

**Quantifizierung der
Cholesterinkristall-Auflösungskapazität im Serum von
Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Lara Al-Kassou
aus Mosul/Irak
2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Zimmer
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Hans Bode

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2026

Aus der Klinik und Poliklinik für Kardiologie, Angiologie, Pneumologie und Internistische
Intensivmedizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Patient:innen und Methoden	7
1.3 Ergebnisse	10
1.4 Diskussion	13
1.5 Limitationen	17
1.6 Zusammenfassung	17
1.7 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	18
2. Veröffentlichung	22
3. Erklärung zum Eigenanteil	23
4. Danksagung	24

Abkürzungsverzeichnis

AKS	Aortenklappenstenose
CC	Cholesterol crystals
CCDR	Cholesterol crystal dissolution rate
CT	Computertomographie
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Density Lipoprotein
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
TAVI	Transcatheter aortic valve implantation

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die Aortenklappenstenose (AKS) ist eine Herzklappenerkrankung, die insbesondere bei älteren Menschen eine hohe Prävalenz aufweist (Iung und Vahanian, 2011; Nkomo et al., 2006). Vor dem Hintergrund des demographischen Wandels mit steigender Lebenserwartung in den westlichen Industriestaaten ist in den kommenden Jahren mit einer zunehmenden Inzidenz dieser Erkrankung zu rechnen. Diese Entwicklung könnte zukünftig zu erheblichen Herausforderungen im Bereich des öffentlichen Gesundheitswesens und der Krankenversorgung führen (Osnabrugge et al., 2013).

Die Ätiologie der AKS ist multifaktoriell und umfasst sowohl angeborene als auch erworbene Formen (Iung et al., 2003). Die häufigste Ursache für eine angeborene AKS ist eine bikuspid angelegte Aortenklappe, die bei etwa 1 – 2 % der Bevölkerung auftritt (Huntley et al., 2018). Die erworbene AKS kann als postentzündliche Folge des rheumatischen Fiebers entstehen. Diese Form spielt allerdings aufgrund des weit verbreiteten Einsatzes von Antibiotika in Industrieländern nur noch eine untergeordnete Rolle (Nkomo et al., 2006). Die häufigste Form der erworbenen AKS stellt die primär-degenerative kalzifizierende Stenosierung dar, die durch eine fortschreitende Sklerosierung der Klappentaschen gekennzeichnet ist und vor allem ältere Menschen betrifft (Nkomo et al., 2006).

Die Pathogenese der kalzifizierenden AKS ist ein komplexer Prozess, der über die rein mechanisch induzierte Klappendegeneration hinausgeht. Der pathophysiologische Ablauf weist große Ähnlichkeiten mit der Arteriosklerose auf und beruht auf ein Zusammenspiel von Inflammationsprozessen sowie kardiovaskulären und genetischen Risikofaktoren, die zelluläre und molekulare Signalwege aktivieren (Thériault et al., 2024). Dabei begünstigt eine durch Scherkräfte verursachte Dysfunktion der Endothelzellschicht die Ablagerung von cholesterinhaltigen Lipoproteinen, wie das Low-Density Lipoprotein (LDL) und Lipoprotein A, in den Klappentaschen. Dies führt zur Bildung von Cholesterinkristallen (engl. „cholesterol crystals“, CC) im extrazellulären Raum, die eine Entzündungsreaktion mit Infiltration von Immunzellen auslösen (Rajamannan et al., 2011). Die freigesetzten

Zytokine wie Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF-alpha) fördern die Differenzierung von myofibroblastischen und osteoblastischen Zellen, die eine progrediente Fibrosierung und Kalzifizierung der Klappe bedingen (Rajamannan et al., 2003). Darüber hinaus aktiviert das durch CC stimulierte NLRP3-Inflamasom eine Immunreaktion, die über die Ausschüttung von Interleukin-1 zu einer Verstärkung der chronischen Entzündung und dem Fortschreiten der AKS führt (Duewell et al., 2010). Diese Prozesse resultieren in einer erhöhten Steifigkeit der Klappentaschen, die schließlich eine Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes bewirkt (Han et al., 2024; Stewart et al., 1997).

Im Frühstadium der AKS sorgen kompensatorische Anpassungsmechanismen, wie eine linksventrikuläre Hypertrophie, dafür, dass die Erkrankung über einen langen Zeitraum asymptomatisch bleibt (Otto et al., 2014). Die zunehmende Druckbelastung des linken Ventrikels führt allerdings zu einer diastolischen Dysfunktion mit Reduktion des Schlagvolumens und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Dweck et al., 2012). Dies führt zu klassischen Symptomen wie Dyspnoe, Angina pectoris und Synkopen (Lindman et al., 2016). Ohne Behandlung ist die Lebenserwartung der Patient:innen nach dem Auftreten dieser Symptome deutlich reduziert (Rosenhek et al., 2004; Varadarajan et al., 2006).

Für die Therapie der hochgradigen AKS stehen derzeit der chirurgische sowie der kathetergestützte Aortenklappenersatz (engl. „transcatheter aortic valve implantation“, TAVI) zur Verfügung (Zusman et al., 2018). Diese Verfahren beheben zwar unmittelbar und effektiv die Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes, greifen jedoch nicht in die zugrundeliegende, inflammatorische Pathophysiologie ein. Darüber hinaus häufen sich Berichte über Cholesterinkristallembolisationen nach TAVI, die potenziell schwerwiegende Komplikationen verursachen können. So bleiben perioperative Komplikationen und eine hohe Ein-Jahres-Mortalitätsrate trotz der unbestreitbaren Prognoseverbesserung durch den Klappenersatz eine Herausforderung, die möglicherweise auf fortschreitende Entzündungsprozesse und Kalzifizierung zurückzuführen sind. In diesem Zusammenhang ist die Erforschung der Rolle von CC, die eine entscheidende Rolle bei der Stimulation und Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen sowie pathophysiologischer Signalwege in der Entwicklung der AKS spielen, von großem klinischem Interesse.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die individuelle Fähigkeit zur Auflösung von Cholesterinkristallen im Serum von Patient:innen mit hochgradiger AKS zu quantifizieren. Zudem wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dieser Cholesterinkristall-Auflösungsrate (engl. „cholesterol crystal dissolution rate“, CCDR) und den klinischen Behandlungsergebnissen der Patient:innen besteht. In diesem Kontext wurde evaluiert, inwiefern sich die CCDR als prognostischer Biomarker zur Identifikation von Patient:innen mit erhöhter sklerotischer Aktivität und einem darauf beruhenden erhöhten Mortalitätsrisiko eignet.

1.2 Patient:innen und Methoden

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Deutschland, genehmigt (Ref.-Nr. 077/14). Insgesamt wurden 388 Patient:innen im Zeitraum von 2017 bis 2020 rekrutiert, die nach ausführlicher Aufklärung gemäß den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme erteilten. Das Kollektiv dieser prospektiven Studie bestand aus Patient:innen, die in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Bonn, eine Transkatheter-Aortenklappenimplantation aufgrund einer hochgradigen AKS erhielten. Aufgrund nicht verwertbarer Messungen wurden die Proben von 40 Patient:innen ausgeschlossen, sodass die abschließende Auswertung die Daten von 348 Patient:innen umfasste.

Im Rahmen der präinterventionellen Evaluation erfolgte eine umfassende kardiologische Diagnostik aller Patient:innen, einschließlich einer transösophagealen Echokardiographie sowie einer Koronarangiographie. Zudem erfolgte routinemäßig eine computertomographische Bildgebung (CT) vor Durchführung der TAVI. Anschließend erfolgten eine individuelle Risikobewertung und Therapieentscheidung im Rahmen der interdisziplinären Herzteam-Besprechung.

Der primäre Endpunkt der Studie war eine Kombination aus der Gesamtmortalität nach einem Jahr und schwerwiegenden Gefäßkomplikationen. Sekundäre Endpunkte

umfassten klinische Ereignisse wie Blutungskomplikationen, Herzinfarkt und Schlaganfälle innerhalb von 30 Tagen gemäß den Definitionen des Valve Academic Research Consortium 3 (VARC-3 Writing Committee et al., 2021). Zudem wurden die kardiovaskuläre und nicht-kardiovaskuläre Mortalität nach einem Jahr berücksichtigt. Zur Quantifizierung der Aortenklappen- und iliofemoralen Verkalkung wurden präoperative CT-Scans mit der 3Mensio Structural Heart Software (Pie Medical Imaging BV, Maastricht, Niederlande) analysiert, wobei spezifische Hounsfield-Einheiten zur Beurteilung des Kalziumvolumens herangezogen wurden.

Die für die Analyse verwendeten Blutproben wurden vor der TAVI-Prozedur aus dem zentralen Venenverweilkatheter der Patient:innen entnommen und in Serum-Monovetten (S-Monovette® 7,5 ml, Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland) gesammelt. Im Anschluss wurden das Serum und die korpuskulären Blutbestandteile durch Zentrifugation bei 3000 U/ min für 10 Minuten getrennt. Das gewonnene Serum wurde in der BioBank Bonn bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung der Cholesterinkristall-Lösung wurde 2 mg Cholesterin (Cholesterol, SIGMA Life Science, Saint Louis, Missouri, USA) in 1 ml Isopropanol (Propan-1-ol pure, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Anschließend wurde durch die Zugabe des 1,5-fachen Volumens endotoxinfreien, destillierten Wassers (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, LIFE Technologies Limited, Carlsbad, Kalifornien, USA) die Kristallisation des Cholesterins eingeleitet. Die Lösung wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur ruhen gelassen und danach bei 30 °C in einem Konzentratoren (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet. Die getrockneten Cholesterinkristalle wurden in PBS (pH 7,4, Life Technologies Europe BV, Bleiswijk, Niederlande) gelöst und für drei Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. Die benötigte Konzentration der Lösung wurde durch die Zugabe einer BSA-Lösung (Bovine Serum Albumin Fraction V, GE Healthcare, Pasching, Österreich) erreicht. Die endgültige Cholesterinkristall-Lösung wurde bei 4 °C in sterilen Glasbehältern aufbewahrt und vor jeder Untersuchung homogenisiert.

Für die Analyse der CCDR wurden 140 µg der vorbereiteten Cholesterinkristall-Lösung zu 150 µL Patientenserum gegeben. Zur Sicherstellung einer einheitlichen Cholesterinkristallkonzentration in den einzelnen Proben und zur Größenkalibrierung

wurden unmittelbar vor jeder Messung 10 µl Counting Beads (Count Bright Absolute Counting Beads und Flow Cytometry Size Calibration Kit, Life Technologies Corporation, Eugene, Oregon, USA) zur Lösung hinzugefügt. Hierfür wurde die Messung nach dem Erfassen von 1000 Counting Beads beendet, um eine Vergleichbarkeit der quantifizierten Cholesterinkristalllösung zu garantieren.

Die Analyse der Proben zur Bestimmung der individuellen CCDR der AKS-Patient:innen wurde fünffach durchgeführt. Die Zählung der Cholesterinkristalle im Serum erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur, Becton and Dickinson Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Die CCDR wurde sowohl unmittelbar nach der Zugabe der Cholesterinkristalllösung zum Serum als auch nach einer 2-stündigen Inkubationszeit unter kontinuierlicher, gleichmäßiger Bewegung bei 37 °C ermittelt. Zur Auswertung der gesammelten Daten wurde die FlowJo-Software (FlowJo V10, FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA) verwendet. Dabei lag der Fokus auf der Region mit der höchsten Intensität, die 50 % aller Cholesterinkristalle im Größenbereich von 3 bis 5 µm repräsentierte. Diese Region konnte durch eine Referenzmessung der isolierten Cholesterinkristalle ohne Serumzusatz ermittelt werden. Zudem wurden die Rohdaten der Counting Beads mithilfe der FlowJo-Software vor der Auswertung subtrahiert, um eine Trennung von den Cholesterinkristallen sicherzustellen. Darüber hinaus wurde der messbare Serumhintergrund ausgeschlossen. Dies war möglich, da für jedes Serum eine zusätzliche Kontrollmessung ohne Zugabe von Cholesterinkristallen durchgeführt wurde, wodurch signalbedingte Veränderungen eindeutig den Cholesterinkristallen zugeordnet werden konnten.

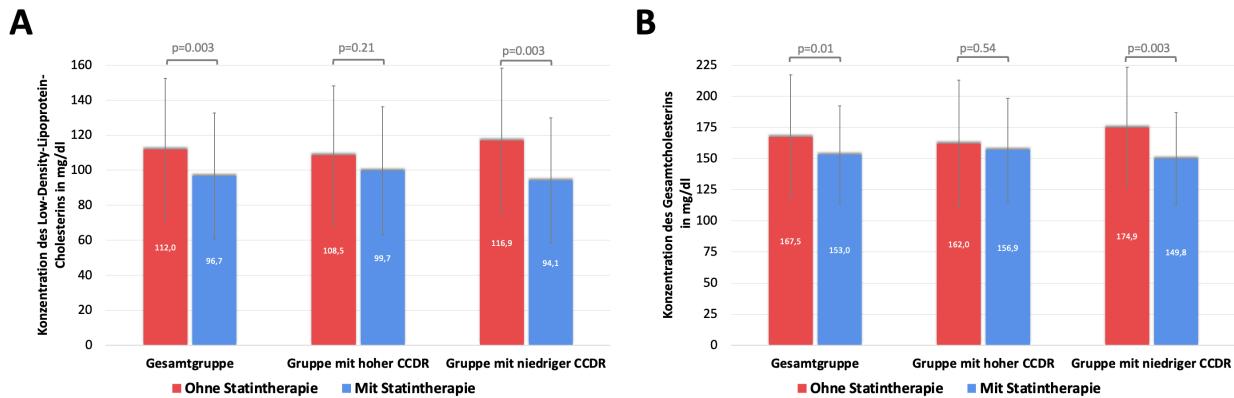
Die Validität der ermittelten Kristallzahlen wurde mittels Coulter-Counter-Prinzip bestätigt. Hierfür wurde ein Coulter Z2 (Coulter Counter Z2, Beckman Coulter Life Science, Indianapolis, USA) verwendet. Diese Methode bestimmt die Partikelzahl durch die Messung von Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit, die durch das Passieren der Kristalle zwischen zwei Elektroden entstehen. Die durchgeführte Messung ergab eine Endkonzentration von 3.5×10^6 Cholesterin-Kristalle pro Mikroliter. Dabei wurde das Gerät auf einen Schwellenwert von 3 µm eingestellt, um kleinere Verunreinigungen von der Zählung auszuschließen. Zudem wurde ein oberer Grenzwert von 7 µm definiert, um größere Partikel auszuschließen.

1.3 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden 348 Patient:innen mit schwerer Aortenklappenstenose, die einer TAVI unterzogen wurden, eingeschlossen. Der mittlere EuroScore II lag bei 3,3 % (Interquartilsbereich 2,0 % bis 5,8 %) und weist auf ein niedriges bis moderates chirurgisches Risiko der Kohorte hin. Der Anteil weiblicher Patienten lag bei 47,7 %. Zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie lag das Durchschnittsalter der Patient:innen bei $80,9 \pm 6,2$ Jahren. Vorherrschende kardiovaskuläre Risikofaktoren umfassten eine arterielle Hypertonie (83,9 %), eine Hypercholesterinämie (62,6 %) und Diabetes mellitus (30,7 %). Außerdem hatten 57,8 % der Patient:innen eine koronare Herzkrankheit (KHK) und 51,7 % waren von einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) betroffen.

Die Studienkohorte wurde basierend auf den medianen Wert der CCDR in eine Gruppe mit hoher Auflösungskapazität, die 172 Patient:innen umfasste, und in eine Gruppe mit niedriger Auflösungskapazität, der 176 Patient:innen zugeordnet wurden, unterteilt. Die Ausgangsmerkmale der beiden Gruppen waren größtenteils ausgeglichen, mit Ausnahme einer höheren Inzidenz von Vorhofflimmern in der Gruppe mit niedriger CCDR (54 % vs. 41,9 %, $p = 0,03$). Entsprechend war in dieser Gruppe auch der Anteil der Patient:innen, die orale Antikoagulanzen erhielten mit 53 % signifikant höher als in der Gruppe mit hoher CCDR (42,2 %, $p = 0,004$). Im Gegensatz dazu erhielten Patient:innen mit hoher CCDR häufiger eine duale Thrombozytenaggregationshemmung (54,1 % vs. 38,6 %, $p = 0,005$).

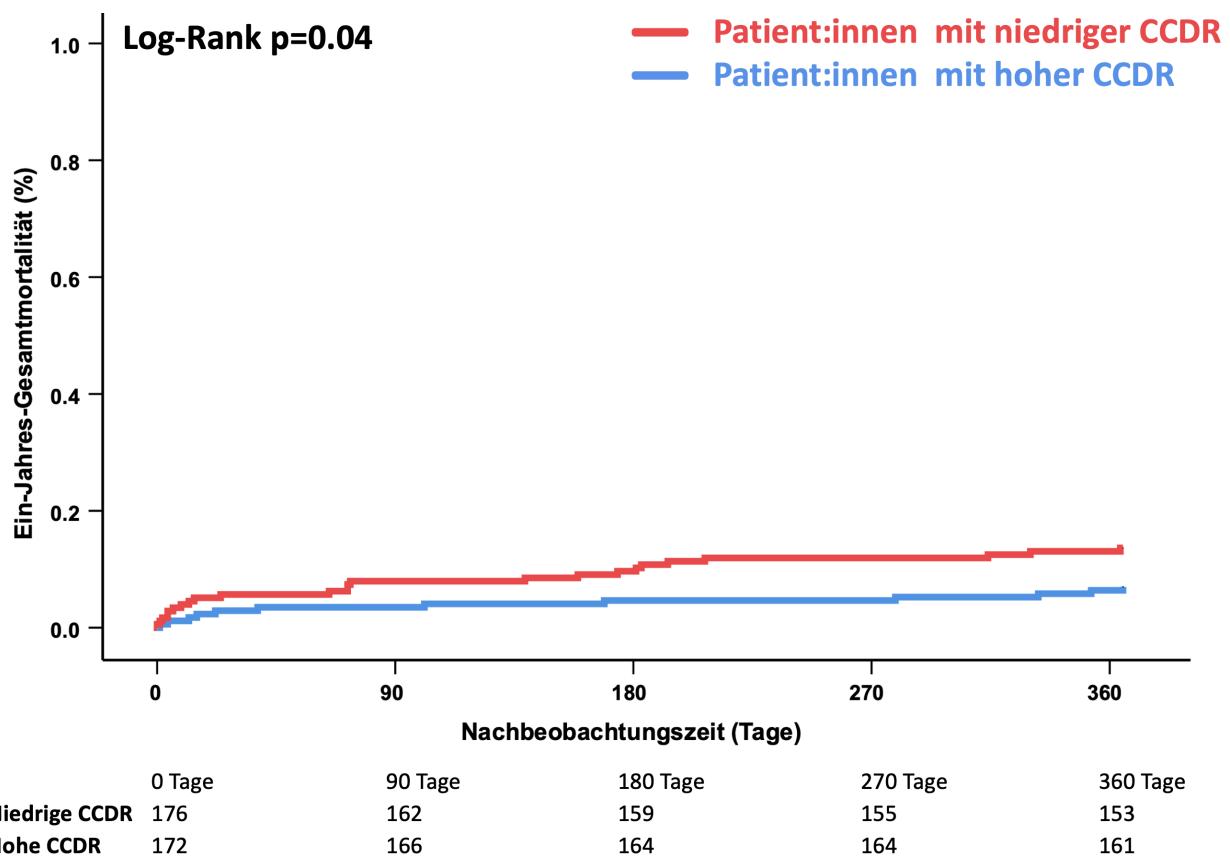
Eine weitere wichtige Erkenntnis ergab sich aus der Untersuchung der LDL- und Gesamtcholesterinwerte. In der Gesamtkohorte zeigte sich, dass Patient:innen, die mit Statinen behandelt wurden, signifikant niedrigere LDL- und Gesamtcholesterinwerte aufwiesen. Allerdings zeigte die lipidsenkende Therapie eine unterschiedliche Wirksamkeit bei Patient:innen mit hoher und niedriger CCDR: So war die Statintherapie bei Patient:innen mit niedriger CCDR mit signifikant niedrigeren LDL- ($94,1 \pm 35,7$ mg/dL vs. $116,9 \pm 41,5$ mg/dL, $p = 0,003$) und Gesamtcholesterinwerten ($149,8 \pm 37,1$ mg/dL vs. $174,9 \pm 48,4$ mg/dL, $p = 0,003$) assoziiert. Dieser Effekt war bei Patient:innen mit hoher CCDR weniger ausgeprägt. In dieser Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der LDL- ($102,1 \pm 36,9$ mg/dL vs. $104,2 \pm 38,3$ mg/dL, $p = 0,78$) und Gesamtcholesterinwerte ($157,4 \pm 42,2$ mg/dL vs. $158,9 \pm 44,0$ mg/dL, $p = 0,84$) zwischen Patient:innen mit und ohne Statintherapie (siehe Abb. 1).



Modifizierte und übersetzte Darstellung aus der Originalarbeit von Al-Kassou et al., 2024

Abb. 1: Konzentration des (A) LDL- und (B) Gesamtcholesterins bei Patient:innen mit und ohne Statintherapie in Abhängigkeit von der Cholesterinkristall-Auflösungskapazität (CCDR).

Im Hinblick auf klinische Endpunkte zeigte das Hauptergebnis dieser Studie, dass Patient:innen mit niedriger CCDR ein höheres Risiko für den kombinierten Endpunkt aus Ein-Jahres-Gesamt mortalität und schwerwiegenden Gefäßkomplikationen aufwiesen. Konkret erreichten 15,3 % der Patient:innen mit niedriger CCDR diesen Endpunkt, im Vergleich zu 7,0 % in der Gruppe mit hoher CCDR ($p=0,01$). Dieser Unterschied basierte hauptsächlich auf eine signifikant höhere Ein-Jahres-Gesamt mortalität in der Gruppe mit niedriger CCDR (13,6 % vs. 7 %, $p = 0,04$) (siehe Abb. 2 und 3). Dabei ist insbesondere die höhere kardiovaskuläre Mortalität bei Patient:innen mit niedriger CCDR (9,1 % vs. 1,7 %, $p = 0,003$) hervorzuheben, während die nicht-kardiale Mortalität in beiden Gruppen vergleichbar war ($p = 0,78$) (siehe Abb. 3).

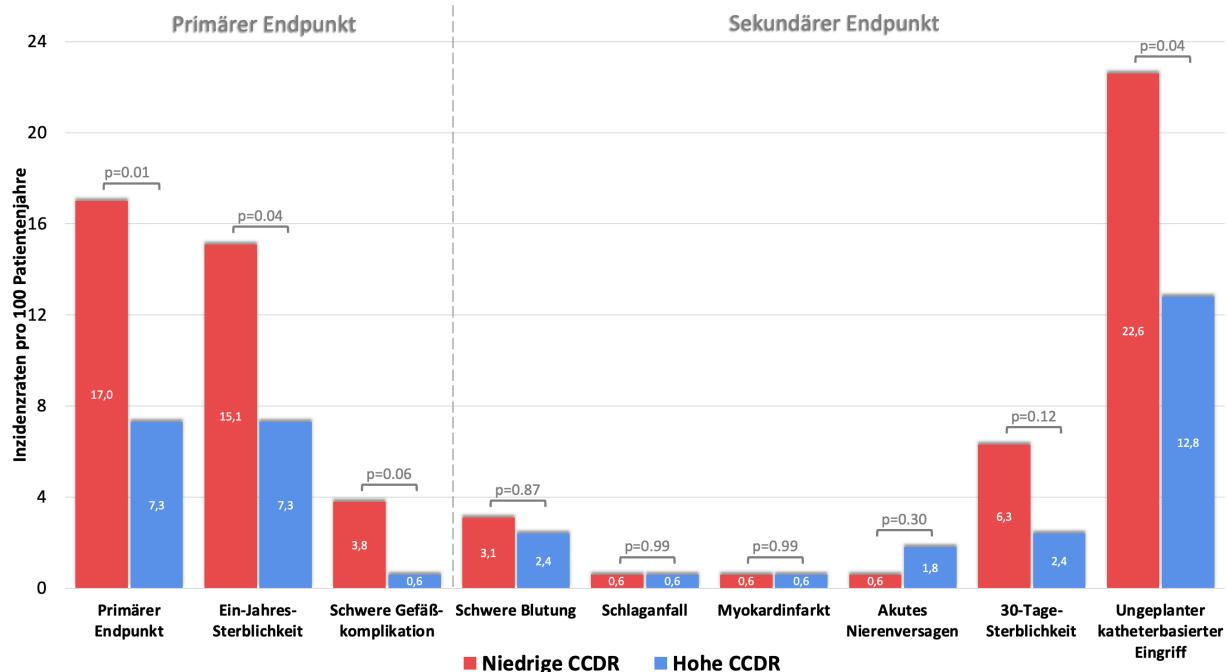


Modifizierte und übersetzte Darstellung aus der Originalarbeit von Al-Kassou et al., 2024

Abb. 2: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Gesamtüberlebens über zwölf Monate bei Patient:innen mit niedriger (rote Kurve) und hoher (blaue Kurve) Cholesterinkristall-Auflösungskapazität (CCDR).

In Bezug auf sekundäre Endpunkte zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patient:innen mit hoher und niedriger CCDR, hinsichtlich des Auftretens von Schlaganfällen (0,6 % vs. 0,6 %, $p = 0,99$), Myokardinfarkten (0,6 % vs. 0,6 %, $p = 0,99$) und schwerwiegenden Blutungskomplikationen (2,3 % vs. 2,8 %, $p = 0,87$).

Die Quantifizierung des Kalziumvolumens ergab, dass Patient:innen mit niedriger CCDR eine signifikant ausgeprägtere beidseitige iliofemorale Kalzifikation aufwiesen, während keine Unterschiede in der Aortenklappenkalzifikation festgestellt werden konnten. Patient:innen mit niedriger CCDR erlitten auch häufiger Gefäßkomplikationen im Rahmen der TAVI-Prozedur und benötigten häufiger ungeplante endovaskuläre Eingriffe (20,5 % vs. 12,2 %, $p = 0,04$) (siehe Abb. 3).



Modifizierte und übersetzte Darstellung aus der Originalarbeit von Al-Kassou et al., 2024

Abb. 3: Vergleich der Inzidenzraten für primäre und sekundäre klinische Endpunkte bei Patient:innen mit niedriger (rote Balken) und hoher (blaue Balken) Cholesterinkristall-Auflösungskapazität (CCDR).

Die uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse ergab, dass eine niedrige CCDR (HR, 2,21 [95 % KI: 0,99 – 4,92], P = 0,04) und Albumin (Hazard Ratio [HR], 0,88 [95 % Konfidenzintervall (KI): 0,81 – 0,96], P = 0,005) unabhängig mit der Ein-Jahres-Gesamt mortalität assoziiert waren.

1.4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal ein neu entwickeltes Assay zur Quantifizierung der Cholesterinkristallauf lösungsrate (CCDR) vorgestellt. Darüber hinaus wurde die CCDR erstmals als Prädiktor für klinische Ergebnisse bei Patient:innen mit hochgradiger Aortenklappenstenose, die einem kathetergestützten Aortenklappenersatz unterzogen wurden, untersucht:

Die Pathophysiologie der Aortenklappenstenose konnte in den letzten Jahren durch eine intensive Grundlagenforschung als ein stressinduzierter und zellulär regulierter inflammatorischer Pathomechanismus aufgeschlüsselt werden. Kardiovaskuläre Risikofaktoren spielen dabei eine Schlüsselrolle, indem sie chronische Entzündungsprozesse bedingen und fördern, die letztlich über eine Aktivierung und Differenzierung von Fibro- und Osteoblasten zu einer Kalzifizierung der Herzklappe führen können (Stewart et al., 1997). Trotz dieser grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnisse haben zahlreiche Studien gezeigt, dass weder eine Lebensstiländerung noch eine pharmakologische Intervention das Fortschreitens der AKS wirksam verhindern können (Cowell et al., 2005; Nadir et al., 2011; Pawade et al., 2021). Dies deutet darauf hin, dass diese Risikofaktoren vielmehr den allgemeinen Gesundheitszustand der Patient:innen als die individuelle Fähigkeit auf Stressoren zu reagieren widerspiegeln.

Das in dieser Studie erstmalig vorgestellte Assay ermöglicht eine präzise, quantitative Bestimmung der Fähigkeit des Serums, Cholesterinkristalle aufzulösen – ein Schlüsselfaktor in der Entwicklung atherosklerotischer Plaques und der Kalzifizierung von Herzklappen (Lindman et al., 2016). Die Fähigkeit, diese Kristalle aufzulösen, spiegelt somit die individuelle Kapazität von Patient:innen wider, chronische Entzündungsreaktion zu kontrollieren und das Fortschreiten atherosklerotischer Erkrankungen über den Klappenersatz hinaus zu verlangsamen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Patient:innen mit niedriger CCDR eine deutlich höhere Ein-Jahres-Mortalitätsrate als jene mit hoher CCDR hatten ($p = 0,04$). Dieser Unterschied ist hauptsächlich auf eine um das Fünffache erhöhte kardiovaskuläre Sterblichkeit in der Gruppe mit niedriger CCDR zurückzuführen ($p = 0,003$), während die nicht-kardiovaskuläre Mortalität zwischen beiden Gruppen vergleichbar blieb ($p = 0,78$). Die beobachtete 30-Tage-Mortalität des Gesamtkollektivs lag mit 4,0 % über den Vorhersagen etablierter, von den Europäischen Leitlinien empfohlener Risikobewertungsmodelle. Dabei wurde das vorhergesagte Sterberisiko für Patient:innen mit hoher CCDR leicht überschätzt, wohingegen das Risiko für Patient:innen mit niedriger CCDR signifikant unterschätzt wurde. Des Weiteren zeigte sich bei Patient:innen mit niedriger CCDR ein Trend zu häufiger auftretenden schwerwiegenden Gefäßkomplikationen sowie eine signifikant, um etwa 20 % erhöhte iliofemorale

Verkalkung beidseits ($p \leq 0,04$). Entsprechend war eine ungeplante endovaskuläre Intervention zur Behandlung zugangsbedingter Gefäßkomplikationen deutlich häufiger in dieser Gruppe erforderlich ($p = 0,04$). Diese Befunde deuten auf eine erhöhte atherosklerotische Belastung hin, die weder durch klassische Risikofaktoren abgebildet noch von gängigen Risikoprädiktionsinstrumenten adäquat erfasst wird. Unsere Studie zeigt, dass die CCDR als zusätzlicher Prädiktor in der Risikostratifizierung von AKS-Patient:innen, die sich einer TAVI unterziehen, dienen kann. Die eindeutige Assoziation zwischen der Cholesterinkristall-Auflösungsrate und der Mortalität unterstreicht den potenziellen Nutzen der CCDR als ergänzenden Biomarker zur Optimierung der individuellen Risikoeinschätzung – über den Klappenersatz hinaus.

Eine weitere klinisch relevante Erkenntnis ergibt sich aus der Betrachtung des Einflusses einer Statintherapie auf die LDL- und Gesamtcholesterinwerte in Abhängigkeit von der CCDR. In dieser Studie zeigten ausschließlich Patient:innen mit einer niedrigen CCDR einen effektiven Nutzen einer lipidsenkenden Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren ($p = 0,003$). Dieser Effekt deutet daraufhin, dass die Wirksamkeit einer Statintherapie interindividuell in Abhängigkeit von der endogenen Lipidstoffwechselkapazität variieren kann. Insofern könnte die Bestimmung der CCDR künftig dazu beitragen, Patient:innen mit hohem kardiovaskulärem Risiko zu identifizieren, die besonders von einer Statin-Therapie profitieren. Dies ermöglicht eine personalisierte Therapie, bei der die Effektivität der lipidsenkenden Therapie durch die CCDR überwacht und gegebenenfalls angepasst wird, um so das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse zu reduzieren.

Trotz der beobachteten Assoziation zwischen der CCDR und klinischen Ereignissen bei AKS-Patient:innen, kann auf Grundlage dieser Ergebnisse keine eindeutige Kausalität abgeleitet werden. Dies liegt daran, dass die der CCDR zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen nicht vollständig aufgeschlüsselt sind. Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass Cholesterinkristalle eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose spielen (Kuusisto et al., 2005). Zudem haben histopathologische Untersuchungen gezeigt, dass CC nicht nur zentrale Bestandteile atherosklerotischer Plaques sind, sondern auch zahlreich als Lipidablagerungen in kalzifizierten Aortenklappen vorzufinden sind (Rajamannan et al., 2007). Dort wirken Sie

als endogene Signalmoleküle, die über die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Makrophagen eine Umwandlung von Pro-Interleukin-1 β und Pro-Interleukin-18 in ihre bioaktiven Formen initiieren (Janoudi et al., 2015). Diese proinflammatorischen Zytokine verstärken die Rekrutierung weiterer Immunzellen und Lipid-beladener Makrophagen und tragen letztlich zur Kalzifizierung der Klappe bei (Duwell et al., 2010). Interessanterweise konnte unsere Forschungsgruppe die Hauptkomponenten der CCDR in FACS-Analysen bei etwa 300 Kilodalton identifizieren. Wir nehmen an, dass diese Faktoren an Cholesterinkristalle binden und sie abbauen, da die wiederholte Zugabe und Inkubation von CC die Auflösungskapazität des Serums erschöpft. Vor diesem Hintergrund könnte eine weitere Erforschung des Pathomechanismus der CCDR zur Identifizierung neuer antiinflammatorischer Wege führen, die sowohl über die Identifizierung vulnerabler Patient:innen als auch über eine gezielte therapeutische Intervention das Patientenergebnis verbessern könnten. Tatsächlich konnte unsere Forschungsgruppe in experimentellen Vorarbeiten zeigen, dass die Cholesterinlöslichkeit im Serum pharmakologisch durch 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin und Ursodesoxycholsäure beeinflusst werden kann. Ursodesoxycholsäure, eine Gallensäure, die die Löslichkeit von Cholesterin erhöht, wird bereits bei Lebererkrankungen wie die Cholelithiasis eingesetzt (Bode et al., 2016). 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin bindet Cholesterin und konnte in Tierversuchen die Entstehung von AKS bei Mäusen verringern (Niepmann et al., 2020). Dies legt nahe, dass die Fähigkeit zur Auflösung von Cholesterinkristallen auch bei Menschen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression der AKS spielen könnte. Da beide Substanzen bereits klinisch eingesetzt werden und ihr Risikopotenzial umfassend untersucht ist, erscheint es vielversprechend, ihre Wirksamkeit bei Patient:innen mit Aortenklappenstenose zu erforschen. Eine gezielte Erhöhung der Cholesterinlöslichkeit könnte somit einen innovativen, nicht-invasiven therapeutischen Ansatz zur Behandlung der Aortenklappenstenose darstellen. In diesem Zusammenhang könnte die CCDR genutzt werden, um die therapeutische Wirksamkeit der getesteten Substanzen hinsichtlich der gesteigerten Cholesterinlöslichkeit und der Reduktion atherosklerotischer Läsionen zu überwachen und die Therapie gezielt anzupassen.

1.5 Limitationen

Die Limitationen dieser Studie liegen einerseits in den methodischen Einschränkungen. Diese umfassen das gewählte Studiendesign als prospektive klinische Beobachtungsstudie, das eine Feststellung kausaler Zusammenhänge erschwert. Zudem ist die Generalisierbarkeit der Ergebnisse aufgrund des unizentrischen Studienkonzepts eingeschränkt. Des Weiteren schränkt die begrenzte Größe des Patientenkollektivs die statistische Aussagekraft ein. Andererseits ergeben sich experimentell-methodische Einschränkungen, die beachtet werden müssen. Dazu gehört das benötigte, relativ große Probenvolumen von 150 µl pro Messung. Zudem ist die Schwierigkeit, eine homogene Cholesterinkristall-Lösung herzustellen und die exakte Inkubationszeit einzuhalten, um die Genauigkeit der Messungen sicherzustellen, zu beachten. Darüber hinaus wurde die CCDR nur einmalig gemessen, sodass Veränderungen im zeitlichen Verlauf bzw. unter verschiedenen therapeutischen Bedingungen unberücksichtigt bleiben. Insofern ist eine weitere Validierung des CCDR-Assays in einem größeren, unabhängigen Kollektiv sowie die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen und Einflussfaktoren erforderlich.

1.6 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie ist die erste, die die Auflösungsrate von Cholesterinkristallen im Serum von Patient:innen mit hochgradiger AKS, die eine TAVI erhielten, untersucht hat. Die Ergebnisse zeigen, dass eine niedrige Cholesterinkristall-Auflösungsrate mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen und einer gesteigerten Ein-Jahres-Mortalitätsrate assoziiert ist. Dabei ist die erhöhte Sterblichkeit primär auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen. Zusammengefasst kann die Cholesterinkristall-Auflösungsrate neue Einblicke in die antiinflammatorische Kapazität der Patient:innen liefern und zusätzliche prognostische Informationen über die herkömmliche Risikostratifizierung hinaus bieten. Nichtsdestotrotz sind weiterführende Studien erforderlich, um die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu entschlüsseln und die prädiktive Wertigkeit dieses Biomarkers zu validieren.

1.7 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Bode N, Grebe A, Kerksiek A, Lütjohann D, Werner N, Nickenig G, Latz E, Zimmer S. Ursodeoxycholic acid impairs atherogenesis and promotes plaque regression by cholesterol crystal dissolution in mice. Biochem Biophys Res Commun 2016; 478: 356-362

Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, Boon NA; Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression (SALTIRE) Investigators. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. N Engl J Med 2005; 352: 2389-2397. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043876>

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature 2010; 464: 1357-1361

Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. J Am Coll Cardiol 2012; 60: 1854-1863

Généreux P, Piazza N, Alu MC, Nazif T, Hahn RT, Pibarot P, Bax JJ, Leipsic JA, Blanke P, Blackstone EH, Finn MT, Kapadia S, Linke A, Mack MJ, Makkar R, Mehran R, Popma JJ, Reardon M, Rodes-Cabau J, Van Mieghem NM, Webb JG, Cohen DJ, Leon MB. Valve Academic Research Consortium 3: Updated Endpoint Definitions for Aortic Valve Clinical Research. J Am Coll Cardiol 2021; 77: 2717-2746. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.02.038>

Han D, Zhou T, Li L, Ma Y, Chen S, Yang C, Ma N, Song M, Zhang S, Wu J, Cao F, Wang Y. AVCAPIR: A Novel Procalcific PIWI-Interacting RNA in Calcific Aortic Valve Disease. Circulation 2024; 149: 1578-1597

Huntley GD, Thaden JJ, Alsidawi S, Michelena HI, Maleszewski JJ, Edwards WD, Scott CG, Pislaru SV, Pellikka PA, Greason KL, Ammash NM, Malouf JF, Enriquez-Sarano M, Nkomo VT. Comparative study of bicuspid vs. tricuspid aortic valve stenosis. Eur Heart J Cardiovasc Imaging 2018; 19: 3-8

Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, Vahanian A. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J* 2003; 24: 1231-1243

Iung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 162-172. DOI: 10.1038/nrccardio.2010.202

Kuusisto J, Räsänen K, Särkioja T, Alarakkola E, Kosma VM. Atherosclerosis-like lesions of the aortic valve are common in adults of all ages: a necropsy study. *Heart* 2005; 91: 576-582

Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16006

Nadir MA, Wei L, Elder DH, Libianto R, Lim TK, Pauriah M, Pringle SD, Doney AD, Choy AM, Struthers AD, Lang CC. Impact of renin-angiotensin system blockade therapy on outcome in aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58: 570-576. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.01.063>

Niepmann ST, Lenart M, Willemsen N, Duewell P, Luetjohann D, Latz E, Nickenig G, Zimmer S. Dissolving cholesterol crystals reduces aortic valve stenosis development in mice. *Eur Heart J* 2020; 41: ehaa946-3719

Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* 2006; 368: 1005-1011

Osnabrugge RLJ, Mylotte D, Head SJ, Van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, Bogers AJJC, Piazza N, Kappetein AP. 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* 2013; 62: 1002-1012

Otto CM, Prendergast B. Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med* 2014; 371: 744-756

Pawade TA, Doris MK, Bing R, White AC, Forsyth L, Evans E, Graham C, Williams MC, van Beek EJR, Fletcher A, Adamson PD, Andrews JPM, Cartlidge TRG, Jenkins WSA, Syed M, Fujisawa T, Lucatelli C, Fraser W, Ralston SH, Boon N, Prendergast B, Newby DE, Dweck MR. Effect of Denosumab or Alendronic Acid on the Progression of Aortic Stenosis: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Circulation* 2021; 143: 2418-2427. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.053708>

Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 2003; 107: 2181-2184

Rajamannan NM, Bonow RO, Rahimtoola SH. Calcific aortic stenosis: an update. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4: 254-262. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0827>

Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. 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* 2011; 124: 1783-1791

Rosenhek R, Klaar U, Schemper M, Scholten C, Heger M, Gabriel H, Binder T, Maurer G, Baumgartner H. Mild and moderate aortic stenosis. Natural history and risk stratification by echocardiography. *Eur Heart J* 2004; 25: 199-205

Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *Cardiovascular Health Study. J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 630-634

Thériault S, Li Z, Abner E, Luan J, Manikpurage HD, Houessou U, Zamani P, Briand M, Estonian Biobank Research Team, Boudreau DK, Gaudreault N, Frenette L, Argaud D, Dahmene M, Dagenais F, Clavel MA, Pibarot P, Arsenault BJ, Boekholdt SM, Wareham NJ, Esko T, Mathieu P, Bossé Y. Integrative genomic analyses identify candidate causal

genes for calcific aortic valve stenosis involving tissue-specific regulation. *Nat Commun* 2024; 15: 2407 <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46639-4>

Varadarajan P, Kapoor N, Bansal RC, Pai RG. Survival in elderly patients with severe aortic stenosis is dramatically improved by aortic valve replacement: Results from a cohort of 277 patients aged ≥ 80 years. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 30: 722-727

Janoudi A, Shamoun FE, Kalavakunta JK, Abela GS. Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque. *Eur Heart J* 2016; 37: 1959-1967. <https://doi.org/10.1093/euroheartj/ehv653>

Zusman O, Pressman GS, Banai S, Finkelstein A, Topilsky Y. Intervention Versus Observation in Symptomatic Patients With Normal Flow Low Gradient Severe Aortic Stenosis. *JACC Cardiovasc Imaging* 2018; 11: 1225-1232

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Al-Kassou B, Al-Kassou L, Mahn T, Lütjohann D, Shamekhi J, Willemsen N, Niepmann ST, Baldus S, Kelm M, Nickenig G, Latz E, Zimmer S. Cholesterol Crystal Dissolution Rate of Serum Predicts Outcomes in Patients With Aortic Stenosis Undergoing Transcatheter Aortic Valve Replacement. *J Am Heart Assoc.* 2024 Feb 6;13(3):e031997. doi: 10.1161/JAHA.123.031997. Epub 2024 Jan 19. PMID: 38240198; PMCID: PMC11056150.

<https://doi.org/10.1161/jaha.123.031997>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Kardiologie, Angiologie, Pneumologie und internistische Intensivmedizin unter Betreuung von Univ.-Prof. Dr. med. Zimmer durchgeführt.

Im Rahmen des Vorstellungsgespräches mit Univ.-Prof. Dr. med. Zimmer wurden die Zielsetzung der Arbeit sowie der zeitliche Ablauf gemeinsam abgestimmt. Die grundlegende Fragestellung wurde in enger Abstimmung mit ihm ausgearbeitet. Im Anschluss daran erfolgten eine umfassende Literaturrecherche zur Methodenauswahl und eine wiederholte Überarbeitung des Studienprotokolls. Dabei war ich aktiv an der Feinjustierung zentraler methodischer Parameter beteiligt, insbesondere hinsichtlich der Konzentration von Cholesterinkristallen sowie der Anzahl und des Volumens der eingesetzten Serumproben. Nach meiner Einarbeitung in die erforderlichen Labormethoden übernahm ich eigenverantwortlich die Durchführung der Versuche. Dazu gehörte auch die Nutzung von Proben aus der institutionseigenen Biobank sowie deren Analyse mittels Durchfluszytometrie. Im Rahmen der Datenerhebung erfasste und dokumentierte ich klinische, laborchemische und experimentelle Daten. Zudem übernahm ich die klinische Nachverfolgung der Patientinnen und Patienten. Die experimentellen Rohdaten analysierte ich zunächst mithilfe des FlowJo-Programms. Anschließend erfolgte die statistische Auswertung mittels SPSS. Hierzu bereitete ich die Ergebnisse in Tabellen und Grafiken auf und strukturierte sie für die weitere Interpretation. Im anschließenden Diskussionsprozess trug ich zur inhaltlichen Weiterentwicklung der Arbeit bei, indem ich die Daten im Kontext bestehender wissenschaftlicher Literatur analysierte. Hierzu integrierte ich neue Fragestellungen, insbesondere im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen LDL-Konzentration und der Fähigkeit zur Auflösung von Cholesterinkristallen und formulierte den ersten Entwurf des Manuskriptes.

Ich versichere, die Dissertationsschritt selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Zimmer, der mich über die gesamte Zeit der Dissertation mit seiner Expertise, seiner klaren Haltung und seinem Vertrauen begleitet hat.

Ich danke meinen Geschwistern und meinen Freunden für ihren Zuspruch, ihren Rückhalt und ihre Liebe. Insbesondere danke ich meinem Bruder Baravan Al-Kassou, der mir als Vorbild den Weg in der Medizin eröffnet hat.

Meinen Eltern danke ich für Ihre unermüdliche Stärke, mit der sie mich ermutigt haben, diesen Weg zu gehen. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.