellerangaben des Human Hemoglobin ELISA Kit (Abcam, ab157707, Cambridge, Vereinigtes Königreich) durchgeführt. Zur Kalibrierung wurden Standards in definierten Konzentrationen nach Herstellerangaben sowie ein Nullstandard (Blank), bestehend aus Probenverdünnungspuffer ohne Analyten, verwendet. Von jedem Standard, einschließlich des Nullstandards wurden jeweils 100 µl in technischen Duplikaten in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Die Verwendung technischer Duplikate diente der Minimierung zufälliger Pipettierfehler, der Erhöhung der Präzision durch Mittelwertbildung sowie der Möglichkeit, Ausreißer zu identifizieren und zu verwerfen.

Im Anschluss erfolgte die Applikation von jeweils 100 µl der Proben mit einer Verdünnung von 1:10000 ebenfalls in Duplikaten in die dafür vorgesehenen Wells. Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, wobei sie durchgehend bedeckt und horizontal gelagert wurde, um eine gleichmäßige Antigenbindung zu gewährleisten und photochemische Veränderungen am lichtempfindlichen Substrat zu verhindern.

Nach der Inkubation wurde der Inhalt der Wells vollständig aspirativ entfernt und die Wells anschließend viermal mit 300 µl verdünntem Waschpuffer gespült. Dabei wurde die Platte umgedreht und der Inhalt in einen Abfallbehälter ausgeschüttet und die Platte vorsichtig auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um Restpuffer zu entfernen.

Im Anschluss wurden 100 µl des im Kit enthaltenen Enzym-Antikörper-Konjugat, eine im ELISA-Kit enthaltene Lösung, in jede Vertiefung pipettiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten und ebenen Lagerungsbedingungen. Danach wurde die Platte erneut vierfach wie zuvor beschrieben gewaschen.

Anschließend wurden jeweils 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung zugegeben, und die Platte wurde zur enzymatischen Farbreaktion für zehn Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung pro Well beendet. Anschließend wurde die Absorption des Inhalts jeder Vertiefung mittels des FLUOstar Omega Mikrotiterplatten-Lesegeräts (BMG Labtech,

Deutschland) mit einer Wellenlänge von 450nm bestimmt. Die gemessenen Extinktionswerte der technischen Duplikate wurden gemittelt, und anhand der Standardkurve wurde die Hämoglobinkonzentration in den Proben bestimmt.

### **2.2.3 Periprozedurale Blutentnahmen**

Für die Untersuchung des zellfreien Hämoglobin-Gradienten wurden unter sterilen Bedingungen während des TAVI-Eingriffs Blutproben an definierten Zeitpunkten und Entnahmestellen gewonnen. Die Probenentnahme erfolgte periprozedural mittels eines IMA-Katheters durch den TAVI-Sondeur. Dabei wurde Blut sowohl unmittelbar vor der Implantation der Aortenklappe als auch direkt nach Abschluss der Implantation gewonnen, um Veränderungen des zellfreien Hämoglobins während des Eingriffs exakt abbilden zu können. Die Proben wurden an vier anatomisch genau definierten Positionen im kardiovaskulären System entnommen: dem linken Ventrikel, der akoronaren Tasche, der Aorta ascendens sowie der Aorta descendens. Diese spezifische Entnahmestrategie ermöglichte die Erfassung eines Hämoglobin-Gradienten entlang des Blutflusses, um potenzielle regionale Unterschiede in der Hämolyse direkt während der Intervention zu identifizieren.

Zur eindeutigen Zuordnung der Proben wurden die Blutproben unmittelbar nach der Entnahme mit farbcodierten Aufklebern versehen, die den jeweiligen Entnahmeorten zugeordnet waren. Anschließend wurde das Blut in zuvor beschriftete Lithium-Heparin-Plasma-Röhrchen überführt, um Verwechslungen zu vermeiden und die Integrität der Proben sicherzustellen. Während der gesamten operativen Prozedur wurden die Proben auf Eis gelagert, um enzymatische Aktivitäten zu hemmen und so die Stabilität der analysierten Bestandteile, insbesondere des freien Hämoglobins, zu gewährleisten.

Die quantitativen Analysen des zellfreien Hämoglobins und des Haptoglobins wurden im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie und Labordiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf nach etablierten, validierten Standardprotokollen durchgeführt. Die erhaltenen Messwerte wurden in einer zentralen Microsoft Excel-Datenbank systematisch erfasst und dokumentiert, um eine konsistente Datenbasis für die weitere Auswertung sicherzustellen. Alle Probanden wurden in die statistische Analyse eingeschlossen, da zur Auswertung Mixed-Effects-Modelle verwendet wurden, die auch mit unvollständigen Datensätzen umgehen können. Diese Modellierungsstrategie erlaubt es, individuelle

Unterschiede zwischen den Probanden zu berücksichtigen und gleichzeitig den generellen Effekt der Prozedur abzuschätzen. Darüber hinaus stellt sie sicher, dass alle verfügbaren Datenpunkte in die Analyse einfließen und die Stichprobengröße nicht unnötig reduziert wird, was die Aussagekraft der Ergebnisse stärkt und potenzielle Verzerrungen durch fehlende Werte minimiert. Hämolytische Hämoglobin-Werte über einem Cut-off von 25 mg/dl wurden nicht in die Analyse einbezogen, da Werte darüber physiologisch kaum plausibel sind, in der klinischen Praxis normalerweise nicht erreicht werden und höchstwahrscheinlich Messartefakte darstellen. Auf diese Weise wird verhindert, dass extreme, nicht realistische Werte die statistische Auswertung verzerren.

Für die statistische Auswertung der Daten sowie die Erstellung der grafischen Darstellungen kam die Software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) zum Einsatz. Hierbei wurden geeignete statistische Verfahren wie die Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen sowie der Tukey zur Analyse der Hämoglobin-Gradienten eingesetzt, um signifikante Veränderungen vor und nach der Klappenimplantation an den verschiedenen Entnahmestellen zu identifizieren. Diese Vorgehensweise erlaubte eine präzise Erfassung des Hämoglobin-Gradienten und lieferte wertvolle Informationen über mögliche prozedurale Einflüsse auf die Hämolyse. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den Hämoglobinwerten an den verschiedenen Messstellen und den kardiovaskulären Begleiterkrankungen arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus sowie koronarer Herzkrankheit (KHK) wurden punktbiseriale Korrelationen berechnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 FACS

Die vorliegende Arbeit zielte zunächst darauf ab, die Hypothese zu untersuchen, ob eine Aortenklappenstenose die Integrität der roten Blutkörperchen beeinflusst. Um dabei zusätzlich den Einfluss von Interventionen wie TAVIs auf die RBCs zu ermitteln, wurde der Effekt auf die Integrität der roten Blutkörperchen sowohl vor als auch nach TAVI verglichen. Dadurch kann zusätzlich eine Aussage darüber getroffen werden, ob die durch Erythrozyten ausgelöste Freisetzung des Hämoglobins, die zu einer endothelialen Dysfunktion führt, nach Klappenersatz reversibel und somit korrigierbar ist.

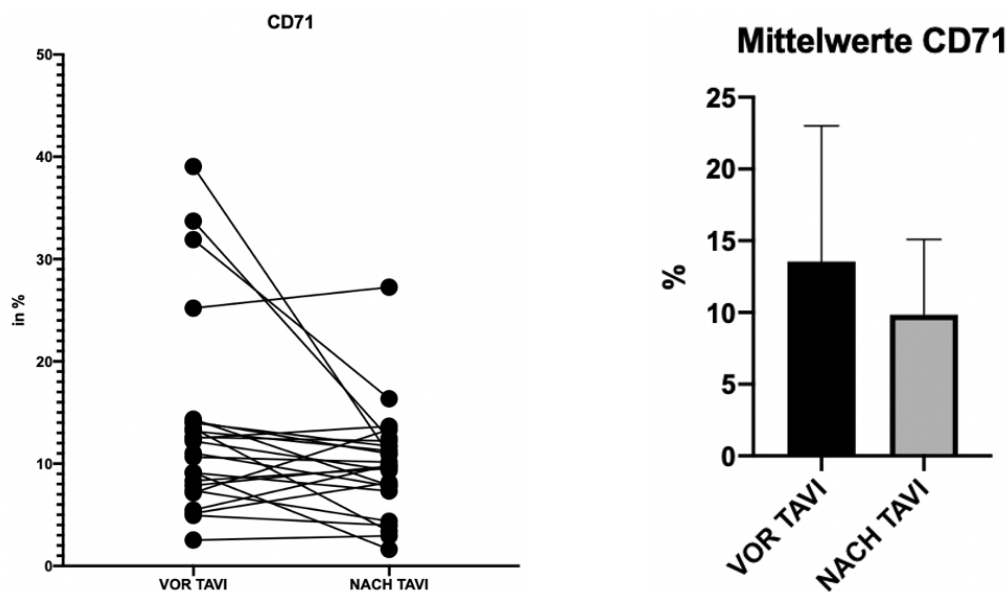
Die Charakterisierung der Erythrozyten erfolgte zunächst durch eine intraindividuelle Analyse, um die Veränderung basierend auf den FACS-Daten einen Tag vor und ein bis drei Tage nach TAVI bei denselben Probanden zu verstehen. Darauf folgte die interindividuelle Analyse, bei der Probanden mit AS verglichen wurden. Für die Charakterisierung wurden die drei Marker CD71, CD235a und Annexin-V in den Fokus genommen, die bei Patienten mit Aortenstenose einen Tag vor als auch ein bis drei Tage nach TAVI gemessen wurden, um einen direkten Vergleich prä- und postinterventionell zu erhalten. Es wurden insgesamt Proben von 26 Probanden untersucht, von denen nur 24 ( $n = 24$ ) in die statistische Auswertung miteinbezogen wurden, weil bei zwei Probanden die postinterventionelle Probe nicht abgenommen bzw. untersucht werden konnte, da die Patienten vor Probenentnahme entlassen worden waren.

Eines der drei untersuchten Enzyme war das CD71. CD71, auch Transferrin-Rezeptor 1 genannt, ist ein auf der Zelloberfläche exprimiertes Protein, das den Eisentransport in die Zelle steuert. Es bindet an das eisenhaltige Transportprotein Transferrin und vermittelt so die Aufnahme von Eisenionen, die für essenzielle zelluläre Prozesse wie Zellwachstum und Zellteilung benötigt werden. Transferrin kann zwei  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen binden, welche über die Interaktion mit CD71 in die Zelle aufgenommen werden und dort insbesondere für die Hämoglobinsynthese sowie weitere metabolische Vorgänge zur Verfügung stehen. Aufgrund dieser Eigenschaft dient CD71 daher auch als Marker, um junge Erythrozyten, die CD71 exprimieren, von älteren, CD71-negativen Erythrozyten zu unterscheiden.

Im vorliegenden Untersuchungszeitraum zeigte sich vor der TAVI ein Mittelwert der CD71-Expression von 13,54 % ( $SD = 0,095$ ). Nach der Intervention reduzierte sich dieser

Mittelwert auf 9,85 % (SD = 0,05). Die statistische Analyse mittels t-Test ergab einen p-Wert von 0,10. Somit konnte gezeigt werden, dass die CD71-Expression nach TAVI im Vergleich zur präinterventionellen Phase tendenziell abgenommen hat, ohne dass jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte.

Die beobachtete Reduktion der CD71-Expression deutet darauf hin, dass postinterventionell eine verminderte Präsenz junger Erythrozyten vorliegt, was auf eine Abnahme der Erythropoese oder veränderte Eisenverfügbarkeit hinweisen könnte.



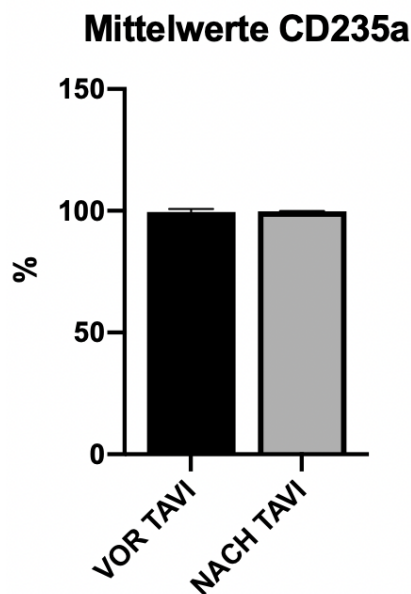
**Abb. 6: CD71 Färbung auf RBCs zeigt an, dass die Anzahl junger Erythrozyten nach TAVI abnahm (n=24 vor bzw. nach TAVI).**

Das zweite untersuchte Membranprotein, das zur Beurteilung der Integrität der roten Blutkörperchen überprüft wurde, war das CD235a. Das CD235a, auch Glycophorin A genannt, ist das wichtigste transmembranäre Sialoglykoprotein in Erythrozyten. Es fördert die strukturelle Stabilität und Flexibilität der Erythrozytenmembran, was für die Verformbarkeit der Zellen beim Durchtritt durch enge Kapillaren essenziell ist. Die auf Glycophorin A vorhandenen Sialinsäurereste verleihen der Zelloberfläche eine negative Oberflächenladung, welche maßgeblich dazu beiträgt, die Aggregation der Erythrozyten untereinander sowie die Adhäsion an Gefäßwänden zu verhindern. Dadurch wird eine ungestörte Zirkulation der roten Blutkörperchen im vaskulären System gewährleistet.

Vor der TAVI betrug der mittlere Anteil der CD235a-positiven Erythrozyten 99,56 % (SD = 0,01), während dieser postinterventionell mit 99,77 % (SD = 0,001) nahezu

unverändert blieb. Die statistische Auswertung mittels t-Test ergab einen p-Wert von 0,4, was auf keine signifikante Veränderung der CD235a-Expression im Vergleich zur präinterventionellen Phase hinweist.

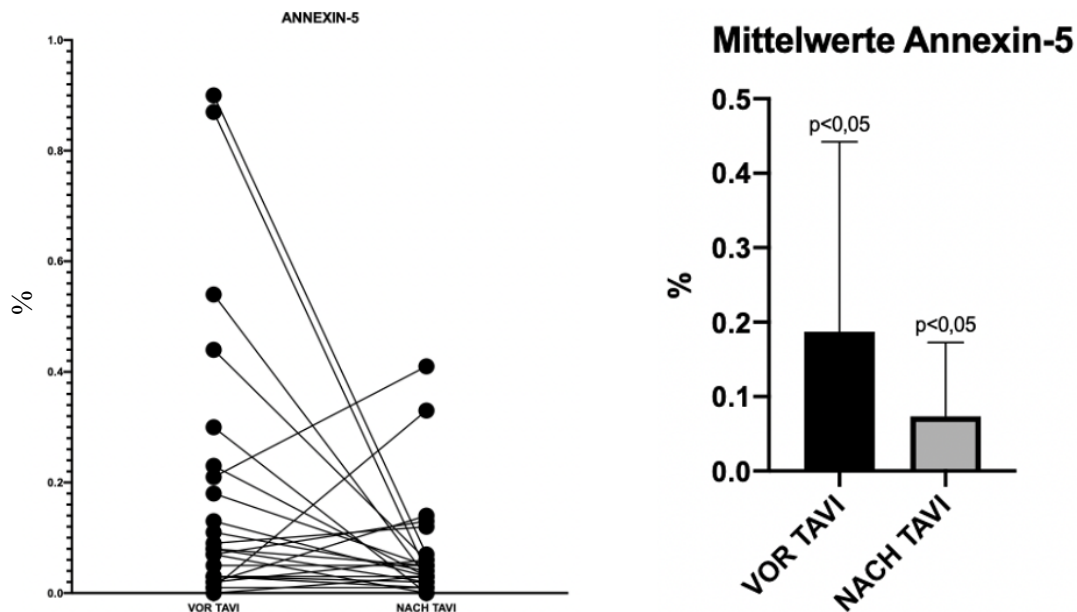
Diese Daten legen nahe, dass die TAVI-Prozedur keine nachweisbaren Schäden oder strukturellen Veränderungen an der Erythrozytenmembran verursacht. Die erhaltene Expression von CD235a weist darauf hin, dass die mechanische Belastung während des Eingriffs die Stabilität und Verformbarkeit der roten Blutkörperchen nicht beeinträchtigt, was entscheidend für deren physiologische Funktion und Mikrozirkulation ist. Somit bleibt die Integrität der Erythrozytenmembran auch postinterventionell gewährleistet.



**Abb. 7: CD235a-positive Färbung auf RBCs zeigt an, dass die strukturelle Stabilität nach TAVI erhalten bleibt (n=24 vor bzw. nach TAVI).**

Das letzte analysierte Protein war Annexin-V, ein Protein mit hoher Affinität zu PS, einem Phospholipid, das unter physiologischen Bedingungen auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist. Bei Apoptose bzw. bei der Eryptose, der Zelluntergang der Erythrozyten, wird PS jedoch von der inneren auf die äußere Zellmembranseite verlagert und dadurch an der Zelloberfläche zugänglich. Durch diese Verlagerung kann Annexin V spezifisch an apoptotische bzw. eryptotische Zellen binden und so zwischen apoptotischen und gesunden Zellen unterscheiden.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde der Anteil der Annexin V-positiven Zellen vor der TAVI mit einem Mittelwert von 0,19 % (SD = 0,002) bestimmt. Postinterventionell sank dieser Wert signifikant auf 0,07 % (SD = 0,000). Die statistische Auswertung mittels t-Test ergab einen p-Wert von 0,04, welcher einen signifikanten Unterschied zwischen den prä- und postinterventionellen Messungen belegt.



**Abb. 8: Annexin V-positive Färbung auf RBCs zeigt an, dass die Eryptose nach TAVI abnahm (n=24 vor bzw. nach TAVI)**

Zusammenfassend ergibt sich das Bild, dass nach TAVI eine tendenzielle Abnahme junger Erythrozyten zu beobachten ist, während die strukturelle Integrität der Erythrozytenmembran unverändert bleibt. Gleichzeitig konnte ein signifikanter Rückgang eryptotischer Zellen nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich als nächster logischer Schritt die gezielte Untersuchung der Hämoglobinfreisetzung, um den postulierten Zusammenhang zwischen Erythrozytenschädigung und endothelialer Dysfunktion weiter zu validieren und mechanistisch zu untermauern.

### 3.2 ELISA

Wegen der zuvor beschriebenen Ergebnisse der FACS-Versuche wurde vermutet, dass die mechanische Fragmentierung von Erythrozyten zur erhöhten Expression von Hämoglobin bei AS-Patienten führen könnte. Daher wurden weitere Proben von AS-Patienten entnommen, gewaschen, sechs Stunden lang im Puffer inkubiert und anschließend das freigesetzte zellfreie Hämoglobin im Überstand von RBCs mittels eines ELISAs bestimmt. Bei diesen Untersuchungen wurden zwanzig Probanden ( $n = 20$ ) mit jeweils zwei Messungen vor und nach Intervention für die statistischen Analysen verwendet.

Während der Analyse traten in einigen Proben und Standards braune Ausfälle auf, was auf eine Signal-Sättigung im ELISA hindeutet und die Genauigkeit der Messungen bei hohen Konzentrationen einschränkt. Insgesamt zeigte sich, dass die Konzentration des freigesetzten zellfreien Hämoglobins bei AS-Patienten höher war als die üblichen Normwerte für Erwachsene (13,5–17,5 g/dl bei Männern, 12–16 g/dl bei Frauen). Nach TAVI betrug der Mittelwert der eHb-Konzentration 27,37 ng/ml (SD = 13,14), vor TAVI lag er bei 23,46 ng/ml (SD = 9,00). Ein t-Test ergab einen p-Wert von 0,279, sodass die beobachtete Erhöhung statistisch nicht signifikant war.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwar eine Tendenz zu einer höheren Freisetzung unter Inkubation von eHb nach TAVI erkennbar ist, die mechanische Belastung der Erythrozyten und die damit verbundene Hämoglobinfreisetzung jedoch in diesem kleinen Patientenkollektiv nicht signifikant nachweisbar war. Die Signal-Sättigung im ELISA legt nahe, dass für zukünftige Untersuchungen alternative Methoden oder Verdünnungsansätze notwendig sein könnten, um eine genauere Quantifizierung bei hohen eHb-Konzentrationen zu ermöglichen.

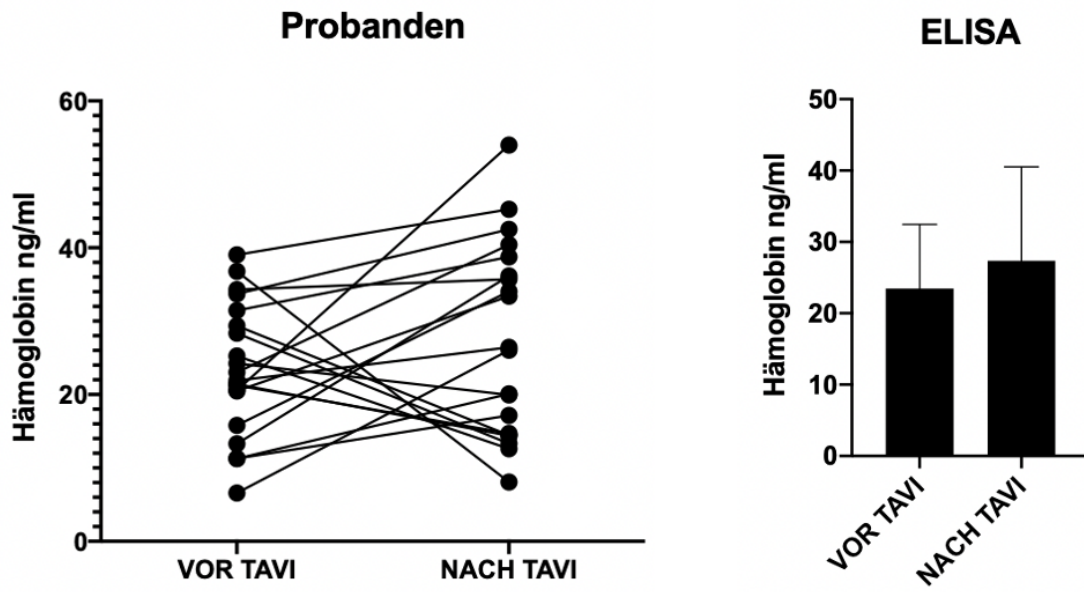


Abb. 9: Zellfreies Hämoglobin (n=20 vor bzw. nach TAVI)

### 3.3 Periprozedurale Blutentnahmen

Da sowohl in den Versuchen zur Integrität der RBCs als auch in den Analysen zur Freisetzung von zellfreiem Hämoglobin (eHb) ein klarer, AS-abhängiger Effekt nachgewiesen werden konnte, der auf eine mechanisch bedingte Schädigung der Erythrozyten mit konsekutiver Hämoglobinfreisetzung, Abfangen von NO und letztlich auf eine endotheliale Dysfunktion hinweist, wurde im nächsten Schritt gezielt untersucht, wo die Quelle dieser erhöhten eHb-Konzentrationen liegt. Ziel war es, den Entstehungsort der Hämolyse unter den hämodynamischen Bedingungen der AS zu identifizieren und mögliche Veränderungen unmittelbar nach der Intervention zu erfassen.

Um den Ursprung dieser im ELISA gemessenen erhöhten Hämoglobin-Werte zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt an vier Stellen periprozedural bei TAVI das Hämoglobin und Haptoglobin (Hp) bei Patienten mit Aortenklappenstenose sowohl vor als auch nach der Implantation des Klappenersatzes mittels IMA-Katheter entnommen. Die Analysen von eHb und Hp wurden im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie und Labordiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Die Entnahmestellen wurden im Vorfeld auf den linken Ventrikel, die koronare Tasche, die Aorta ascendens und die Aorta descendens festgelegt.

Insgesamt wurden 57 Probanden (n=57) präimplantativ untersucht. Bei 55 Probanden lagen vollständige postimplantative Datensätze vor; bei einem Probanden wurden alle postimplantativen Messungen von den Operateuren versehentlich nicht erhoben, bei einem weiteren fehlten die Hämoglobin- und Haptoglobinwerte auf Klappenebene. Alle Probanden wurden dennoch in die statistische Analyse eingeschlossen, da zur Auswertung Mixed-Effects-Modelle verwendet wurden, die auch mit unvollständigen Datensätzen umgehen können. Hämolytische Hämoglobinwerte über 25 mg/dl wurden ausgeschlossen, um physiologisch unrealistische Messartefakte zu vermeiden.

Im Rahmen des Tukey's Multiple Comparisons Tests wurden die Mittelwertunterschiede zwischen den einzelnen Messpunkten vor Implantation der Klappe untersucht. Zwischen dem linken Ventrikel und der Klappenebene zeigte sich kein signifikanter Unterschied (MD: 1,012; 95%-KI: -0,812 bis 2,835;  $p = 0,4587$ ). Ebenso konnte zwischen dem LV und der absteigenden Aorta kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (MD: 1,359; 95%-KI: -0,380 bis 3,098;  $p = 0,1728$ ). Der Vergleich zwischen der Klappenebene und der aufsteigenden Aorta ergab ebenfalls keine signifikante Differenz (MD: 0,928;

95%-KI: -0,436 bis 2,292;  $p = 0,2820$ ). Auch zwischen der Klappenebene und der absteigenden Aorta (MD: 0,348; 95%-KI: -1,464 bis 2,159;  $p = 0,9559$ ) sowie zwischen der aufsteigenden und der absteigenden Aorta (MD: -0,580; 95%-KI: -2,446 bis 1,285;  $p = 0,8408$ ) konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich lediglich zwischen dem linken Ventrikel und der aufsteigenden Aorta (MD 1,939; 95%-KI: 0,021 bis 3,858;  $p = 0,0466$ ).

**Tabelle 4: Mixed-Effects-Analyse des eHb vor TAVI**

Vergleich	Mean Diff.	95 % CI of diff.	Significant	Summary	Adjusted p Value
LV vs. Valve	1,012	-0,8116 to 2,835	No	ns	0,4587
LV vs. Ao asc	1,939	0,02107 to 3,858	Yes	*	0,0466
LV vs. Ao desc	1,359	-0,3797 to 3,098	No	ns	0,1728
Valve vs. Ao asc	0,9278	-0,4359 to 2,292	No	ns	0,2820
Valve vs. Ao desc	0,3476	-1,464 to 2,159	No	ns	0,9559
Ao asc vs. Ao desc	-0,5802	-2,446 to 1,285	No	ns	0,8408

Zusammenfassend zeigt der Tukey's Multiple Comparisons Test vor der Klappenimplantation, dass die Mittelwerte des zellfreien Hämoglobins zwischen den meisten Messpunkten – einschließlich linksventrikulärem Ausflusstrakt, Klappenebene und Aortenabschnitten – nicht signifikant variieren, mit Ausnahme eines signifikant höheren Wertes im linken Ventrikel im Vergleich zur aufsteigenden Aorta.

Nach der Klappenimplantation wurde ein erneuter Tukey's Multiple Comparisons Test durchgeführt, um die Unterschiede der Mittelwerte des zellfreien Hämoglobins zwischen den verschiedenen Messpunkten zu analysieren. Zwischen dem linken Ventrikel und der Klappenebene zeigte sich kein signifikanter Unterschied (MD: -0,369; 95%-KI: -2,639 bis 1,901;  $p = 0,9724$ ). Im Gegensatz dazu konnten zwischen dem linken Ventrikel und

der aufsteigenden Aorta sowie zwischen dem linken Ventrikel und der absteigenden Aorta signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die mittlere Differenz betrug hierbei 2,173 (95%-KI: 0,358 bis 3,989;  $p = 0,0131$ ) bzw. 1,861 (95%-KI: 0,184 bis 3,539;  $p = 0,0243$ ).

Darüber hinaus zeigte der Vergleich zwischen der Klappenebene und der aufsteigenden Aorta einen hochsignifikanten Unterschied (MD: 2,542; 95%-KI 0,697 bis 4,387;  $p = 0,0033$ ). Auch zwischen der Klappenebene und der absteigenden Aorta konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (MD: 2,230; 95%-KI: 0,278 bis 4,182;  $p = 0,0192$ ). Zwischen der aufsteigenden und der absteigenden Aorta hingegen bestand kein signifikanter Unterschied (MD:  $-0,312$ ; 95%-KI:  $-1,405$  bis  $0,781$ ;  $p = 0,8729$ ).

**Tabelle 5: Mixed-Effects-Analyse des eHb nach TAVI**

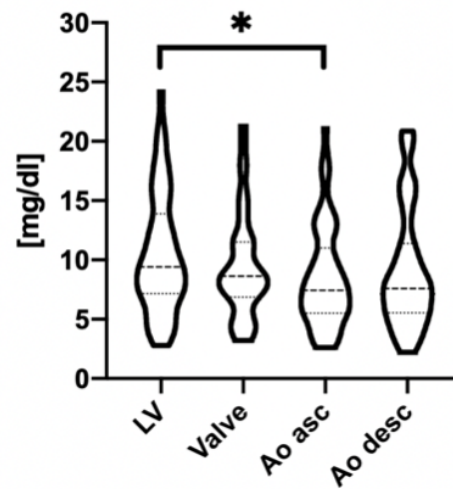
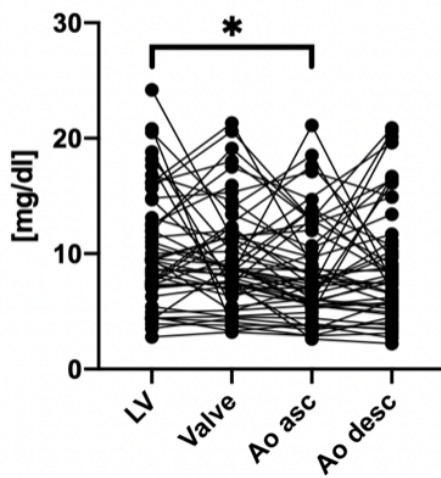
Vergleich	Mean Diff.	95 % CI of diff.	Significant	Summary	Adjusted p Value
LV vs. Valve	0,3691	-2,639 to 1,901	No	ns	0,9724
LV vs. Ao asc	2,173	0,3575 to 3,989	Yes	*	0,0131
LV vs. Ao desc	1,861	-0,1836 to 3,539	Yes	*	0,0243
Valve vs. Ao asc	2,542	0,6972 to 4,387	Yes	**	0,0033
Valve vs. Ao desc	2,230	0,2782 to 4,182	Yes	*	0,0192
Ao asc vs. Ao desc	$-0,3120$	$-1,405$ to $0,7807$	No	ns	0,8729

Die Analyse zeigt, dass nach der Klappenimplantation die zellfreien Hämoglobinwerte insbesondere zwischen dem linken Ventrikel bzw. der Klappenebene und den Aortenabschnitten signifikant ansteigen, während zwischen der aufsteigenden und der absteigenden Aorta keine relevanten Unterschiede bestehen.

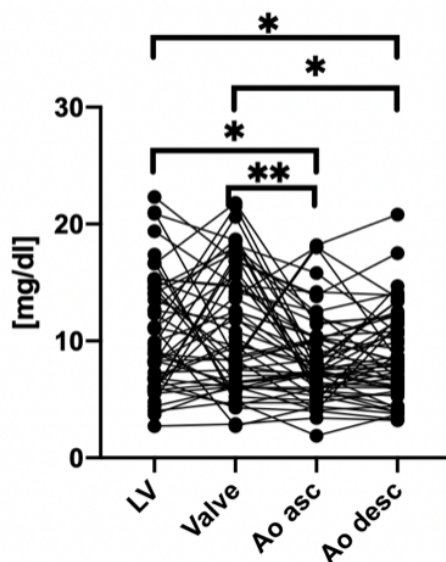
Ein Vergleich der Hämoglobinmittelwerte vor und nach der Klappenimplantation auf den einzelnen Messpunkten zeigte, dass die höchsten präimplantatorischen Werte im linksventrikulären Ausflusstrakt mit einem Mittelwert von 10,47 mg/dl (SD = 5,08) gemessen wurden. Postimplantatorisch stiegen die Werte geringfügig auf 10,61 mg/dl (SD = 4,95), was jedoch keinen signifikanten Unterschied darstellt (MD: -0,147; 95%-KI: -2,395 bis 2,102;  $p = 0,9981$ ).

Auf Klappenebene zeigte sich eine Zunahme des Hämoglobins von 9,45 mg/dl (SD = 4,41) vor der Implantation auf 10,98 mg/dl (SD = 5,29) nach der Implantation, ebenfalls ohne statistische Signifikanz (MD: -1,527; 95%-KI: -3,269 bis 0,214;  $p = 0,1046$ ). Im Gegensatz dazu wurde in der Aorta ascendens und descendens eine leichte Abnahme der Hämoglobinwerte beobachtet: In der Aorta ascendens sank der Mittelwert von 8,52 mg/dl (SD = 4,28) auf 8,44 mg/dl (SD = 3,76), in der Aorta descendens von 9,11 mg/dl (SD = 5,07) auf 8,75 mg/dl (SD = 3,82). Diese Veränderungen waren ebenfalls nicht signifikant, sowohl in der Aorta ascendens (MD: 0,087; 95%-KI: -1,448 bis 1,622;  $p = 0,9988$ ) als auch in der Aorta descendens (MD: 0,355; 95%-KI: -1,667 bis 2,377;  $p = 0,9657$ ).

### Cell-free Hemoglobin before TAVI    Cell-free Hemoglobin before TAVI



### Cell-free Hemoglobin after TAVI



### Cell-free Hemoglobin after TAVI

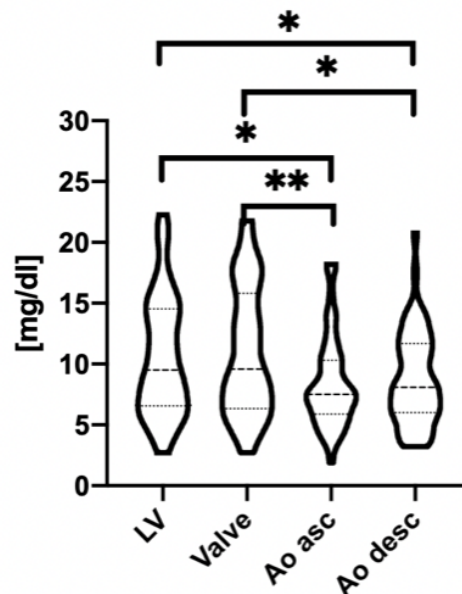


Abb. 10: Zellfreies Hämoglobin vor und nach TAVI gemessen auf Höhe des LV, Klappen-ebene, Aorta ascendens und Aorta descendens (n = 57 vor bzw. n = 55 vollständig postimplantativ nach TAVI).

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den Hämoglobinwerten an den verschiedenen Messstellen und den kardiovaskulären Begleiterkrankungen arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus sowie koronarer Herzkrankheit (KHK) wurden punktweise Korrelationen berechnet. Die Korrelationen zwischen den Hämoglobinwerten und den Begleiterkrankungen zeigten insgesamt nur schwache Zusammenhänge. Eine relevante positive Korrelation fand sich zwischen

Hyperlipoproteinämie und den Hämoglobinwerten besonders präimplantativ im linken Ventrikel ( $r = 0,27$ ) sowie in der Aorta descendens ( $r = 0,34$ ) und postimplantativ an allen vier Stellen ( $r$  zwischen  $0,25$  und  $0,48$ ). Schwach positive, aber klinisch wenig relevante Korrelationen bestanden zudem zwischen Hypercholesterinämie und dem Hämoglobinwert im linken Ventrikel ( $r = 0,05$ ) sowie zwischen KHK und den Hämoglobinwerten im linken Ventrikel ( $r = 0,09$ ). Durchgehend negative Korrelationen zeigten sich insbesondere zwischen Diabetes mellitus und den Hämoglobinwerten, am deutlichsten präimplantativ im linken Ventrikel ( $r = -0,22$ ) und in der Aorta descendens ( $r = -0,26$ ) sowie postimplantativ in der Aorta ascendens ( $r = -0,28$ ). Zwischen arterieller Hypertonie und den Hämoglobinwerten als auch zwischen Hypercholesterinämie und den Hämoglobinwerten bestanden keine relevanten Zusammenhänge ( $r$  zwischen  $-0,05$  und  $0,1$  bzw.  $r$  zwischen  $-0,18$  und  $0,06$ ). Zur Beurteilung der Signifikanz der berechneten punktbiserialen Korrelationen wurde ein zweiseitiges Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zugrunde gelegt. Keine der untersuchten Korrelationen erreichte dabei statistische Signifikanz.

Die Hämoglobinwerte vor der TAVI wurden hinsichtlich ihrer Mittelwerte an den verschiedenen Messpunkten miteinander verglichen. Dabei zeigte sich zwischen dem linken Ventrikel und der Klappenebene kein signifikanter Unterschied (MD:  $-1,193$ ; 95%-KI:  $-3,344$  bis  $0,958$ ;  $p = 0,4631$ ). Auch die Vergleiche zwischen LV und der aufsteigenden Aorta (MD:  $-0,597$ ; 95%-KI:  $-3,315$  bis  $2,122$ ;  $p = 0,9374$ ) sowie zwischen LV und der absteigenden Aorta (MD:  $-1,070$ ; 95%-KI:  $-3,311$  bis  $1,171$ ;  $p = 0,5889$ ) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Ebenso konnten zwischen der Klappenebene und der aufsteigenden Aorta (MD:  $0,597$ ; 95%-KI:  $-1,522$  bis  $2,715$ ;  $p = 0,8782$ ) sowie zwischen der Klappenebene und der absteigenden Aorta (MD:  $0,123$ ; 95%-KI:  $-1,356$  bis  $1,602$ ;  $p = 0,9962$ ) keine signifikanten Differenzen festgestellt werden. Auch der Vergleich zwischen der aufsteigenden und der absteigenden Aorta ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (MD:  $-0,474$ ; 95%-KI:  $-2,038$  bis  $1,091$ ;  $p = 0,8533$ ).

**Tabelle 6: Mixed-Effects-Analyse des Hp vor TAVI**

Vergleich	Mean Diff.	95 % CI of diff.	Significant	Summary	Adjusted p Value
LV vs. Valve	-1,193	-3,344 to 0,9583	No	ns	0,4631
LV vs. Ao asc	-0,5965	-3,315 to 2,122	No	ns	0,9374
LV vs. Ao desc	-1,070	-3,311 to 1,171	No	ns	0,5889
Valve vs. Ao asc	0,5965	-1,522 to 2,715	No	ns	0,8782
Valve vs. Ao desc	0,1228	-1,356 to 1,602	No	ns	0,9962
Ao asc vs. Ao desc	-0,4737	-2,038 to 1,091	No	ns	0,8533

Nach der TAVI-Implantation zeigten die Haptoglobinwerte an den verschiedenen Messpunkten keine signifikanten Unterschiede untereinander. Weder zwischen dem linken Ventrikel und der Klappenebene (MD 3,090; 95%-KI: -6,036 bis 12,22;  $p = 0,8061$ ) noch zwischen dem linken Ventrikel und der aufsteigenden (MD 1,821; 95%-KI: -0,031 bis 3,674;  $p = 0,0556$ ) oder absteigenden Aorta (MD 0,732; 95%-KI: -0,627 bis 2,092;  $p = 0,4884$ ) konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Ebenso ergaben die Vergleiche zwischen der Klappenebene und der aufsteigenden (MD -1,269; 95%-KI: -10,36 bis 7,821;  $p = 0,9825$ ) bzw. absteigenden Aorta (MD -2,358; 95%-KI -11,50 bis 6,781;  $p = 0,9028$ ) sowie zwischen der aufsteigenden und der absteigenden Aorta (MD -1,089; 95%-KI: -3,378 bis 1,199;  $p = 0,5913$ ) keine statistisch signifikanten Differenzen.

**Tabelle 7: Mixed-Effects-Analyse des Hp nach TAVI**

Vergleich	Mean Diff.	95 % CI of diff.	Significant	Summary	Adjusted p Value
LV vs. Valve	3,090	-6,036 to 12,22	No	ns	0,8061
LV vs. Ao asc	1,821	-0,03128 to 3,674	No	ns	0,0556
LV vs. Ao desc	0,7321	-0,6273 to 2,092	No	ns	0,4884
Valve vs. Ao asc	-1,269	-10,36 to 7,821	No	ns	0,9825
Valve vs. Ao desc	-2,358	-11,50 to 6,781	No	ns	0,9028
Ao asc vs. Ao desc	-1,089	-3,378 to 1,199	No	ns	0,5913

Die statistische Analyse der Haptoglobinwerte an den einzelnen Messpunkten vor und nach der Klappenimplantation zeigt, dass das Haptoglobin präimplantationär mit einem Mittelwert von 141,7 mg/dl (SD = 80,9) am höchsten auf Klappenebene gemessen werden konnte und außerdem dort auch die höchste Senkungsrate mit einem Mittelwert von 127 mg/dl (SD = 74,4) aufweist. Das Ergebnis zeigte einen signifikanten Unterschied auf (MD: 14,72; 95%-KI: 2,912 bis 26,53;  $p = 0,0056$ ).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Haptoglobin unmittelbar nach Implantation der AS-Klappe an allen vier gemessenen Stellen signifikant absinkt. Es sinkt im linksventrikulären Ausflusstrakt von präimplantationär 140,5 mg/dl (SD = 80,92) auf postimplantationär auf einen Mittelwert von 130,1 mg/dl (SD = 74,79) deutlich (MD: 10,44; 95%-KI: 5,911 bis 14,96;  $p < 0,0001$ ). In der Aorta ascendens sinkt das Haptoglobin von präimplantationär 141,1 mg/dl (SD = 80,87) auf postimplantationär auf einen Mittelwert von 128,2 mg/dl (SD = 72,44) (MD: 12,86; 95%-KI: 7,574 bis 18,14;  $p < 0,0001$ ). In der Aorta descendens sinkt das Haptoglobin von präimplantationär 141,6 mg/dl (SD = 81,75) auf postimplantationär auf einen Mittelwert von 129,3 mg/dl (SD = 75,16) (MD: 12,24; 95%-KI: 8,170 bis 16,31;  $p < 0,0001$ ).

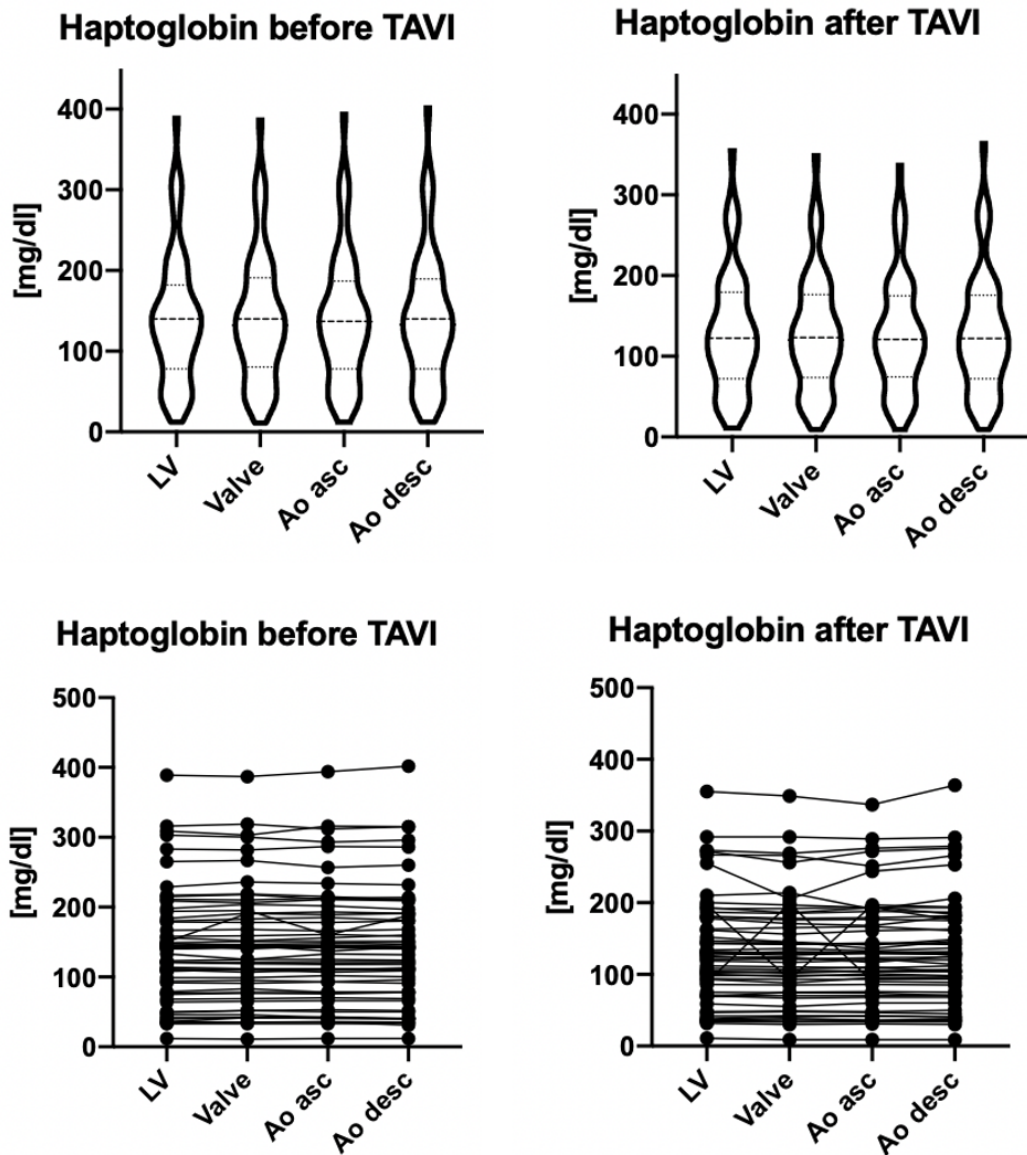


Abb. 11: Haptoglobin vor und nach TAVI gemessen auf Höhe des LV, Klappenebene, Aorta ascendens und Aorta descendens (n=57 vor bzw. n= 55 vollständig postimplantativ nach TAVI).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten eine Verknüpfung zwischen der Aortenklappenstenose und einer systemischen endothelialen Dysfunktion über die Freisetzung von freiem Hämoglobin und eryptotische Erythrozyten herstellen. Die Verengung der Klappe führt zu supralvalvulären Turbulenzen und einem verwirbelten Blutfluss in der aufsteigenden Aorta und beeinflusst so interessanterweise die Integrität der Erythrozyten. Mittels der Versuche zur Bestimmung des zellfreien Hämoglobins konnte nachgewiesen werden, dass eine Störung der Erythrozyten-Integrität zu einer Hämoglobin-Ansammlung führt.

### 4.2 Veränderungen von Erythrozyten unter Scherbelastung

Hintergrund der FACS-Versuche war die Frage, ob eine Veränderung der Eigenschaften von Erythrozyten die endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit AS erklären könnte. Da die AS häufig mit Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus, chronische Nieren- und Herzinsuffizienz sowie weitere Komorbiditäten in Verbindung gebracht wird, die mit einer bekannten endothelialen Dysfunktion einhergehen, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der AS und einer endothelialen Dysfunktion vermutet (Stewart et al., 1997). Zusätzlich zu den dazu durchgeführten Versuchen sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die Funktion von Erythrozyten im Vergleich vor und nach TAVI verändert.

Nach TAVI zeigten sich deutliche Anzeichen einer Wiederherstellung der Erythrozytenintegrität, vermutlich durch eine hämodynamisch bedingte Entlastung der roten Blutkörperchen, was in mehrfacher Hinsicht klinisch und physiologisch relevant ist. Besonders auffällig war die signifikante Abnahme des Anteils Annexin-V-positiver Erythrozyten, die als Marker für Eryptose, also den programmierten Zelltod dieser Zellen, gelten. Dieser Prozess ist typischerweise durch eine Umverteilung von Phosphatidylserin in die äußere Membranschicht gekennzeichnet und wird unter anderem durch mechanischen Stress, oxidativen Schaden oder Störungen im Ionengleichgewicht ausgelöst (Lang et al., 2003). Unter den hämodynamischen Bedingungen einer AS führt die ausgeprägte Druck- und Scherbelastung im linksventrikulären Ausflusstrakt zu einer mechanischen Destabilisierung der Erythrozytenmembran und damit zu einer beschleunigten Eryptose. Studien

zeigen, dass die Scherbelastung im Bereich der Klappe Werte von 1000–1700 dyn/cm<sup>2</sup> erreichen kann, was oberhalb der Schwellenwerte für Erythrozytenschädigung liegt (Vahidkhah et al., 2016). Durch die im Versuch gemessene signifikante Abnahme des Annexin-5-Gradienten nach TAVI konnte gezeigt werden, dass der Eingriff mit einer Reduktion eryptotischer Prozesse verbunden ist. Die Reduktion eryptotischer Zellen spricht daher für eine unmittelbare Entlastung der Erythrozyten von mechanischem Stress durch die Beseitigung des Klappenhindernisses und unterstützt die Hypothese, dass die hämodynamische Normalisierung nach Klappenersatz die Erythrozytenintegrität verbessert. Möglicherweise trägt dies zur Reduktion des NO-Verbrauchs bei, da weniger zellfreies Hämoglobin freigesetzt wird, wodurch die NO-vermittelte endotheliale Funktion weniger beeinträchtigt wird (Quast et al., 2022; Quast et al., 2024).

Neben den Veränderungen der Eryptose wurde auch die Expression von CD71, einem Transferrinrezeptor und etablierten Marker für junge Erythrozyten, untersucht. Dieser sollte bei der vorliegenden Forschung hilfreich sein, um alte Erythrozyten, die kein CD71 exprimieren, von jungen Erythrozyten, die CD71 exprimieren, zu unterscheiden. Unter AS-Bedingungen kommt es häufig zu einer gesteigerten Erythrozytenneubildung, um den Verlust durch Hämolyse auszugleichen. Postinterventionell zeigte sich ein tendenzieller Rückgang der CD71-Expression, der jedoch nicht statistisch signifikant war. Pathophysiologisch könnte der Rückgang auf eine Normalisierung der Erythrozytenpopulation infolge der Beseitigung der hämodynamischen Belastung zurückzuführen sein. Der Wegfall der chronischen mechanischen Hämolyse führt zu einer reduzierten kompensatorischen Erythropoese, da die Nachproduktion unreifer Erythrozyten nicht mehr in gleichem Maße erforderlich ist. Ähnliche Beobachtungen wurden in Studien zu mechanischen Herzklappen gemacht, bei denen nach Reduktion der Scherbelastung eine Stabilisierung der Erythrozytenpopulation eintrat (Giersiepen et al., 1990). Die Ergebnisse können aber nur teilweise zur Bestätigung beziehungsweise Widerlegung unserer Hypothese herangezogen werden, da berücksichtigt werden muss, dass CD71 neben erythropoetischen Zellen und Retikulozyten auch in hoher Dichte von anderen proliferierenden Zellen exprimiert wird und daher nicht spezifisch als Erythrozytenmarker geeignet ist.

Interessanterweise blieb die Expression von CD235a (Glycophorin A), einem strukturellen Membranprotein, das durch seine negative Oberflächenladung die Aggregation von Erythrozyten verhindert, über den gesamten Untersuchungszeitraum stabil. Dies zeigt,

dass die TAVI-Prozedur selbst keine signifikante zusätzliche Schädigung der Erythrozytenmembran verursacht und die strukturelle Stabilität unverändert ist bzw. erhalten bleibt. Dies ist von klinischer Bedeutung, da prozedurale Hämolyse ein potenzielles Risiko bei kathetergestützten Eingriffen darstellt (Zhang et al., 2024). Während bei chirurgischen Eingriffen oder bei mechanischen Herzklappen gelegentlich eine prozedurbedingte Hämolyse auftritt, scheint TAVI in dieser Hinsicht hämatologisch schonend zu sein.

Die Ergebnisse stehen in engem Zusammenhang mit der Pathophysiologie der AS: Die hochgradige Stenose erzeugt turbulente Strömungen mit jet-artigen Geschwindigkeiten, die Scherwerte bis in den Bereich von 1000–1700 dyn/cm<sup>2</sup> erreichen können, wodurch nachweislich die Erythrozytenmembran geschädigt und viskoplastische Deformationen begünstigt werden (Vahidkhah et al., 2016). Solche Belastungen führen nicht zwingend zu sofortiger Hämolyse, setzen jedoch Prozesse in Gang, die sowohl die Eryptose als auch die Fragmentierung der Erythrozyten fördern. Ein zentrales pathophysiologisches Bindeglied zwischen Erythrozytenschädigung und klinischer Relevanz ist das zellfreie Hämoglobin, das bei Hämolyse in das Plasma freigesetzt wird. Freies Hämoglobin bindet NO mit nahezu diffusionslimitierter Geschwindigkeit, was zu einer drastischen Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit und damit zu endothelialer Dysfunktion führen kann (Donadee et al., 2011). Da NO eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Gefäßtonus, der Hemmung von Thrombozytenaggregation und der Aufrechterhaltung einer antiinflammatorischen Endotheloberfläche spielt, könnte die chronische NO-Depletion bei AS wesentlich zur erhöhten kardiovaskulären Morbidität beitragen. Die durch TAVI erzielte hämodynamische Entlastung unterbricht diesen Kreislauf, indem sie die mechanische Belastung der Erythrozyten reduziert, deren Integrität bewahrt und so langfristig den NO-Stoffwechsel entlastet.

Zusammengefasst sprechen die postinterventionellen Veränderungen – die Abnahme der Eryptosemarker, die Normalisierung der Erythropoese und die unveränderte stabile Membranintegrität – für einen zellschützenden Effekt von TAVI, der über die reine Verbesserung der Klappenöffnungsfläche hinausgeht und potenziell zu einer Verbesserung der vaskulären Endothelfunktion beitragen kann. Der zugrunde liegende Mechanismus besteht in der Reduktion der mechanisch bedingten Erythrozytenschädigung, die vermutlich die Freisetzung von zellfreiem Hämoglobin vermindert und damit die damit verbundene Beeinträchtigung der endothelialen, NO-vermittelten Gefäßregulation abschwächt.

Aufbauend auf den beobachteten Veränderungen der Erythrozytenintegrität und der Reduktion eryptotischer Prozesse nach TAVI stellt sich im nächsten Schritt die Frage, inwieweit diese mechanischen Belastungen der Erythrozyten bei AS-Patienten zu einer erhöhten Freisetzung von Hämoglobin und damit zu einer Beeinträchtigung der NO-vermittelten Endothelfunktion beitragen.

### 4.3 Hämolyse bei AS-Patienten

Da durch die FACS-Versuche festgestellt werden konnte, dass sich die PS-Expression der Erythrozyten vor und nach TAVI verändert und damit auf eine Beeinträchtigung der Erythrozytenintegrität hinweist, war es naheliegend herauszufinden, ob die mechanische Fragmentierung von Erythrozyten bei AS-Patienten zu einer erhöhten Freisetzung von Hämoglobin beitragen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden weitere Proben von AS-Patienten entnommen, gewaschen, sechs Stunden im Puffer inkubiert und anschließend das eHb im Überstand der Erythrozyten mittels ELISA bestimmt. Für die statistischen Analysen standen dabei zwanzig Probanden ( $n = 20$ ) mit jeweils zwei Messungen vor und nach der Intervention zur Verfügung, was eine vergleichende Analyse des Einflusses von TAVI auf die Hämoglobinkonzentration erlaubte.

Während der Messungen traten jedoch technische Herausforderungen auf. Sowohl in den Proben als auch in den Standards wurden braune Ausfällungen festgestellt, was auf eine Sättigung im ELISA hinweist. Dies limitiert die Genauigkeit der quantitativen Aussagen, insbesondere in Bereichen mit hohen Hämoglobinkonzentrationen. Trotz dieser Einschränkungen konnte gezeigt werden, dass die Konzentration des freigesetzten zellfreien Hämoglobins bei AS-Patienten insgesamt über den Normwerten gesunder Erwachsener lag, die bei Männern zwischen 13,5 und 17,5 g/dl und bei Frauen zwischen 12 und 16 g/dl liegen. Bemerkenswerterweise waren die Hämoglobinwerte nach TAVI nach Inkubation tendenziell höher als vor dem Eingriff, wobei die Unterschiede statistisch nicht signifikant waren.

Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass mechanische Belastungen der Erythrozyten im Kontext der Aortenstenose zu einer vermehrten Freisetzung von Hämoglobin führen. Die Akkumulation von eHb im Plasma kann dabei prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen: Entweder durch die Freisetzung von Hämoglobin infolge einer hämolytischen Zerstörung der Erythrozyten unter Stressbedingungen und/oder durch eine mechanisch bedingte Fragmentierung der Erythrozytenmembran, die zur Bildung von Mikrovesikeln führt (Donadee et al., 2011). Da im vorherigen Versuch nachgewiesen werden konnte, dass die TAVI mit einem verringerten Anteil an Eryptose verbunden war, deuten die erhöhten eHb-Werte auf eine Beteiligung erheblicher Scherkräfte aufgrund eines veränderten Blutflussmusters hin, das zur Fragmentierung der Erythrozyten führt. Dies hat eine verringerte Bioverfügbarkeit von endotheliale NO zur Folge, denn sowohl freies eHb als auch Hb-haltige Mikrovesikel reagieren etwa 1000mal schneller mit NO als mit

intakten Erythrozyten, wirken so als NO-Fänger und beeinträchtigen dadurch die Bioverfügbarkeit von endogenem NO, was ungünstige Folgen für die endotheliale Homöostase hat. Es gilt je mehr freies Hämoglobin wir haben, desto weniger NO gelangt zum Endothel und desto schlechter ist die Endothelfunktion (Donadee et al., 2011).

Die tendenziell höheren Hämoglobinwerte nach TAVI nach Inkubation erscheinen zunächst kontraintuitiv. Es ist jedoch denkbar, dass akute hämodynamische Veränderungen nach dem Eingriff kurzfristig zu einer erhöhten Freisetzung von Hämoglobin führen, bevor sich die Blutströmung stabilisiert und die Endothelfunktion nachhaltig verbessert. Dies könnte auf akute Reaktionen der Erythrozyten auf den Eingriff selbst, kurzfristige hämodynamische Anpassungen oder die noch nicht vollständig normalisierten Flussmuster hinweisen.

Insgesamt liefern die vorliegenden Daten wertvolle Hinweise darauf, dass die mechanische Belastung der Erythrozyten bei AS eine relevante Quelle für die Freisetzung von zellfreiem Hämoglobin darstellt. Die Beobachtungen legen nahe, dass die Aortenstenose selbst, unabhängig von begleitenden Risikofaktoren, einen pathophysiologischen Mechanismus aktiviert, der die Endothelfunktion beeinflussen könnte. Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, um die Dynamik der Hämoglobinfreisetzung vor, während und nach TAVI detaillierter zu charakterisieren und mögliche therapeutische Ansätze zur Stabilisierung der Erythrozytenintegrität zu identifizieren.

#### **4.4 Einfluss der TAVI auf transvalvuläre eHb-Konzentrationen**

Um den Ursprung der im ELISA gemessenen Werte zu untersuchen, wurden bei AS-Patienten Blutproben an vier definierten Entnahmestellen – linker Ventrikel, koronare Tasche, Aorta ascendens und Aorta descendens – sowohl vor als auch nach Klappenimplantation entnommen. Die Analyse erfolgte standardisiert im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie und Labordiagnostik.

Die präimplantatorische Analyse zeigte die höchsten eHb-Werte im linksventrikulären Ausflusstrakt (LVOT) und auf Klappenebene, während die Konzentrationen in der Aorta ascendens und descendens signifikant niedriger waren. Zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta ascendens bestand ein signifikanter Unterschied (MD = 1,939; p = 0,0466). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Region unmittelbar auf Höhe der stenosierten Aortenklappe und im LVOT den größten mechanischen Stress auf die Erythrozyten ausübt und somit als primärer Ort der Hämolyse anzusehen ist.

Ein zentraler Mechanismus für die eHb-Freisetzung ist die Eryptose, der programmierte Zelltod der Erythrozyten. Eryptotische Zellen zeigen typischerweise eine externe Präsentation von Phosphatidylserin und eine erhöhte Membranpermeabilität, die letztlich zum Membranbruch und zur Hämoglobinfreisetzung führen kann. Mechanischer Stress, wie er bei AS im LVOT entsteht, führt durch extreme Scherkräfte und Druckspitzen zu einer Destabilisierung der Zellmembran und beschleunigt diesen Prozess. Frühere Studien konnten zeigen, dass unter stark erhöhten Scherkräften eine signifikante Fragmentierung der Erythrozyten auftreten kann, die zu einer erhöhten eHb-Konzentration im Plasma führt (Sohrabi & Liu, 2017).

Neben dem mechanischen Stress trägt auch oxidativer Stress zur Membrandestabilisierung bei. ROS schädigen Membranproteine und -lipide, während eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration die Aktivierung von Scramblasen bewirkt. Diese transportieren Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, was nicht nur die Phagozytose signalisiert, sondern bei vorzeitiger Lyse der Zellen auch zur Hämoglobinfreisetzung führen kann (Spinelli et al., 2025).

Darüber hinaus ist eine direkte mechanische Fragmentation der Erythrozyten durch stark erhöhte Scherkräfte denkbar, wie sie bei schwerer AS auftreten. Unter diesen Bedingungen kann Hämoglobin ohne Aktivierung der klassischen eryptotischen Signalwege in den Kreislauf freigesetzt werden (Sohrabi & Liu, 2017). Diese Mechanismen erklären die in

der vorliegenden Untersuchung beobachteten erhöhten eHb-Konzentrationen im LVOT und untermauern die Hypothese einer primär hämodynamisch bedingten Hämolyse.

Nach TAVI zeigte sich ein verändertes Verteilungsmuster der eHb-Konzentrationen. Während zwischen LV und Klappenebene kein signifikanter Unterschied bestand (MD = -0,369; p = 0,972), ergaben sich zwischen LV und Aorta ascendens (MD = 2,173; p = 0,0131) sowie zwischen LV und Aorta descendens (MD = 1,861; p = 0,0243) signifikante Differenzen. Auch zwischen Klappenebene und den Aortenabschnitten wurden signifikante Unterschiede beobachtet (MD = 2,542; p = 0,0033 bzw. MD = 2,230; p = 0,0192).

Diese Verteilung deutet darauf hin, dass die Freisetzung von eHb weiterhin primär in unmittelbarer Nähe der Klappe stattfindet, die Konzentrationen jedoch distal im Blutstrom rasch abnehmen. Kurzfristige lokale Anstiege nach der Implantation lassen sich durch prozedurale Faktoren wie die mechanische Manipulation der Klappe, Katheterbewegungen oder vorübergehende Turbulenzen beim Entfalten der Prothese erklären (Laflamme et al., 2015).

Langfristig ist jedoch entscheidend, dass die absolute eHb-Konzentration nach TAVI insgesamt niedriger lag als vor dem Eingriff. Dies reflektiert die unmittelbare hämodynamische Entlastung der Erythrozyten, da die Prothese den transvalvulären Druckgradienten reduziert und laminare Strömungsbedingungen wiederherstellt. Die mechanisch bedingte Erythrozytenschädigung wird dadurch verhindert und der pathophysiologische Kreislauf aus eHb-Freisetzung, NO-Verbrauch und endothelialer Dysfunktion unterbrochen. Die Wiederherstellung der Endothelfunktion durch Klappenersatz unterstreicht die Bedeutung eines kontinuierlichen Blutflusses in der Aorta, da eine endotheliale Dysfunktion ein wesentlicher Faktor für eine ungünstige kardiovaskuläre Prognose ist.

Ein zusätzlicher Mechanismus zur Wiederherstellung der Endothelfunktion könnte in der schnellen Elimination von extrazellulärem Hämoglobin durch Hämopexin liegen. Bei gesunden Personen beträgt dessen Halbwertszeit etwa sieben Tage; im Komplex mit Häm reduziert sie sich auf sieben bis acht Stunden (Delanghe & Langlois, 2001). Der beschleunigte Abbau von eHb nach TAVI könnte somit zur raschen Normalisierung der endothelialen Funktion beitragen.

Die Analyse der Haptoglobinkonzentrationen untermauert die vorangegangenen Befunde und liefert zusätzliche Hinweise auf die Dynamik der Hämolyseprozesse im Rahmen der Aortenklappenstenose. Vor der TAVI zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Haptoglobinkonzentrationen zwischen den verschiedenen Entnahmestellen, was auf eine weitgehend systemische Homogenität der Hp-Spiegel hinweist. Auch nach der TAVI blieb dieses interlokale Gleichgewicht bestehen; jedoch sanken die absoluten Haptoglobinkonzentrationen an sämtlichen Messpunkten signifikant ab – am ausgeprägtesten im linken Ventrikel (MD = 10,44;  $p < 0,0001$ ) sowie in der Aorta ascendens (MD = 12,86;  $p < 0,0001$ ).

Dieser deutliche Rückgang lässt sich als Ausdruck eines akuten Haptoglobinverbrauchs interpretieren, der durch eine vermehrte Freisetzung von zellfreiem Hämoglobin insbesondere im Bereich der stenosierten Aortenklappe ausgelöst wird. Nach der Intervention gelangt vermehrt freies Hämoglobin in den Blutkreislauf, wo es rasch an Haptoglobin bindet. Der entstehende Hp-eHb-Komplex wird über den CD163-Rezeptor von Makrophagen aufgenommen und anschließend abgebaut. Entsprechend dürfte Haptoglobin vermehrt verbraucht worden sein, um das freigesetzte eHb zu neutralisieren und dessen potenziell schädigende Wirkungen – etwa die oxidative Belastung und die Abfangung von Stickstoffmonoxid – zu verhindern.

Bemerkenswert ist, dass der stärkste Hp-Abfall auf Klappenebene beobachtet wurde. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass an dieser Stelle die höchste lokale Freisetzung von eHb erfolgt. Postinterventionell ist davon auszugehen, dass sich dieses Gleichgewicht im weiteren Verlauf wieder normalisiert, sobald der akute Haptoglobinverbrauch kompensiert und die eHb-Freisetzung infolge der hämodynamischen Entlastung abnimmt.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass der TAVI-Eingriff selbst eine vorübergehende mechanische Zusatzbelastung der Erythrozyten mit sich bringt. Das Einführen und Positionieren der Klappenprothese sowie die kurzzeitig veränderten hämodynamischen Strömungsverhältnisse (Laflamme et al., 2015) können eine zusätzliche, wenn auch transiente, Freisetzung von Hämoglobin verursachen. Diese prozedural bedingten Effekte erklären möglicherweise den kurzfristigen Abfall der Haptoglobinkonzentrationen unmittelbar nach der Intervention, bevor sich das hämatologische Gleichgewicht im postinterventionellen Verlauf wieder stabilisiert.

Die Analyse möglicher Einflüsse kardiovaskulärer Begleiterkrankungen zeigte insgesamt nur schwache Korrelationen. Eine leicht positive Beziehung bestand zwischen Hyperlipoproteinämie und eHb, insbesondere im linken Ventrikel präimplantativ ( $r = 0,27$ ) und postimplantativ ( $r = 0,25-0,48$ ). Diese Beobachtung könnte auf eine gesteigerte Erythrozytenmembranempfindlichkeit bei dyslipidämischen Stoffwechsellagen hindeuten, die den Effekt mechanischer Belastung verstärken könnte.

Negative, jedoch nicht signifikante Korrelationen ergaben sich für Diabetes mellitus ( $r \approx -0,25$ ). Eine mögliche Erklärung liegt in adaptiven Membranveränderungen bei chronischer Hyperglykämie, die die mechanische Stabilität leicht erhöhen könnten. Insgesamt deuten die geringen  $r$ -Werte jedoch darauf hin, dass Begleiterkrankungen nur einen untergeordneten Einfluss auf die Hämolyseparameter haben und die mechanischen Faktoren der AS dominieren.

Das gleichzeitige Auftreten erhöhter eHb-Konzentrationen bei gleichzeitig reduzierten Haptoglobinspiegeln, insbesondere im Bereich der stenosierten Aortenklappe, weist auf einen engen Zusammenhang zwischen der Schwere der Aortenklappenstenose und dem Ausmaß der Hämolyse hin. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Hämolyse nicht lediglich ein epiphänomenologisches Begleitphänomen der hämodynamischen Belastung ist, sondern potenziell einen aktiven pathophysiologischen Prozess darstellt, der zur endothelialen Dysfunktion beitragen könnte.

Freies Hämoglobin fungiert dabei möglicherweise als zentraler Mediator. Aufgrund seiner hohen Affinität zu NO bindet eHb NO im Blutkreislauf und reduziert dadurch dessen Bioverfügbarkeit. Es entsteht eine funktionelle „NO-Senke“, die den systemischen NO-Verbrauch erhöht und eine biochemische Depletion von NO bewirken kann. Diese verminderte NO-Verfügbarkeit könnte eine Verschlechterung der endothelialen Funktion begünstigen und damit zur vaskulären Dysfunktion beitragen, die bei Patienten mit AS häufig beschrieben wird.

Frühere Untersuchungen zeigten eine signifikant reduzierte endothelabhängige Vasodilatation bei AS, die sich nach TAVI rasch normalisierte (Vitez et al., 2023). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der eHb-Konzentrationen nach TAVI unterstützt die Annahme, dass eine Verringerung der Hämolyse potenziell zur Wiederherstellung einer normalen NO-vermittelten Endothelfunktion beitragen könnte. Damit deutet

sich an, dass die endotheliale Dysfunktion bei AS zumindest teilweise hämodynamisch und funktionell vermittelt sein könnte – und somit potenziell reversibel ist.

Der Klappenersatz mittels TAVI beseitigt nicht nur die hämodynamische Obstruktion und reduziert den Scherstress, sondern könnte auch indirekt zur Normalisierung der NO-Homöostase beitragen, indem er die durch freies Hämoglobin verursachte „NO-Senke“ eliminiert. In der Folge dürfte der systemische NO-Verbrauch abnehmen, während die NO-Bioverfügbarkeit ansteigt, was eine Verbesserung der endothelialen Funktion begünstigen könnte.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass die Aortenklappenstenose über mechanisch induzierte Erythrozytenschädigung und eHb-Freisetzung eine biochemische Kaskade auslösen kann, die mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit und potenzieller endothelialer Dysfunktion assoziiert ist. Dieses pathophysiologische Konzept eröffnet neue therapeutische Perspektiven. Einerseits könnte eine gezielte pharmakologische Abfangung von freiem Hämoglobin – etwa durch Haptoglobin- oder Hämopexin-Substitution – den systemischen NO-Verbrauch reduzieren und die endotheliale Funktion stabilisieren. Andererseits stellt die Optimierung hämodynamischer Strömungsmuster durch TAVI eine funktionelle Intervention dar, die nicht nur mechanische, sondern auch molekulare Pathomechanismen adressiert.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit Hinweise auf einen plausiblen mechanistischen Zusammenhang zwischen Aortenklappenstenose, Hämolyse, eHb-Akkumulation, NO-Verbrauch und potenzieller endothelialer Dysfunktion. Die nach der TAVI beobachtete Normalisierung der hämatologischen Parameter unterstreicht die klinische Relevanz dieser Mechanismen und deutet darauf hin, dass hämodynamische Entlastung tiefgreifende Auswirkungen auf die vaskuläre Homöostase haben könnte.

## 4.5 Limitationen der Studie

Trotz der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur pathophysiologischen Bedeutung der mechanischen Erythrozytenschädigung bei AS und der potenziellen positiven Effekte der TAVI auf die Erythrozyten- und Endothelfunktion weist die Studie mehrere Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Ein zentrales methodisches Limit stellt die geringe Probandenzahl dar. Die statistische Aussagekraft ist dadurch begrenzt, insbesondere im Hinblick auf differenzierte Subgruppenanalysen und das Erkennen kleiner Effekte. Die beschränkte Stichprobe erhöht zudem die Anfälligkeit für Zufallsergebnisse sowie Typ-2-Fehler. Darüber hinaus wurden die Patienten nicht randomisiert oder nach relevanten klinischen Variablen wie Alter, Geschlecht, Komorbiditäten oder Schweregrad der Stenose stratifiziert. Dies kann zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen und limitiert die Generalisierbarkeit der Befunde.

Die Nachbeobachtung beschränkte sich auf einen sehr kurzen Zeitraum von ein bis drei Tagen nach TAVI. Dies ermöglicht lediglich Aussagen über akute Effekte, lässt jedoch keine Rückschlüsse auf mittel- oder langfristige Veränderungen der Erythrozytenintegrität oder endothelialen Funktion zu. Potenziell relevante Spätveränderungen, wie eine vollständige Normalisierung der Hämodynamik oder adaptive vaskuläre Prozesse, bleiben unbeobachtet. Ein erweitertes Follow-up wäre erforderlich, um die Stabilität der beobachteten Effekte zu bewerten.

Die Blutproben wurden bei jedem Probanden einen Tag vor sowie ein bis drei Tage nach der TAVI jeweils in einem Heparin-Röhrchen entnommen. Parallel dazu wurden die Probanden zu demografischen und klinischen Variablen wie Alter, Geschlecht, Körpergröße und -gewicht, Rauchstatus sowie das Vorliegen von Diabetes, arterieller Hypertonie und Niereninsuffizienz befragt. Die Reliabilität der Selbstauskünfte zu Körpergröße, Gewicht und Rauchverhalten konnte nicht unabhängig überprüft werden.

Die Verwendung von Heparin-Röhrchen diente der Blockierung der Gerinnungskaskade, sodass alle Proben einer Sequenz gemeinsam im Labor aufbereitet werden konnten. Obwohl die Blutentnahmen durch dieselbe Person erfolgten, muss aber bedacht werden, dass die Blutabnahme von verschiedenen Faktoren abhängt. Zwar wurde bei der Blutabnahme versucht, die Stauzeit möglichst kurz zu halten und alle Proben im Liegen zu entnehmen,

um Anstiege von Blutzellen, Makromolekülen und proteingebundenen Substanzen sowie Lagewechsel-bedingte Veränderungen wie Hämokonzentration oder Hämodilution zu vermeiden, dennoch können unveränderbare Faktoren wie Alter und Geschlecht die Ergebnisse beeinflussen und müssen berücksichtigt werden.

Die Durchführung der FACS-Analyse unterlag mehreren potenziellen Fehlerquellen. Zur Untersuchung der Erythrozytenfunktion wurden die auf Erythrozyten exprimierte Antikörper CD71, CD235a und Annexin-5 mittels Durchflusszytometrie detektiert und in FlowJo analysiert. Diese liefern zwar Hinweise auf Eryptose, Erythropoese und strukturelle Integrität, erfassen jedoch nur einen Teilaspekt der komplexen Erythrozytenbiologie. Dabei wurde auch eine ungefärbte Kontrollprobe einbezogen. Es ist jedoch fraglich, ob die Analyse dieser drei Marker allein ausreicht, um umfassende Schlussfolgerungen zur Erythrozytenfunktion zu ziehen. Ein methodischer Schwachpunkt zeigte sich in den Densitometrie-Auswertungen der Negativkontrolle: Obwohl logischerweise keine gefärbten Zellen erwartet wurden, konnten einzelne gefärbte Zellen im Gate nachgewiesen werden, was auf mögliche Kontaminationen („Carry-over“) hinweist. Neben der routinemäßig erfolgten Dekontamination und intensiven Reinigung etwa vor und nach Beendigung einer Messreihe wurden daher auch weitere Maßnahmen wie die Messung von Reinstwasser unternommen, um einen möglichen Übertrag von Partikeln zu verringern.

Ein weiterer möglicher Bias ergibt sich aus der nacheinander erfolgten Messung der Proben in der Durchflusszytometrie. Daher ist die relativ lange Dauer der Messsequenz als Abweichung zu sehen, da die Probenvorbereitung, bestehend aus Anfärbung und Inkubation, nur zu annähernd dem gleichen Zeitpunkt für alle Proben der Sequenz erfolgte. Dies ist mit möglichen Änderungen der Anfärbung der Zelle und deren Signalintensität verbunden. Letztlich muss geprüft werden, ob die erzielten Ergebnisse repliziert werden können. Bei ähnlichen Versuchen sollten daher mehrere Versuchsreihen der gleichen Probe durchgeführt werden, um den Einfluss der besagten Messdauer ausschließen beziehungsweise adäquat berücksichtigen zu können.

Zusätzlich wurde das Gating in FlowJo manuell durchgeführt, wodurch subjektive Unterschiede in der Gate-Definition auftreten können trotz etablierter Standard-Protokolle.

Trotz dieser methodischen Einschränkungen erlauben die Durchflusszytometrien nach Antikörperfärbung eine quantitative Auswertung der Erythrozytenexpression, die statistisch analysiert und entsprechend interpretiert werden konnte. Die Ergebnisse deuten

darauf hin, dass TAVI mit einer Verbesserung der Erythrozytenfunktion und möglicherweise auch der Endothelfunktion einhergeht. Künftige Studien sollten neben einer größeren Kohorte auch längere Follow-up-Zeiträume einschließen, um die Dynamik der Erythrozytenintegrität nach TAVI besser charakterisieren zu können. Zusätzlich wäre die Einbeziehung einer Kontrollgruppe ohne AS, die mehrfache Messung identischer Proben zur Prüfung der Reproduzierbarkeit sowie der Einsatz zusätzlicher Erythrozytenmarker sinnvoll, um die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen.

Die ELISA-Messungen zur Quantifizierung von zellfreiem Hämoglobin unterlagen mehreren methodischen Einschränkungen, die die Aussagekraft der Ergebnisse limitieren. Die fehlende statistische Signifikanz kann unter anderem auf die geringe Probenzahl ( $n = 20$ ) zurückgeführt werden, welche die Detektion subtiler Veränderungen erschwert und die Gefahr von Zufallseffekten erhöht. Hinzu kommt eine ausgeprägte Streuung der Messwerte, die durch individuelle Unterschiede in den Ausgangs-Hämoglobinwerten, die variable Dauer der In-vitro-Inkubation sowie technische Variabilitäten im ELISA-Verfahren selbst begünstigt wurde.

Ein wesentlicher limitierender Faktor war die beobachtete Sättigung im oberen Bereich der Standardkurve. Diese führte dazu, dass insbesondere hohe Hämoglobinkonzentrationen nicht mehr zuverlässig quantifiziert werden konnten, was die Interpretation der tatsächlichen Ausprägung der eHb-Freisetzung erschwert. Solche Sättigungseffekte beeinträchtigen die Genauigkeit der Messergebnisse erheblich und können zur Verzerrung der Daten im oberen Konzentrationsbereich führen.

Für zukünftige Studien erscheint die Optimierung des Messprotokolls zwingend erforderlich. Dazu zählen die Anwendung geeigneter Verdünnungsstrategien, die Verwendung alternativer Detektionsmethoden mit erweitertem dynamischem Messbereich sowie die Standardisierung der Inkubationszeiten. Darüber hinaus sollte eine größere Kohorte untersucht werden, um die statistische Power zu erhöhen und den Einfluss individueller Variabilität besser kontrollieren zu können. Auch die Berücksichtigung potenziell einflussreicher Faktoren wie Alter und Reifungsgrad der Erythrozyten, vorbestehender Anämien oder komorbider kardiovaskulärer Erkrankungen würde die Validität und Differenzierung der Ergebnisse verbessern.

Bei der Interpretation der beobachteten Veränderungen der eHb- und Haptoglobinkonzentrationen müssen zusätzlich methodische Einschränkungen der Studie berücksichtigt werden. Die Blutentnahmen erfolgten durch unterschiedliche Operateure, sodass sich der exakte Entnahmeort um wenige Millimeter unterscheiden konnte. Die Proben wurden über längere Zeit auf Eis gelagert, bis sie nach drei bis vier Eingriffen am OP-Tag im Zentrallabor von unterschiedlichen Laboranten analysiert wurden, was zusätzliche Messungenauigkeiten mit sich bringen kann. Zudem können die klinische Behandlung selbst, invasive Eingriffe, intravenöse Flüssigkeitsgabe oder weitere Blutentnahmen kurzfristig zu einem kurzfristigen Anstieg von eHb führen. Diese iatrogenen Einflüsse müssen bei der Interpretation von Daten berücksichtigt werden. Unveränderbare Faktoren wie Alter und Geschlecht können ebenfalls einen Einfluss auf die Ergebnisse nehmen und sind daher entsprechend zu berücksichtigen. Interessant wären außerdem Vergleichsmessungen von Patienten ohne AS, um zu erfahren, ob die gemessenen Gradienten von Hämoglobin und Haptoglobin spezifisch auf die AS zurückzuführen sind oder durch begleitende Risikofaktoren beeinflusst werden.

Trotz der dargelegten methodischen Limitationen liefern die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung relevante Hinweise auf die pathophysiologischen Prozesse im Rahmen der Aortenstenose sowie auf potenzielle akute Effekte der TAVI auf die Erythrozytenintegrität und die endotheliale Funktion. Die gewonnenen Befunde ermöglichen erste Hypothesen zur Rolle mechanischer Belastung bei der Entstehung hämodynamisch vermittelter Zellschäden. Vor dem Hintergrund dieser Resultate ergeben sich relevante Implikationen für zukünftige Studien.

## 4.6 Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei AS-Patienten zu einer erhöhten Anzahl eryptotischer Zellen kommt, die auf eine Schädigung der Erythrozytenmembran und eine mögliche Fragmentierung hinweisen. Darüber hinaus zeigten die Experimente tendenziell höhere Hb-Werte bei AS-Patienten, was die Hypothese stützt, dass turbulente Strömungsverhältnisse an der Aortenklappe zu einer Freisetzung von eHb beitragen können. Besonders in der aufsteigenden Aorta wurden erhöhte eHb-Konzentrationen beobachtet, was auf eine Freisetzung in unmittelbarer Nähe der Klappe hindeuten könnte. Die beobachteten Konzentrationsunterschiede stützen daher die Annahme, dass eine Schädigung der Erythrozyten zumindest teilweise beim Durchgang durch die Klappe und/oder stromaufwärts in der supralvalvulären Aorta ascendens auftreten kann. Ferner deuten sowohl die Abnahme der eryptotischen Zellen als auch die tendenzielle Abnahme des Hbs nach TAVI darauf hin, dass die durch turbulente Flussgeschwindigkeiten bedingte Belastung der Erythrozyten nach Klappenersatz reduziert wird und die endotheliale Funktion dadurch möglicherweise unmittelbar verbessert werden kann. Insgesamt legen diese Befunde nahe, dass die Aortenstenose selbst zur endothelialen Dysfunktion beitragen könnte, indem sie die Akkumulation von eHb im Plasma fördert, und dass dieser Effekt nicht allein auf begleitende Risikofaktoren zurückgeführt werden muss.

Die Arbeit liefert damit wichtige Hinweise für die klinische Praxis und zukünftige Forschung. Zukünftige klinische Studien sollten daher die Korrelation zwischen der Verbesserung der Erythrozytenintegrität, der Reduktion von eHb und messbaren Patientenergebnissen, wie körperlicher Belastbarkeit, Herzleistung oder dem Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen, untersuchen. Dies könnte helfen, Patientengruppen zu identifizieren, die entweder besonders stark von TAVI profitieren oder solche, bei denen zusätzliche therapeutische Maßnahmen sinnvoll wären.

Darüber hinaus könnte die Integration zusätzlicher Biomarker der endothelialen Funktion, wie die Messung der NO-Bioverfügbarkeit, endothelabhängiger Vasodilatation oder oxidative Stressmarker, weitere Hinweise auf die Mechanismen liefern, über die eHb die vaskuläre Funktion beeinflusst. Besonders relevant wäre es, mögliche Unterschiede zwischen Patienten mit unterschiedlicher Schwere der AS, Vorerkrankungen oder unterschiedlichen TAVI-Techniken zu identifizieren, um Risikogruppen für mechanisch induzierte Hämolyse gezielter zu charakterisieren.

Ein weiterer zukünftiger Forschungsbereich betrifft therapeutische Ansätze, die die Erythrozytenintegrität gezielt schützen oder die Freisetzung von eHb reduzieren. So könnten gezielte Maßnahmen zur Stabilisierung der Erythrozytenintegrität oder pharmakologische Strategien entwickelt werden, die die Bindung von NO durch zellfreies Hämoglobin verhindern und dadurch die NO-vermittelte Gefäßfunktion erhalten. Auch die Optimierung der TAVI-Technik selbst, etwa durch die Entwicklung von Klappen mit minimalem hämodynamischem Stress auf die Erythrozyten, könnte ein praxisrelevanter Ansatz sein.

Langfristig könnten die gewonnenen Erkenntnisse darüber hinaus auf andere hämodynamische Erkrankungen übertragen werden, bei denen Erythrozytenmechanik und Endothelfunktion eine Rolle spielen, wie etwa bei künstlichen Herzklappen, ventrikulären Unterstützungssystemen oder bei bestimmten Formen der Herzinsuffizienz. Ein vertieftes Verständnis der Zusammenhänge zwischen mechanischem Stress, Erythrozytenfragilität, eHb-Freisetzung und Endothelfunktion könnte somit nicht nur die Behandlung von AS optimieren, sondern auch neue therapeutische Strategien für eine Vielzahl hämodynamischer Erkrankungen ermöglichen. Dadurch könnten Komplikationen verringert und die Lebensqualität der Patienten nachhaltig gesteigert werden.

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse die zentrale Bedeutung mechanischer Faktoren für die Schädigung von Erythrozyten und die endotheliale Dysfunktion bei AS. Angesichts der zunehmenden Erweiterung der Indikationen für TAVI auf immer jüngere Patienten und komplexere anatomische Situationen wird ein vertieftes Verständnis der systemischen Auswirkungen von hämodynamischen Flussstörungen und deren Korrektur immer wichtiger. Die Aufrechterhaltung physiologisch optimaler hämodynamischer Bedingungen scheint daher entscheidend für die Prognose der Patienten sowie für den Erfolg und die Ergebnisse zukünftiger kardialer Eingriffe zu sein.

## 5 Literaturverzeichnis

- Aird, W. C. (2004). Endothelium as an organ system. *Crit Care Med*, 32(5 Suppl), S271-279. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000129669.21649.40>
- Aird, W. C. (2007). Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circulation Research*, 100(2), 158-173. <https://doi.org/doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>
- Aird, W. C. (2012). Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(1), a006429. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006429>
- An, X., Lecomte, M. C., Chasis, J. A., Mohandas, N., & Gratzer, W. (2002). Shear-response of the spectrin dimer-tetramer equilibrium in the red blood cell membrane. *J Biol Chem*, 277(35), 31796-31800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204567200>
- Andersson, C., & Abdulla, J. (2016). Is the use of renin–angiotensin system inhibitors in patients with aortic valve stenosis safe and of prognostic benefit? A systematic review and meta-analysis. *European Heart Journal - Cardiovascular Pharmacotherapy*, 3(1), 21-27. <https://doi.org/10.1093/ehjcvp/pvw027>
- Arsenault, B. J., Boekholdt, S. M., Mora, S., DeMicco, D. A., Bao, W., Tardif, J.-C., Amarenco, P., Pedersen, T., Barter, P., & Waters, D. D. (2014). Impact of High-Dose Atorvastatin Therapy and Clinical Risk Factors on Incident Aortic Valve Stenosis in Patients With Cardiovascular Disease (from TNT, IDEAL, and SPARCL). *The American Journal of Cardiology*, 113(8), 1378-1382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2014.01.414>
- Badiani, S., van Zalen, J., Treibel, T. A., Bhattacharyya, S., Moon, J. C., & Lloyd, G. (2016). Aortic Stenosis, a Left Ventricular Disease: Insights from Advanced Imaging. *Curr Cardiol Rep*, 18(8), 80. <https://doi.org/10.1007/s11886-016-0753-6>
- Balligand, J. L., Feron, O., & Dessy, C. (2009). eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*, 89(2), 481-534. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2007>
- Banks, A., Gaca, J., & Kiefer, T. (2020). Review of alternative access in transcatheter aortic valve replacement. *Cardiovasc Diagn Ther*, 10(1), 72-82. <https://doi.org/10.21037/cdt.2019.10.01>
- Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, 84(3), 869-901. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003>
- Boskovski, M. T., & Gleason, T. G. (2021). Current Therapeutic Options in Aortic Stenosis. *Circulation Research*, 128(9), 1398-1417. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318040>
- Brasier, A. R. (2010). The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res*, 86(2), 211-218. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq076>
- Burrage, M., Moore, P., Cole, C., Cox, S., Lo, W. C., Rafter, A., Garlick, B., Garrahy, P., Mundy, J., & Camuglia, A. (2017). Transcatheter Aortic Valve Replacement is Associated with Comparable Clinical Outcomes to Open Aortic Valve Surgery but with a Reduced Length of In-Patient Hospital Stay: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Trials. *Heart Lung Circ*, 26(3), 285-295. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2016.07.011>
- Butcher, J. T., Penrod, A. M., García, A. J., & Nerem, R. M. (2004). Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid

- flow environments. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(8), 1429-1434. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000130462.50769.5a>
- Byon, C. H., Javed, A., Dai, Q., Kappes, J. C., Clemens, T. L., Darley-USmar, V. M., McDonald, J. M., & Chen, Y. (2008). Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*, 283(22), 15319-15327. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800021200>
- Chan, K. L., Teo, K., Dumesnil, J. G., Ni, A., & Tam, J. (2010). Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation*, 121(2), 306-314. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.109.900027>
- Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., Jonas, M., Edelman, E. R., Feldman, C. L., & Stone, P. H. (2007). Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling. *JACC*, 49(25), 2379-2393. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jacc.2007.02.059>
- Chesebro, J. H., Adams, P. C., & Fuster, V. (1986). Antithrombotic therapy in patients with valvular heart disease and prosthetic heart valves. *J Am Coll Cardiol*, 8(6 Suppl B), 41b-56b. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(86\)80006-7](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(86)80006-7)
- Chiang, S. J., Daimon, M., Miyazaki, S., Kawata, T., Morimoto-Ichikawa, R., Maruyama, M., Ohmura, H., Miyauchi, K., Lee, S. L., & Daida, H. (2016). When and how aortic stenosis is first diagnosed: A single-center observational study. *J Cardiol*, 68(4), 324-328. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.10.007>
- Cicco, G., & Pirrelli, A. (1999). Red blood cell (RBC) deformability, RBC aggregability and tissue oxygenation in hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc*, 21(3-4), 169-177.
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A.-M., & Stern, D. M. (1998). Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood*, 91(10), 3527-3561. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V91.10.3527>
- Coté, N., Mahmut, A., Bosse, Y., Couture, C., Pagé, S., Trahan, S., Boulanger, M.-C., Fournier, D., Pibarot, P., & Mathieu, P. (2013). Inflammation Is Associated with the Remodeling of Calcific Aortic Valve Disease. *Inflammation*, 36(3), 573-581. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9579-6>
- Cowell, S. J., Newby, D. E., Prescott, R. J., Bloomfield, P., Reid, J., Northridge, D. B., & Boon, N. A. (2005). A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med*, 352(23), 2389-2397. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043876>
- Cribier, A., Eltchaninoff, H., Bash, A., Borenstein, N., Tron, C., Bauer, F., Derumeaux, G., Anselme, F., Laborde, F., & Leon, M. B. (2002). Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*, 106(24), 3006-3008. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000047200.36165.b8>
- Davis, G. E., & Senger, D. R. (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*, 97(11), 1093-1107. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3>
- Dawkins, S., Hobson, A. R., Kalra, P. R., Tang, A. T., Monro, J. L., & Dawkins, K. D. (2008). Permanent pacemaker implantation after isolated aortic valve

- replacement: incidence, indications, and predictors. *Ann Thorac Surg*, 85(1), 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2007.08.024>
- Dejana, E., Orsenigo, F., & Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, 121(Pt 13), 2115-2122. <https://doi.org/10.1242/jcs.017897>
- Delanghe, J. R., & Langlois, M. R. (2001). Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clin Chim Acta*, 312(1-2), 13-23. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(01\)00586-1](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(01)00586-1)
- Deonikar, P., & Kavdia, M. (2013). Contribution of membrane permeability and unstirred layer diffusion to nitric oxide-red blood cell interaction. *J Theor Biol*, 317, 321-330. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.10.025>
- Deutsch, S., Tarbell, J. M., Manning, K. B., Rosenberg, G., & Fontaine, A. A. (2006). EXPERIMENTAL FLUID MECHANICS OF PULSATILE ARTIFICIAL BLOOD PUMPS. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 38(Volume 38, 2006), 65-86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.38.050304.092022>
- Dhananjayan, R., Koundinya, K. S., Malati, T., & Kutala, V. K. (2016). Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian J Clin Biochem*, 31(4), 372-379. <https://doi.org/10.1007/s12291-015-0516-y>
- Donadee, C., Raat, N. J., Kanias, T., Tejero, J., Lee, J. S., Kelley, E. E., Zhao, X., Liu, C., Reynolds, H., Azarov, I., Frizzell, S., Meyer, E. M., Donnenberg, A. D., Qu, L., Triulzi, D., Kim-Shapiro, D. B., & Gladwin, M. T. (2011). Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation*, 124(4), 465-476. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.008698>
- Fagoonee, S., Gburek, J., Hirsch, E., Marro, S., Moestrup, S. K., Laurberg, J. M., Christensen, E. I., Silengo, L., Altruda, F., & Tolosano, E. (2005). Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading. *Am J Pathol*, 166(4), 973-983. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62319-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62319-x)
- Fedak, P. W., Verma, S., David, T. E., Leask, R. L., Weisel, R. D., & Butany, J. (2002). Clinical and pathophysiological implications of a bicuspid aortic valve. *Circulation*, 106(8), 900-904. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000027905.26586.e8>
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33(7), 829-837, 837a-837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>
- Gao, L., & Mann, G. E. (2009). Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res*, 82(1), 9-20. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp031>
- Giersiepen, M., Wurzinger, L. J., Opitz, R., & Reul, H. (1990). Estimation of Shear Stress-related Blood Damage in Heart Valve Prostheses - in Vitro Comparison of 25 Aortic Valves. *The International Journal of Artificial Organs*, 13(5), 300-306. <https://doi.org/10.1177/039139889001300507>
- Gladwin, M. T., Crawford, J. H., & Patel, R. P. (2004). The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med*, 36(6), 707-717. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.032>
- Goldberg, S. H., Elmariah, S., Miller, M. A., & Fuster, V. (2007). Insights Into Degenerative Aortic Valve Disease. *JACC*, 50(13), 1205-1213. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jacc.2007.06.024>

- Goody, P. R., Hosen, M. R., Christmann, D., Niepmann, S. T., Zietzer, A., Adam, M., Bönner, F., Zimmer, S., Nickenig, G., & Jansen, F. (2020). Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *40*(4), 885-900. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.119.313067>
- Greenberg, H. Z. E., Zhao, G., Shah, A. M., & Zhang, M. (2022). Role of oxidative stress in calcific aortic valve disease and its therapeutic implications. *Cardiovasc Res*, *118*(6), 1433-1451. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab142>
- Gross, L., & Kugel, M. A. (1931). Topographic Anatomy and Histology of the Valves in the Human Heart. *Am J Pathol*, *7*(5), 445-474.447.
- Gyamfi-Poku, I. (2021). *The role of systemic endothelial dysfunction in an experimental model of aortic valve stenosis* Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf].
- Helske-Suihko, S., Laine, M., Lommi, J., Kaartinen, M., Werkkala, K., Kovanen, P. T., & Kupari, M. (2015). Is Blockade of the Renin-angiotensin System Able to Reverse the Structural and Functional Remodeling of the Left Ventricle in Severe Aortic Stenosis? *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *65*(3), 233-240. <https://doi.org/10.1097/fjc.0000000000000182>
- Herold, S., Exner, M., & Nauser, T. (2001). Kinetic and mechanistic studies of the NO\*-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. *Biochemistry*, *40*(11), 3385-3395. <https://doi.org/10.1021/bi002407m>
- Hinton, R. B., & Yutzey, K. E. (2011). Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol*, *73*, 29-46. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142145>
- Horn, P., Stern, D., Veulemans, V., Heiss, C., Zeus, T., Merx, M. W., Kelm, M., & Westenfeld, R. (2015). Improved endothelial function and decreased levels of endothelium-derived microparticles after transcatheter aortic valve implantation. *EuroIntervention*, *10*(12), 1456-1463. [https://doi.org/10.4244/eijy14m10\\_02](https://doi.org/10.4244/eijy14m10_02)
- Humphrey, J. D. (2002). *Cardiovascular Solid Mechanics*. Springer New York, NY. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-21576-1>
- Humphrey, J. D. (2008). Mechanisms of arterial remodeling in hypertension: coupled roles of wall shear and intramural stress. *Hypertension*, *52*(2), 195-200. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.107.103440>
- Hvidberg, V., Maniecki, M. B., Jacobsen, C., Højrup, P., Møller, H. J., & Moestrup, S. K. (2005). Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood*, *106*(7), 2572-2579. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1185>
- Ignarro, L. J. (1996). Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl*, *55*, S2-5.
- James, J., Srivastava, A., Varghese, M. V., Eccles, C. A., Zemskova, M., Rafikova, O., & Rafikov, R. (2020). Heme induces rapid endothelial barrier dysfunction via the MKK3/p38MAPK axis. *Blood*, *136*(6), 749-754. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003986>
- Jeffers, A., Gladwin, M. T., & Kim-Shapiro, D. B. (2006). Computation of plasma hemoglobin nitric oxide scavenging in hemolytic anemias. *Free Radic Biol Med*, *41*(10), 1557-1565. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.017>
- Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., & Stamler, J. S. (1996). S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, *380*(6571), 221-226. <https://doi.org/10.1038/380221a0>
- Johnston, D. R., Soltesz, E. G., Vakil, N., Rajeswaran, J., Roselli, E. E., Sabik, J. F., 3rd, Smedira, N. G., Svensson, L. G., Lytle, B. W., & Blackstone, E. H. (2015). Long-term durability of bioprosthetic aortic valves: implications from 12,569 implants.

- Ann Thorac Surg*, 99(4), 1239-1247.  
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.10.070>
- Ju, H., Zou, R., Venema, V. J., & Venema, R. C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem*, 272(30), 18522-18525. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18522>
- Kameneva, M. V., Undar, A., Antaki, J. F., Watach, M. J., Calhoun, J. H., & Borovetz, H. S. (1999). Decrease in red blood cell deformability caused by hypothermia, hemodilution, and mechanical stress: factors related to cardiopulmonary bypass. *Asaio j*, 45(4), 307-310. <https://doi.org/10.1097/00002480-199907000-00010>
- Kodali, S., Pibarot, P., Douglas, P. S., Williams, M., Xu, K., Thourani, V., Rihal, C. S., Zajarias, A., Doshi, D., Davidson, M., Tuzcu, E. M., Stewart, W., Weissman, N. J., Svensson, L., Greason, K., Maniar, H., Mack, M., Anwaruddin, S., Leon, M. B., & Hahn, R. T. (2015). Paravalvular regurgitation after transcatheter aortic valve replacement with the Edwards sapien valve in the PARTNER trial: characterizing patients and impact on outcomes. *Eur Heart J*, 36(7), 449-456. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu384>
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K., & Moestrup, S. K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409(6817), 198-201. <https://doi.org/10.1038/35051594>
- Laflamme, J., Puri, R., Urena, M., Laflamme, L., DeLarochelière, H., Abdul-Jawad Altisent, O., del Trigo, M., Campelo-Parada, F., DeLarochelière, R., Paradis, J. M., Dumont, E., Doyle, D., Mohammadi, S., Côté, M., Pibarot, P., Laroche, V., & Rodés-Cabau, J. (2015). Incidence and risk factors of hemolysis after transcatheter aortic valve implantation with a balloon-expandable valve. *Am J Cardiol*, 115(11), 1574-1579. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2015.02.059>
- Lang, K. S., Duranton, C., Poehlmann, H., Myssina, S., Bauer, C., Lang, F., Wieder, T., & Huber, S. M. (2003). Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, 10(2), 249-256. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401144>
- Laude, A. J., & Prior, I. A. (2004). Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol*, 21(3), 193-205. <https://doi.org/10.1080/09687680410001700517>
- Leo, F., Hutzler, B., Ruddiman, C. A., Isakson, B. E., & Cortese-Krott, M. M. (2020). Cellular microdomains for nitric oxide signaling in endothelium and red blood cells. *Nitric Oxide*, 96, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.01.002>
- Leon, M. B., Smith, C. R., Mack, M., Miller, D. C., Moses, J. W., Svensson, L. G., Tuzcu, E. M., Webb, J. G., Fontana, G. P., Makkar, R. R., Brown, D. L., Block, P. C., Guyton, R. A., Pichard, A. D., Bavaria, J. E., Herrmann, H. C., Douglas, P. S., Petersen, J. L., Akin, J. J.,...Pocock, S. (2010). Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *N Engl J Med*, 363(17), 1597-1607. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008232>
- Levy, A. P., Asleh, R., Blum, S., Levy, N. S., Miller-Lotan, R., Kalet-Litman, S., Anbinder, Y., Lache, O., Nakhoul, F. M., Asaf, R., Farbstein, D., Pollak, M., Soloveichik, Y. Z., Strauss, M., Alshiek, J., Livshits, A., Schwartz, A., Awad, H., Jad, K., & Goldenstein, H. (2010). Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal*, 12(2), 293-304. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2793>
- Liakos, C. I., Grassos, C. A., Papadopoulos, D. P., Dimitriadis, K. S., Tsioufis, C. P., & Tousoulis, D. (2017). Arterial hypertension and aortic valve stenosis: Shedding light on a common "liaison". *Hellenic J Cardiol*, 58(4), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.hjc.2017.03.005>

- Liao, J. K. (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest*, 123(2), 540-541. <https://doi.org/10.1172/jci66843>
- Lipowsky, H. H. (2012). The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann Biomed Eng*, 40(4), 840-848. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0427-x>
- Madigan, M., & Atoui, R. (2018). Non-transfemoral access sites for transcatheter aortic valve replacement. *J Thorac Dis*, 10(7), 4505-4515. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.06.150>
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., & Yancopoulos, G. D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277(5322), 55-60. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.55>
- Malik, A. B., Lynch, J. J., & Cooper, J. A. (1989). Endothelial barrier function. *J Invest Dermatol*, 93(2 Suppl), 62s-67s. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12581072>
- Masson, J. B., Kovac, J., Schuler, G., Ye, J., Cheung, A., Kapadia, S., Tuzcu, M. E., Kodali, S., Leon, M. B., & Webb, J. G. (2009). Transcatheter aortic valve implantation: review of the nature, management, and avoidance of procedural complications. *JACC Cardiovasc Interv*, 2(9), 811-820. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2009.07.005>
- Mathieu, P., & Boulanger, M.-C. (2014). Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease. *Canadian Journal of Cardiology*, 30(9), 982-993. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.03.029>
- Meegan, J. E., Bastarache, J. A., & Ware, L. B. (2021). Toxic effects of cell-free hemoglobin on the microvascular endothelium: implications for pulmonary and nonpulmonary organ dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 321(2), L429-L439. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00018.2021>
- Miller, J. D., Chu, Y., Brooks, R. M., Richenbacher, W. E., Peña-Silva, R., & Heistad, D. D. (2008). Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol*, 52(10), 843-850. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.05.043>
- Minnecci, P. C., Deans, K. J., Zhi, H., Yuen, P. S., Star, R. A., Banks, S. M., Schechter, A. N., Natanson, C., Gladwin, M. T., & Solomon, S. B. (2005). Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest*, 115(12), 3409-3417. <https://doi.org/10.1172/jci25040>
- Mitchell, J. A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L., & Harrington, L. S. (2008). Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*, 93(1), 141-147. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.038588>
- Mohler, E. R., 3rd, Gannon, F., Reynolds, C., Zimmerman, R., Keane, M. G., & Kaplan, F. S. (2001). Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*, 103(11), 1522-1528. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.11.1522>
- Mombouli, J. V., & Vanhoutte, P. M. (1999). Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*, 31(1), 61-74. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0844>
- Mönckeberg, J. G. (1904). Der normale histologische Bau und die Sklerose der Aortenklappen. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 176(3), 472-514. <https://doi.org/10.1007/BF02041318>

- Mulligan-Kehoe, M. J. (2010). The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298(2), H295-305. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00884.2009>
- Obeagu, E. I., Igwe, M. C., & Obeagu, G. U. (2024). Oxidative stress's impact on red blood cells: Unveiling implications for health and disease. *Medicine (Baltimore)*, 103(9), e37360. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000037360>
- Oguri, A., Yamamoto, M., Mouillet, G., Gilard, M., Laskar, M., Eltchaninoff, H., Fajadet, J., Iung, B., Donzeau-Gouge, P., Leprince, P., Leguerrier, A., Prat, A., Lievre, M., Chevreul, K., Dubois-Rande, J.-L., Chopard, R., Van Belle, E., Otsuka, T., & Teiger, E. (2014). Clinical Outcomes and Safety of Transfemoral Aortic Valve Implantation Under General Versus Local Anesthesia. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 7(4), 602-610. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.113.000403>
- Osnabrugge, R. L., Mylotte, D., Head, S. J., Van Mieghem, N. M., Nkomo, V. T., LeReun, C. M., Bogers, A. J., Piazza, N., & Kappetein, A. P. (2013). Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol*, 62(11), 1002-1012. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.015>
- Otto, C. M., Kuusisto, J., Reichenbach, D. D., Gown, A. M., & O'Brien, K. D. (1994). Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*, 90(2), 844-853. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.90.2.844>
- Otto, C. M., Nishimura, R. A., Bonow, R. O., Carabello, B. A., Erwin, J. P., Gentile, F., Jneid, H., Krieger, E. V., Mack, M., McLeod, C., O'Gara, P. T., Rigolin, V. H., Sundt, T. M., Thompson, A., & Toly, C. (2021). 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 143(5), e72-e227. <https://doi.org/doi:10.1161/CIR.0000000000000923>
- Otto, C. M., & Prendergast, B. (2014). Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med*, 371(8), 744-756. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1313875>
- Owens, G. K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 75(3), 487-517. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.487>
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), 524-526. <https://doi.org/10.1038/327524a0>
- Passos, L. S. A., Nunes, M. C. P., & Aikawa, E. (2020). Rheumatic Heart Valve Disease Pathophysiology and Underlying Mechanisms. *Front Cardiovasc Med*, 7, 612716. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.612716>
- Patel, J. H., Mathew, S. T., & Hennebry, T. A. (2009). Transcatheter Aortic Valve Replacement: A Potential Option for the Nonsurgical Patient. *Clinical Cardiology*, 32(6), 296-301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/clc.20535>
- Pawade, T. A., Doris, M. K., Bing, R., White, A. C., Forsyth, L., Evans, E., Graham, C., Williams, M. C., van Beek, E. J. R., Fletcher, A., Adamson, P. D., Andrews, J. P. M., Cartlidge, T. R. G., Jenkins, W. S. A., Syed, M., Fujisawa, T., Lucatelli, C., Fraser, W., Ralston, S. H.,...Dweck, M. R. (2021). Effect of Denosumab or Alendronic Acid on the Progression of Aortic Stenosis: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Circulation*, 143(25), 2418-2427. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.121.053708>

- Pawade, T. A., Newby, D. E., & Dweck, M. R. (2015). Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key. *J Am Coll Cardiol*, *66*(5), 561-577. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.05.066>
- Perutz, M. F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, *228*(5273), 726-739. <https://doi.org/10.1038/228726a0>
- Perutz, M. F., Wilkinson, A. J., Paoli, M., & Dodson, G. G. (1998). The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, *27*, 1-34. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.1>
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*, *7*(10), 803-815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
- Pohle, K., Mäffert, R., Ropers, D., Moshage, W., Stilianakis, N., Daniel, W. G., & Achenbach, S. (2001). Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation*, *104*(16), 1927-1932. <https://doi.org/10.1161/hc4101.097527>
- Quast, C., Boenner, F., Polzin, A., Veulemans, V., Gyamfi Poku, I., Chennupati, R., Nankinova, M., Staub, N., Jokiel, J., Keyser, F., Hoffe, J., Becker, K., Leuders, P., Zako, S., Erkens, R., Jung, C., Floegel, U., Neidlin, M., & Kelm, M. (2022). Aortic valve stenosis induced occult hemoglobin release promotes endothelial dysfunction. In.
- Quast, C., Bönner, F., Polzin, A., Veulemans, V., Chennupati, R., Gyamfi Poku, I., Pfeiler, S., Kramser, N., Nankinova, M., Staub, N., Zweck, E., Jokiel, J., Keyser, F., Hoffe, J., Witkowski, S., Becker, K., Leuders, P., Zako, S., Erkens, R.,...Kelm, M. (2024). Aortic Valve Stenosis Causes Accumulation of Extracellular Hemoglobin and Systemic Endothelial Dysfunction. *Circulation*, *150*(12), 952-965. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.123.064747>
- Radomski, M. W., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, *2*(8567), 1057-1058. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)91481-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)91481-4)
- Rajamannan, N. M., Evans, F. J., Aikawa, E., Grande-Allen, K. J., Demer, L. L., Heistad, D. D., Simmons, C. A., Masters, K. S., Mathieu, P., O'Brien, K. D., Schoen, F. J., Towler, D. A., Yoganathan, A. P., & Otto, C. M. (2011). Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*, *124*(16), 1783-1791. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.006767>
- Rajamannan, N. M., Nealis, T. B., Subramaniam, M., Pandya, S., Stock, S. R., Ignatiev, C. I., Sebo, T. J., Rosengart, T. K., Edwards, W. D., McCarthy, P. M., Bonow, R. O., & Spelsberg, T. C. (2005). Calcified rheumatic valve neoangiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression and osteoblast-like bone formation. *Circulation*, *111*(24), 3296-3301. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.104.473165>
- Rayner, C., & Adams, H. (2023). Aortic stenosis and transcatheter aortic valve implantation in the elderly. *Aust J Gen Pract*, *52*(7), 458-463. <https://doi.org/10.31128/ajgp-08-22-6527>
- Reynolds, M. R., Magnuson, E. A., Lei, Y., Leon, M. B., Smith, C. R., Svensson, L. G., Webb, J. G., Babaliaros, V. C., Bowers, B. S., Fearon, W. F., Herrmann, H. C., Kapadia, S., Kodali, S. K., Makkar, R. R., Pichard, A. D., & Cohen, D. J. (2011). Health-related quality of life after transcatheter aortic valve replacement in inoperable patients with severe aortic stenosis. *Circulation*, *124*(18), 1964-1972. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.040022>

- Richards, J., El-Hamamsy, I., Chen, S., Sarang, Z., Sarathchandra, P., Yacoub, M. H., Chester, A. H., & Butcher, J. T. (2013). Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling. *Am J Pathol*, *182*(5), 1922-1931. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.037>
- Rossebø, A. B., Pedersen, T. R., Boman, K., Brudi, P., Chambers, J. B., Egstrup, K., Gerds, E., Gohlke-Bärwolf, C., Holme, I., Kesäniemi, Y. A., Malbecq, W., Nienaber, C. A., Ray, S., Skjaerpe, T., Wachtell, K., & Willenheimer, R. (2008). Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med*, *359*(13), 1343-1356. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804602>
- Rosselli, M., Keller, P. J., & Dubey, R. K. (1998). Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update*, *4*(1), 3-24. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.1.3>
- Rother, R. P., Bell, L., Hillmen, P., & Gladwin, M. T. (2005). The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama*, *293*(13), 1653-1662. <https://doi.org/10.1001/jama.293.13.1653>
- Sacks, M. S., David Merryman, W., & Schmidt, D. E. (2009). On the biomechanics of heart valve function. *J Biomech*, *42*(12), 1804-1824. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.05.015>
- Sacks, M. S., & Yoganathan, A. P. (2007). Heart valve function: a biomechanical perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *362*(1484), 1369-1391. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2122>
- Salinas, P., Moreno, R., & Lopez-Sendon, J. L. (2011). Transcatheter aortic valve implantation: Current status and future perspectives. *World J Cardiol*, *3*(6), 177-185. <https://doi.org/10.4330/wjc.v3.i6.177>
- Schoen, F. J. (2005). Cardiac valves and valvular pathology: update on function, disease, repair, and replacement. *Cardiovasc Pathol*, *14*(4), 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.03.005>
- Schölkens, B. A., Bartmann, W., Beck, G., Lerch, U., Konz, E., & Weithmann, U. (1979). Vasodilation and inhibition of platelet aggregation by prostacyclins with modified omega-side chain. *Prostaglandins Med*, *3*(1), 7-22. [https://doi.org/10.1016/0161-4630\(79\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0161-4630(79)90011-9)
- Shadwick, R. E. (1999). Mechanical design in arteries. *J Exp Biol*, *202*(Pt 23), 3305-3313. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.23.3305>
- Simionescu, D. T., Lovekamp, J. J., & Vyavahare, N. R. (2003). Degeneration of bioprosthetic heart valve cusp and wall tissues is initiated during tissue preparation: an ultrastructural study. *J Heart Valve Dis*, *12*(2), 226-234.
- Simmonds, M. J., Detterich, J. A., & Connes, P. (2014). Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology*, *51*(2-3), 121-134. <https://doi.org/10.3233/bir-140653>
- Singla, S., Sysol, J. R., Dille, B., Jones, N., Chen, J., & Machado, R. F. (2017). Hemin Causes Lung Microvascular Endothelial Barrier Dysfunction by Necroptotic Cell Death. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *57*(3), 307-314. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0287OC>
- Siu, S. C., & Silversides, C. K. (2010). Bicuspid Aortic Valve Disease. *JACC*, *55*(25), 2789-2800. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jacc.2009.12.068>
- Smith, C. R., Leon, M. B., Mack, M. J., Miller, D. C., Moses, J. W., Svensson, L. G., Tuzcu, E. M., Webb, J. G., Fontana, G. P., Makkar, R. R., Williams, M., Dewey, T., Kapadia, S., Babaliaros, V., Thourani, V. H., Corso, P., Pichard, A. D.,

- Bavaria, J. E., Herrmann, H. C.,...Pocock, S. J. (2011). Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients. *N Engl J Med*, 364(23), 2187-2198. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103510>
- Sohrabi, S., & Liu, Y. (2017). A Cellular Model of Shear-Induced Hemolysis. *Artif Organs*, 41(9), E80-e91. <https://doi.org/10.1111/aor.12832>
- Spinelli, S., Marino, A., Remigante, A., & Morabito, R. (2025). Redox Homeostasis in Red Blood Cells: From Molecular Mechanisms to Antioxidant Strategies. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(8), 655. <https://www.mdpi.com/1467-3045/47/8/655>
- Stamler, J. S., Jia, L., Eu, J. P., McMahon, T. J., Demchenko, I. T., Bonaventura, J., Gernert, K., & Piantadosi, C. A. (1997). Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, 276(5321), 2034-2037. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2034>
- Stenmark, K. R., Yeager, M. E., El Kasmi, K. C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M., Riddle, S. R., & Frid, M. G. (2013). The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol*, 75, 23-47. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802>
- Stewart, B. F., Siscovick, D., Lind, B. K., Gardin, J. M., Gottdiener, J. S., Smith, V. E., Kitzman, D. W., & Otto, C. M. (1997). Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*, 29(3), 630-634. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(96\)00563-3](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(96)00563-3)
- Takagi, H., Kuno, T., Hari, Y., Nakashima, K., Yokoyama, Y., Ueyama, H., & Ando, T. (2021). Meta-analysis of impact of renin-angiotensin system inhibitors on survival after transcatheter aortic valve implantation. *Minerva Cardiol Angiol*, 69(3), 299-309. <https://doi.org/10.23736/s2724-5683.20.05289-5>
- Talanas, G., Laconi, A., Kereiakes, D. J., Merella, P., Reardon, M. J., Spano, A., Petretto, G., Lauriola, F., Casula, M., Micheluzzi, V., Isgender, M., Chatzizisis, Y., Farkouh, M. E., Lansky, A. J., Piazza, N., Portoghese, M., Casu, G., & Navarese, E. P. (2024). Long-Term Outcomes of Transcatheter vs Surgical Aortic Valve Replacement: Meta-analysis of Randomized Trials. *J Soc Cardiovasc Angiogr Interv*, 3(7), 102143. <https://doi.org/10.1016/j.jscv.2024.102143>
- Thorin, E., & Clozel, M. (2010). The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1. *Adv Pharmacol*, 60, 1-26. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385061-4.00001-5>
- Towler, D. A. (2013). Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease. *Circ Res*, 113(2), 198-208. <https://doi.org/10.1161/circresaha.113.300155>
- Tseng, H., & Grande-Allen, K. J. (2011). Elastic fibers in the aortic valve spongiosa: a fresh perspective on its structure and role in overall tissue function. *Acta Biomater*, 7(5), 2101-2108. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.01.022>
- Vahanian, A., Beyersdorf, F., Praz, F., Milojevic, M., Baldus, S., Bauersachs, J., Capodanno, D., Conradi, L., De Bonis, M., De Paulis, R., Delgado, V., Freemantle, N., Gilard, M., Haugaa, K. H., Jeppsson, A., Jüni, P., Pierard, L., Prendergast, B. D., Sádaba, J. R.,...Wojakowski, W. (2022). 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*, 43(7), 561-632. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab395>
- Vahidkhan, K., Cordasco, D., Abbasi, M., Ge, L., Tseng, E., Bagchi, P., & Azadani, A. N. (2016). Flow-Induced Damage to Blood Cells in Aortic Valve Stenosis. *Ann Biomed Eng*, 44(9), 2724-2736. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1577-7>

- Vaughn, M. W., Huang, K. T., Kuo, L., & Liao, J. C. (2000). Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J Biol Chem*, 275(4), 2342-2348. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2342>
- Vaughn, M. W., Huang, K. T., Kuo, L., & Liao, J. C. (2001). Erythrocyte consumption of nitric oxide: competition experiment and model analysis. *Nitric Oxide*, 5(1), 18-31. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0328>
- Verde, C., Giordano, D., & Bruno, S. (2023). NO and Heme Proteins: Cross-Talk between Heme and Cysteine Residues. *Antioxidants (Basel)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antiox12020321>
- Vesely, I. (1998). The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech*, 31(2), 115-123. [https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(97\)00122-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(97)00122-x)
- Vesely, I. (2005). Heart valve tissue engineering. *Circ Res*, 97(8), 743-755. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000185326.04010.9f>
- Vitez, L., Starc, V., Jug, B., & Bunc, M. (2023). Improved Endothelial and Autonomic Function after Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Rev Cardiovasc Med*, 24(5), 140. <https://doi.org/10.31083/j.rcm2405140>
- Wagenseil, J. E., & Mecham, R. P. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev*, 89(3), 957-989. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2008>
- Wagner, D. D., Olmsted, J. B., & Marder, V. J. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol*, 95(1), 355-360. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.355>
- WHO. (2024). *Cardiovascular diseases*. <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/cardiovascular-diseases>
- Yuyun, M. F., Ng, L. L., & Ng, G. A. (2018). Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? *Microvascular Research*, 119, 7-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.03.012>
- Zhang, R., Hess, D. T., Qian, Z., Hausladen, A., Fonseca, F., Chaube, R., Reynolds, J. D., & Stamler, J. S. (2015). Hemoglobin  $\beta$ Cys93 is essential for cardiovascular function and integrated response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(20), 6425-6430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502285112>
- Zhang, Y., Fuxiang, A., Yan, M., Zhou, Y., & Bian, H. (2024). Hemolytic anemia after percutaneous coronary intervention (PCI): A case report. *Heliyon*, 10(21), e39787. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39787>

## 6 Danksagung

Die Entstehung dieser Dissertation wurde durch ein persönliches Interesse an kardiovaskulären Fragestellungen motiviert, das aus meiner eigenen Krankengeschichte mit Aortenisthmusstenose und bikuspider Aortenklappe hervorgegangen ist. Diese Erfahrungen haben mein Interesse an der Kardiologie nachhaltig geprägt und mich dazu inspiriert, mich im Rahmen dieser Arbeit intensiv mit kardiovaskulären Fragestellungen auseinanderzusetzen.

In diesem Zusammenhang danke ich Herrn Prof. Dr. Kelm und der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Möglichkeit, diese Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung der zirkulierenden Erythrozyten vor und nach TAVI“ in einem wissenschaftlich anspruchsvollen Umfeld durchführen zu dürfen.

Mein Dank gilt zudem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Tobias Zeus, für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit sowie für seine fachliche Unterstützung und die hilfreichen Impulse, die wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei meiner Betreuerin Frau Dr. Christine Quast bedanken für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die wertvollen Anregungen sowie die stetige Unterstützung während der Anfertigung dieser Dissertation. Ihr Engagement, ihre fachliche Expertise und ihre konstruktive Kritik haben maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Abschließend möchte ich meiner Mama und meinen Freunden von Herzen danken, die mich mit Geduld, Verständnis und Zuspruch auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben. Ohne ihre Rückendeckung und Ermutigung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.