

# Entwicklung und *in vitro* Charakterisierung von NiTi- Dünnschicht Herzklappensegeln

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Technische Fakultät  
Lehrstuhl für Anorganische Funktionsmaterialien

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
„Doktor der Ingenieurwissenschaften“  
(Dr.-Ing.)

vorgelegt von:

**Klaas Loger**

Kiel

2016



1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. E. Quandt

2. Gutachter: Prof. Dr. C. Selhuber-Unkel

Datum der mündlichen Prüfung: 27.01.2017



---

## Kurzfassung

Die Transkatheter-Aortenklappenimplantation ist ein stark wachsender Bereich innerhalb der modernen Kardiologie. Heutige, mit Katheter implantierbare Klappen bestehen aus einem stabilen Stent aus Metall, in den Klappensegel aus biologischem Gewebe eingenäht sind. Ein entscheidender Nachteil dieser Gewebesegele ist jedoch die durch Degeneration und Verkalkung hervorgerufene begrenzte Haltbarkeit.

Bisher konnte kein geeignetes anorganisches Material als Ersatz etabliert werden, doch durch ihre Superelastizität, ihre hohe Stabilität und Biokompatibilität ist die Formgedächtnislegierung Nickel-Titan ein Material, das biologisches Gewebe in Herzklappenimplantaten ersetzen könnte.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und *in vitro* Charakterisierung von einer dreisegeligen Herzklappenstruktur aus NiTi-Dünnschichtmaterial für transkatheterimplantierte Herzklappenprothesen. Zu diesem Zweck wurden freitragende NiTi-Dünnschichten durch Magnetronspütern, Lithographie und nasschemisches Ätzen hergestellt und ein Formungsprozess für Dünnschicht-Herzklappensegel entwickelt.

Die Zusammensetzung der Filme, die Phasenübergangstemperaturen sowie die mechanischen Eigenschaften des NiTi wurden untersucht, um die Eignung des Materials für die Herstellung von Herzklappensegeln zu prüfen. Die Funktionalität der Klappensegel wurde im hydrodynamischen Herzklappentester getestet und die transvalvulären Druckdifferenzen und das Öffnungs- und Schließverhalten der Segel beschrieben.

In ersten Versuchen wurde eine optimale NiTi-Schichtdicke für die Segel von 10-15 µm ermittelt. Die systolischen Druckdifferenzen der Segel sind, verglichen mit der Referenz, gering und die Öffnungsflächen der Segel hinreichend groß. Während der Diastole schließen die Klappensegel komplett und halten eine Druckdifferenz über die Klappe aufrecht. Um die Flexibilität der Segel zu erhöhen, wurden mikrostrukturierte NiTi-Filme mit rautenförmigen Löchern hergestellt und charakterisiert. Um eine für Herzklappensegel erforderliche Dichtigkeit zu erreichen, wurde der Ansatz des Tissue Engineering verfolgt. Strukturierte NiTi-Dünnschichten dienen als stabiles Gerüst für Gewebezüchtung mit CD133+ Vorläuferzellen, adulten Endothelzellen und glatten Muskelzellen, um dünne, stabile und biokompatible Hybrid-Herzklappensegel zu entwickeln. Im Vergleich mit einer etablierten Herzklappe als Referenz zeigen diese strukturierten NiTi-Dünnschichtsegel sehr gute Öffnungs- und Schließereigenschaften.

---

## Abstract

The transcatheter aortic valve implantation is a rapidly growing field of modern cardiology. Up to date, transcatheter implantable valves consist of biological tissue leaflets, which are sutured to a metal stent frame. The major disadvantage of this biological tissue leaflets is their limited durability.

The search for a suitable inorganic replacement for the biological transcatheter valve leaflets continues. Due to the super-elasticity, a high stability and its biocompatibility, the shape memory alloy nickel-titanium material could replace biological tissue in heart valve implants.

The aim of this work was the development of heart valve leaflets fabricated from NiTi thin film material for transcatheter implanted prosthetic heart valves. To this end, freestanding NiTi thin films were prepared by magnetron sputtering, lithography, chemical wet etching and a molding process for thin heart valve leaflets was developed.

Film composition, phase transition temperatures and mechanical properties of the NiTi thin films were analyzed to test the feasibility of the material for heart valve leaflets.

The functionality of the leaflets has been tested in a hydrodynamic heart valve tester and the transvalvular pressure differences and the opening and closing behavior of the valve leaflets were described. Results were compared to an established heart valve replacement. In initial experiments a NiTi thin film leaflet thickness of 10-15  $\mu\text{m}$  was determined. The systolic pressure differences of the leaflets are low compared with the reference and the opening areas of the NiTi thin film valve leaflets are sufficiently large. During diastole the valve leaflets close completely and hold a sufficient transvalvular pressure difference. In order to increase the flexibility of the inorganic leaflets, NiTi thin films were fabricated with microstructured diamond-shaped holes. In order to achieve a required leak tightness of the leaflets in the closed position, the approach of tissue engineering was introduced. Structured NiTi thin films serve as a stable framework for tissue engineering with CD133+ progenitor cells, adult endothelial cells and smooth muscle cells to develop a thin, stable and biocompatible hybrid heart valve prostheses. These novel structured hybrid NiTi thin film heart valves show very good opening and closing characteristics compared to an established heart valve reference.

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	III
1 Einleitung .....	1
2 Grundlagen.....	4
2.1 Herzkreislauf und Herzklappenfunktion .....	4
2.1.1 Physiologie und Herzkreislauf.....	4
2.1.2 Herzklappenerkrankungen und medizinische Notwendigkeit für Herzklappenprothesen.....	8
2.1.3 Historie der Herzklappenprothesen und Stand der Technik .....	9
2.2 Eigenschaften von NiTi.....	17
2.2.1 Martensitische Umwandlung .....	17
2.2.2 Superelastizität .....	20
2.2.3 Formgedächtniseffekt .....	22
2.2.4 Biokompatibilität .....	23
2.3 Herstellung von NiTi-Filmen .....	25
2.3.1 Magnetronspütern .....	25
2.3.2 UV-Lithographie.....	28
2.3.3 Ätzen .....	31
3 Methoden .....	32
3.1 Probenpräparation .....	32
3.1.1 Formgebungsverfahren .....	34
3.2 Zellbesiedelung .....	34
3.3 Film Charakterisierung.....	35
3.3.1 Rasterelektronenmikroskopie .....	35
3.3.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie .....	35
3.3.3 Röntgenbeugung .....	36
3.3.4 Dynamische Differenzkalorimetrie.....	36

---

3.3.5	Zugtests .....	37
3.3.6	Fluoreszenzmikroskopie .....	38
3.4	Klappencharakterisierung.....	38
3.4.1	<i>In vitro</i> Kreislauf Testsystem.....	38
3.4.2	Pulsduplikatorsystem .....	39
3.4.3	Dynamische Langzeitmessung und Ni-Freisetzung.....	41
4	Ergebnisse und Diskussion .....	43
4.1	NiTi-Herzklappen mit 14 mm Durchmesser.....	43
4.1.1	Segeldesign und mechanische Eigenschaften .....	43
4.1.2	Systolische Druckdifferenz.....	46
4.1.3	Öffnungsfläche und Performance Index .....	48
4.1.4	Diastolische Druckdifferenz .....	51
4.1.5	Statisches Rückflussvolumen.....	52
4.2	NiTi-Herzklappen mit 20 mm Durchmesser.....	54
4.2.1	Segeldesign und mechanische Eigenschaften .....	54
4.2.2	Systolische Druckdifferenz.....	59
4.2.3	Öffnungsfläche und Performance Index .....	61
4.2.4	Diastolische Druckdifferenz .....	64
4.2.5	Dichtigkeit und Rückfluss.....	65
4.2.6	Langzeittest und Ni-Freisetzung .....	68
4.3	NiTi-Herzklappen mit strukturierten Segeln.....	70
4.3.1	Mechanische Eigenschaften strukturierter NiTi-Dünnschichten.....	70
4.3.2	Systolische Druckdifferenz.....	73
4.3.3	Öffnungsfläche und Performance Index .....	75
4.3.4	Diastolische Druckdifferenz .....	78
4.4	Zellbesiedlungen strukturierter NiTi-Dünnschichten.....	80
4.4.1	Zellbesiedlung mit CD133+ Vorläufer Zellen.....	81



---

4.4.2	Zellbesiedlung mit adulten Endothelzellen.....	84
4.4.3	Zellbesiedlung mit glatten Muskelzellen.....	85
4.5	Zellbesiedlung strukturierter NiTi-Dünnschicht-Klappen .....	86
4.5.1	Systolische Druckdifferenzen .....	88
4.5.2	Performance Index und Öffnungsfläche .....	89
4.5.3	Diastolische Druckdifferenzen.....	90
5	Zusammenfassung und Ausblick .....	93
6	Publikationen .....	96
7	Literaturverzeichnis .....	97







# 1 Einleitung

Das Herz ist das zentrale und lebenswichtige Organ, das als Verbindung zwischen dem Lungen- und dem Körperkreislauf die Organe mit sauerstoff- und nährstoffreichem Blut versorgt. Es hält den Körperkreislauf aufrecht, indem es das Blut durch den Körper pumpt. Gesunde Herzklappen dienen als Rückschlagventile, die ein Rückströmen des Blutes verhindern und so eine gerichtete Strömung gewährleisten. Eine Erkrankung der Herzklappen führt zu einer Mehrbelastung des Herzens und unbehandelt zu einer stetigen Verschlechterung der Herzfunktion bis hin zum Herzversagen.

Etwa 3 % der über 75 Jährigen leiden an einer kritischen Aortenklappenstenose.<sup>1</sup> Medikamentöse Behandlungen zeigen eine schlechte Prognose bei einer schwerwiegenden Herzklappenerkrankung, die mit Folgesymptomen wie Angina pectoris (Brustenge), Dyspnoe (Kurzatmigkeit) oder Synkope (Bewusstlosigkeit) nach durchschnittlich 2–3 Jahren zum Tod führt.<sup>2</sup> Ein Herzklappenersatz ist meist die einzige akzeptierte Behandlung, um die Symptome zu lindern und das Leben zu verlängern.<sup>3</sup> Für einen Großteil dieser Patienten (30 – 50 %) ist allerdings eine Operation am offenen Herzen aufgrund des zu hohen operativen Risikos nicht angeraten.<sup>4</sup>

Eine neue Methode, die Gesundheit dieser als inoperabel geltenden Hochrisikopatienten zu verbessern, wurde im Jahr 2002 von Cribier durch die erste perkutan implantierte Aortenklappe durchgeführt (*Transcatheter aortic valve implantation – TAVI*).<sup>5</sup> Bei dieser Methode wird die Herzklappe in einem Katheter in die gewünschte Position im Herz eingebracht und dort entfaltet. Die Zahlen für perkutan implantierte Herzklappenprothesen steigen seitdem stetig. In Deutschland werden mittlerweile mehr Aortenklappenprothesen per Katheter implantiert als am offenen Herzen operiert. Im Jahr 2014 waren es bereits über 13000 TAVI-Patienten im Vergleich zu etwa 10000 herzchirurgisch behandelten Patienten.<sup>6</sup>

Heutige Transkatheter-Herzklappen bestehen aus biologischen Segeln, die an einem Metallgerüst (Stent) befestigt sind. Ein entscheidender Nachteil biologischer Klappensegel ist ihre begrenzte Haltbarkeit von maximal 15 Jahren, bedingt durch Degeneration und Verkalkung. Das Crimpen, ein Zusammenfallen der Herzklappe, um sie im Katheter zu positionieren, kann zusätzlich das Gewebe der Segel schädigen und zu einer weiteren Verkürzung der Haltbarkeit führen.<sup>7</sup>

Neuartige anorganische Segel, die eine längere Haltbarkeit der Transkatheter implantierbaren Prothesen gewährleisten, konnten bisher nicht etabliert werden. Neben bislang untersuchten Polymeren als Material für Herzklappensegel bietet die Formgedächtnislegierung aus nahezu äquiatomarem Nickel-Titan die erforderlichen Eigenschaften, um eine Verbesserung der Haltbarkeit zu erreichen. Durch die superelastischen Eigenschaften des Materials ist es prädestiniert für die Anwendung von Transkatheter basierten Implantaten. Die gute Biokompatibilität von NiTi wird durch viele medizinische Anwendungen wie Stents, im Besonderen auch Herzklappenstents, Vena Cava Filter, Septum Okkluder, orthodontische Drähte etc. bestätigt.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und *in vitro* Charakterisierung einer dreisegelligen Herzklappenstruktur aus NiTi-Dünnschicht. Die Herstellung der freitragenden Dünnschichten erfolgte durch Magnetronspütern, Lithographie und nasschemischem Ätzen. Die Filme wurden anschließend in einem Formungsprozess durch Erhitzen in die gewünschte Herzklappenform gebracht. Damit die Klappensegel für Transkatheter gestützte Implantation krimpbar sind, müssen die NiTi-Filme bei der eingesetzten Temperatur superelastisch sein. Die Materialeigenschaften der freitragenden NiTi-Filme wurden mithilfe von Zugversuchen, Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC), Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) und Röntgenbeugung (XRD) bestimmt. Die entwickelten Herzklappensegel wurden im Herzklappentester unter hydrodynamischem pulsatilem Fluss auf ihre Funktionalität, ihr Öffnungs- und Schließverhalten und ihre Dichtigkeit hin untersucht und mit einer etablierten Herzklappenprothese (Carpentier-Edwards 2650 S.A.V.) als Referenz verglichen. Die Testung der Herzklappen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Lutter (Experimentelle Herzchirurgie und Herzklappenersatz) vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein durchgeführt.

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von NiTi-Dünnschichten als Gerüst für Tissue Engineering. Mikrostrukturierte NiTi-Netzstrukturen mit rautenförmigen Löchern bilden ein stabiles Gerüst für die Besiedelung mit biologischem Material. In dieser Arbeit wurde das Zellwachstum von CD133+ Vorläuferzellen, glatten Muskelzellen und adulten Endothelzellen auf NiTi-Netzstrukturen untersucht. Mit rautenförmigen Löchern mikrostrukturierte Herzklappensegel wurden mit und ohne Zellen in hydrodynamischen Versuchen auf ihre Funktionalität getestet.

Die Besiedelung der NiTi-Dünnschichten wurde mit Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Lutter (Experimentelle Herzchirurgie und

Herzklappenersatz) vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein und der Arbeitsgruppe von Prof. Selhuber-Unkel (Biokompatible Nanomaterialien) am Institut für Materialwissenschaft der Technischen Fakultät der Universität Kiel.

## 2 Grundlagen

Als Grundlagen für die vorliegende Arbeit sollen in diesem Kapitel der HerzKreislauf, die Herzklappenfunktion und die medizinische Notwendigkeit für Herzklappenprothesen und ihre Funktion erklärt und ausgewählte gängige Herzklappenmodelle und ihre Vor- und Nachteile erläutert werden. Ein weiterer Abschnitt behandelt die grundlegenden Eigenschaften von NiTi und beschreibt die Grundlagen der NiTi-Dünnschicht Herstellung durch Magnetronspütern.

### 2.1 HerzKreislauf und Herzklappenfunktion

#### 2.1.1 Physiologie und HerzKreislauf

Die Funktion des Blutkreislaufs ist der Transport des Blutes und dabei in erster Linie die Versorgung der Organe mit Sauerstoff. Der Kreislauf ist in zwei Bereiche unterteilt: Den sogenannten Niederdruckbereich, bestehend aus dem rechten Herz, dem kleinen Kreislauf, dem linken Vorhof, sowie den Venen, Venulen und Kapillaren (Abbildung 1). Das Hochdrucksystem umfasst das linke Herz (ab linkem Ventrikel), die Arterien und Arteriolen. Das Niederdrucksystem sowie das Hochdrucksystem sind jeweils mit einer Pumpe ausgestattet, die beide im Herzen zusammengefasst sind. Die rechte Herzhälfte, bestehend aus dem rechten Vorhof und dem rechten Ventrikel (rechte Herzkammer), ist die Pumpe für den pulmonalen Kreislauf und pumpt das sauerstoffarme Blut unter geringem mittleren Druck von etwa 15 mmHg (entspricht 2000 Pa) durch die Lunge, in der das Blut mit Sauerstoff angereichert wird. Das sauerstoffreiche Blut gelangt anschließend in den linken Vorhof und den linken Ventrikel. Diese bilden das Pumpsystem für den großen systemischen Kreislauf, in dem das Blut zu den Organen gepumpt wird. Hierfür ist ein höherer Druck notwendig (mittlerer Druck ~85 mmHg), wobei der Druck in dem weit verzweigten Netz aus Arterien und Arteriolen in weiterer Entfernung und die Zunahme des Gesamtdurchmessers abnimmt.<sup>8</sup>



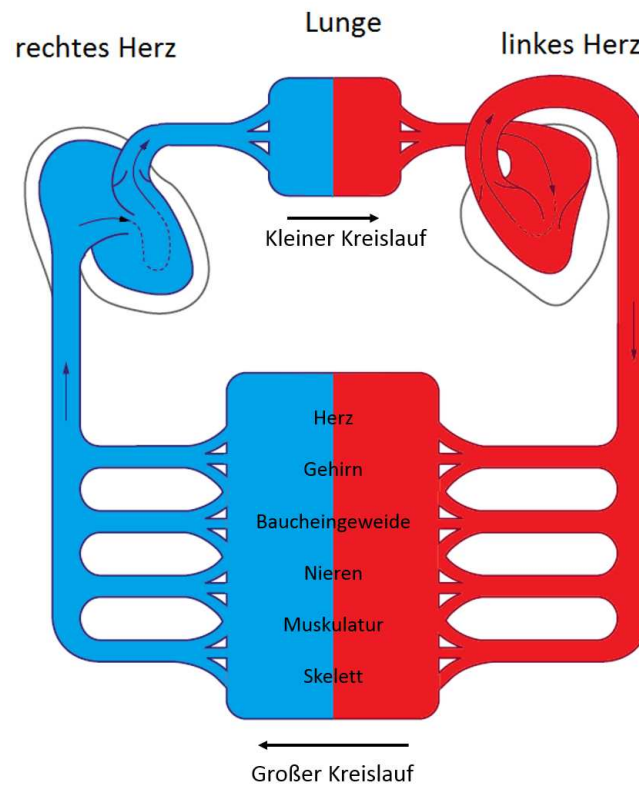


Abbildung 1: Großer und kleiner Blutkreislauf nach Betz.<sup>9</sup> Die rechte Herzhälfte pumpt das sauerstoffarme Blut in den Lungenkreislauf (kleiner Kreislauf). Dort wird das Blut mit Sauerstoff angereichert und von dem linken Herzen in den großen Kreislauf (Körperkreislauf) gepumpt, um die Organe wie Herz, Gehirn etc. zu versorgen.

Das Herz ist ein zweigeteilter Hohlmuskel, der aus der linken und der rechten Herzhälfte besteht (Abbildung 2). Der Herzmuskel besteht aus mehreren Gewebeschichten: Innen ist er mit Endothel ausgekleidet (Endokard), zur Mitte hin schließt sich der eigentliche Herzmuskel (Myokard) an. Das Herz ist umgeben vom Perikard (Herzbeutel). Dieser ist aus einer inneren serösen Schicht (Körperflüssigkeit mit der gleichen Konsistenz wie das Blutserum) und einem äußeren Bindegewebe (Epikard) aufgebaut.<sup>10</sup> Durch die Lagerung im Herzbeutel erhält das Herz Bewegungsfreiheit.

Die beiden Hälften sind jeweils in Vorhof und Hauptkammer (Ventrikel) unterteilt. Diese Unterteilung dient dem schnelleren Befüllen der Kammern. Während der Kontraktion der Ventrikel werden die Vorhöfe jeweils wieder mit Blut gefüllt, sodass eine höhere Pumpfrequenz ohne Mehrarbeit des Ventrikels erreicht wird. Um den wesentlich höheren Druck im Körperkreislauf aufbauen zu können, ist die linke Seite des Herzens kräftiger gebaut. Man findet hier eine nahezu doppelte Wandstärke des Ventrikels.

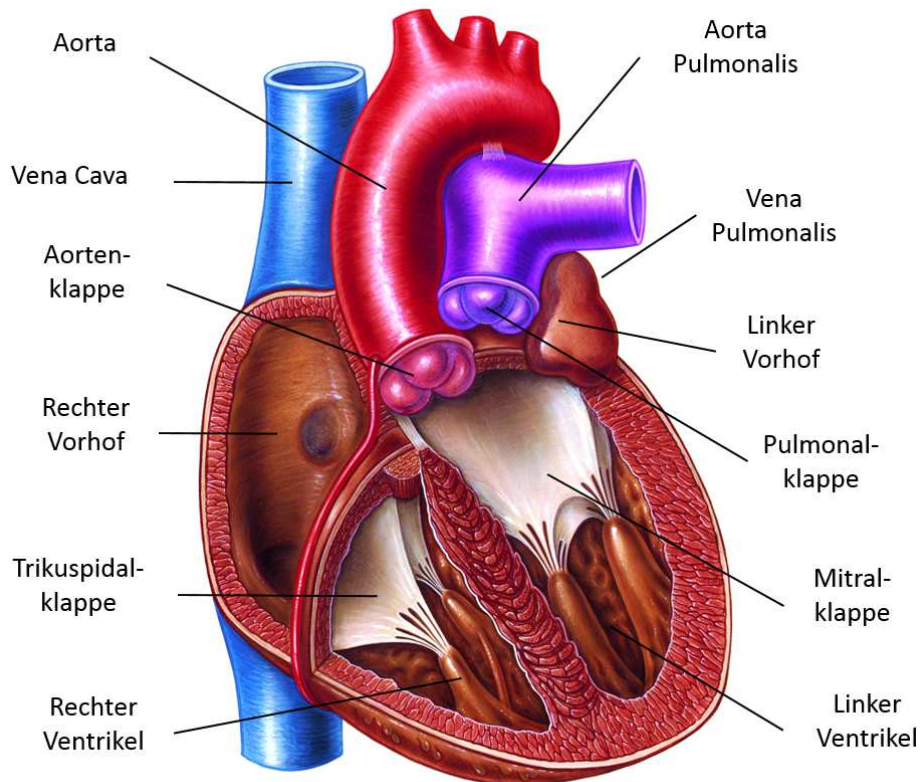


Abbildung 2: Aufbau des menschlichen Herzens und der angrenzenden großen Gefäße, mit freundlicher Genehmigung der Firma Rüdiger Anatomie GmbH / [www.ruediger-anatomie.de](http://www.ruediger-anatomie.de).<sup>11</sup>

Das Herz verfügt über vier Herzklappen, die eine Ventilfunktion übernehmen und für einen gerichteten Blutfluss sorgen. Zwei Segelklappen befinden sich jeweils zwischen Vorhof (Atrium) und Ventrikel (Atrioventrikularklappen); die Trikuspidalklappe (rechte Herzhälfte) sowie die Mitralklappe (linke Herzhälfte). Die Trikuspidalklappe ist trikuspid, die Mitralklappe bikuspid. Die Mitralklappe schließt nach dem Prinzip eines Entenschnabelventils. Die Taschenklappen (Semilunarklappen) befinden sich zwischen dem Ventrikel und dem jeweiligen Kreislaufsystem. Sie bestehen aus drei halbmondförmigen Taschensegeln (Valvulae). Der Aufbau der semilunaren Klappensegel ist biologisch komplex. Die Segel bestehen aus drei unterschiedlichen Schichten; der Fibrosa, der Spongiosa und der Ventricularis. Die interstitiellen Zellen liegen in einer Matrix aus Kollagen, Elastin und Glykosaminoglykan.<sup>12</sup>

Der Pumpzyklus des Herzens wird in die Systole (Kontraktion) und die Diastole (Entspannung) unterteilt, wobei die Systole noch in die Anspannungs- und die Austreibungsphase, die Diastole in die Entspannungs- und die Befüllungsphase unterteilt werden. Der Herzzyklus und die vorherrschenden Druck- und Volumenverläufe sind in Abbildung 3 dargestellt. Im Ruhezustand beträgt die zeitliche Länge der Systole 0,3 s. Die Diastole ist mit 0,55 s annähernd doppelt so lang.<sup>13</sup> Da die Zyklen in beiden Herzhälften

sich nur in den relativen Druckverhältnissen unterscheiden, werden hier die Systole und Diastole anhand der linken Herzhälfte erklärt.

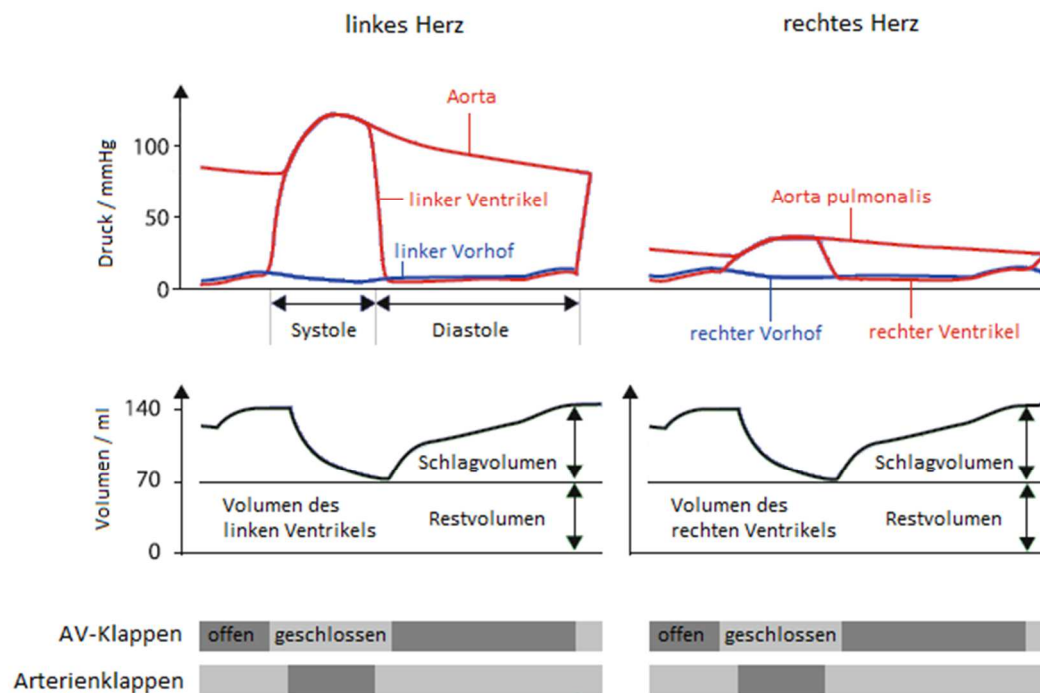


Abbildung 3: Zeitliches Verhältnis von Klappenöffnung/-schluss und Druck-Volumenverhältnissen im rechten und im linken Herzen nach Steffel.<sup>8</sup>

Während der Anspannungsphase kommt es zu einer isovolumetrischen Druckerhöhung im linken Ventrikel. Sobald der Gegendruck des Kreislaufsystems von etwa 80 mmHg erreicht ist, öffnet die Aortenklappe und die Austreibungsphase beginnt. Der Druck steigt im linken Ventrikel sowie in der Aorta auf etwa 120 mmHg an, es werden 70 ml Flüssigkeit ausgestoßen und das Volumen im Ventrikel nimmt von 140 ml auf 70 ml ab. Wird die maximale Kontraktion erreicht, nimmt der Druck wieder ab und nach kurzer Nachlaufzeit, hervorgerufen durch die Trägheit des Blutes, schließt die Aortenklappe. Anschließend beginnt die Entspannungsphase der Diastole mit einer isovolumetrischen Druckabnahme im Ventrikel. Fällt der ventrikuläre Druck unter den des linken Atriums, kann die Mitralklappe aufgrund der Druckdifferenz öffnen und die Füllungsphase des Ventrikels beginnt. Die Füllung wird durch die Kontraktion des Vorhofs und eine zusätzliche Funktion der Speicherung der Verformungsenergie im Muskelgewebe des Ventrikels und eine daraus entstehende Saugwirkung des Ventrikels erreicht. Der Druck im Vorhof bleibt während der Füllphase gering, weshalb die geschlossene Aortenklappe eine mittlere Druckdifferenz von

80 mmHg aufrechterhalten muss.<sup>14</sup> Hat der Ventrikel sein maximales Volumen erreicht, beginnt die Anspannungsphase der Systole und damit der Zyklus von neuem.

	Ruhe	Max. Belastung
Herzschläge [1/min]	70	190
Herzfrequenz [Hz]	1,2	3,2
Schlagvolumen [ml]	70	90
Herzminutenvolumen [l/min]	5	17
Dauer Systole [s]	0,3	0,1
Dauer Diastole [s]	0,55	0,21
$p_{\max}$ Systole [kPa]/[mmHg]	17 / 130	32 / 240
$p_{\max}$ Diastole [kPa]/[mmHg]	11 / 80	16 / 120

Tabelle 1: Typische Herzraten, -förderleistungen und Druckwerte in Ruhe und unter Belastung.<sup>15</sup>

### 2.1.2 Herzklappenerkrankungen und medizinische Notwendigkeit für Herzklappenprothesen

Herzklappenerkrankungen können bei allen vier, den zwei Atrioventrikular (Trikuspid- und Mitralklappe) sowie an den zwei Taschenklappen (Pulmonal- und Aortenklappe), auftreten. Erkrankungen an den Klappen der linken Kammer sind weiter verbreitet, da diese durch den höheren Druck einer stärkeren Belastung ausgesetzt sind. Der mit Abstand am häufigste diagnostizierte Herzklappenfehler ist die Aortenklappenstenose. Die Stenose beschreibt eine Verengung der Herzklappenöffnung, wobei die Ursachen degenerativ (Einschränkung der Beweglichkeit durch Lipidablagerungen, Entzündungsprozesse und progrediente Kalzifizierung, mit 80 % die häufigste Ursache), postrheumatisch oder auf kongenitale Fehlbildungen zurückzuführen sind. Durch die verkleinerte Öffnungsfläche kommt es bei einer Aortenklappenstenose zu viel höheren Druckwerten im linken Ventrikel und folglich zu größeren Druckdifferenzen zwischen Ventrikel und Aorta (Abbildung 4a). Der Schweregrad einer Aortenklappenstenose wird im Allgemeinen über die Größe der valvulären effektiven Öffnungsfläche (EÖF) und die damit einhergehenden systolischen Druckdifferenzen bestimmt (Tabelle 2). Die normale Öffnungsfläche der Aortenklappe liegt im gesunden Zustand zwischen 2 cm<sup>2</sup> und 4 cm<sup>2</sup>. Die erhöhte Druckbelastung des Ventrikels führt zu einer konzentrischen Hypertrophie (Verdickung des Myokards bei gleichbleibendem Volumen der Herzkammer) der vorgeschalteten Herzhöhle, mit der Folge von einem erhöhten linksventrikulärem enddiastolischen Druck und erhöhtem Mitteldruck im linken Vorhof. Auftretende Symptome beinhalten Belastungsdyspnoe (erschwerterte Atmung unter Belastung), Herzrhythmusstörungen und Angina pectoris.

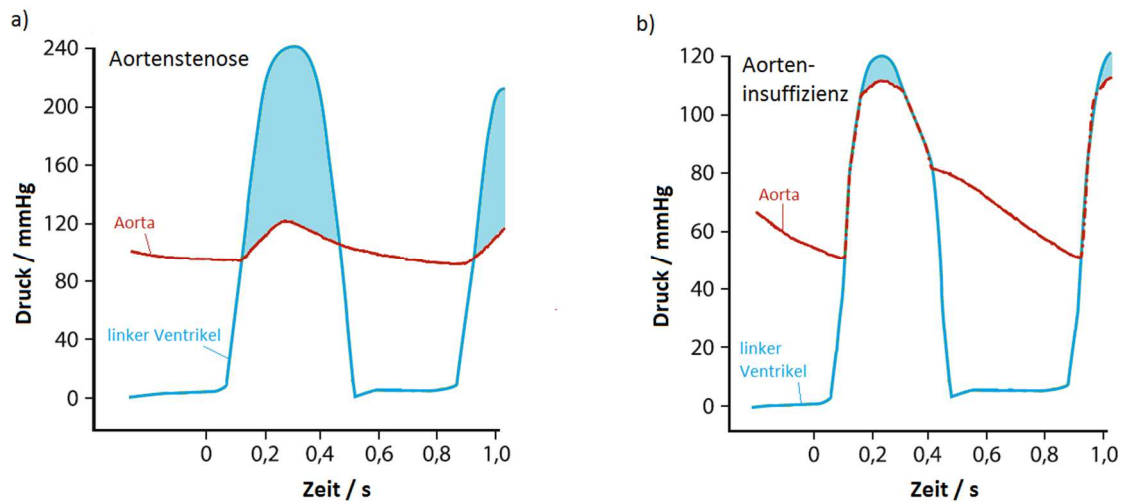


Abbildung 4: Druckverlauf: a) Aortenklappenstenose, b) Aortenklappeninsuffizienz nach Steffel. <sup>8</sup>

	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Druckdifferenz [kPa]	< 5,3	5,3 - 10,6	10,6 - 16	> 16
[mmHg]	< 40	40 - 80	80 - 120	> 120
EÖF [cm <sup>2</sup> ]	> 1,5	1,0 - 1,5	0,5 - 1,0	< 0,5

Tabelle 2: Einteilung der unterschiedlichen Stadien der Aortenklappenstenose nach der New York Heart Association NYHA <sup>15</sup> (Die unterschiedlichen Schweregrade werden in der Tabelle 3 dargestellt).

Die zweite Form eines Herzklappenfehlers ist die Insuffizienz. Bei der Aorteninsuffizienz führt ein ungenügendes Schließverhalten der Klappe zu einem Rückfluss des bereits gepumpten Blutes und dadurch zu einer Volumen-Mehrbelastung des linken Ventrikels (Abbildung 4b). Sie tritt in den meisten Fällen als Begleiterscheinung der Aortenklappenstenose auf. Eine isolierte Aortenklappeninsuffizienz ist für ca. 20 % der Aortenklappenoperationen verantwortlich.

NYHA-Stadium	Klinik (Luftnot)
I	keine klinischen Beschwerden
II	leichte Luftnot bei normaler Belastung
III	erhebliche Luftnot bei normaler Belastung
IV	Luftnot unter Ruhebedingungen

Tabelle 3: Schweregrade von Herzinsuffizienz; nach der NYHA gibt es vier verschiedene Stadien.

### 2.1.3 Historie der Herzklappenprothesen und Stand der Technik

Bereits 1952 implantierte Hufnagel das erste künstliche Klappenventil im Menschen.<sup>16</sup> In den letzten 50 Jahren sind zahlreiche Herzklappenprothesen entwickelt worden. Hierzu zählen die mechanischen Klappen, die aus synthetischen Materialien bestehen. Des

Weiteren gibt es die biologischen Xenotransplantate (von Schwein oder Rind) und Homotransplantate (humane Klappen).<sup>17</sup>

Das perfekte Klappenimplantat ist bisher noch nicht entwickelt worden, d.h. je nach Patient wird nach Abwägung die am besten geeignete Prothese ermittelt. Wichtige Anforderungen, die an Herzklappenimplantate gestellt werden, sind Antithrombogenität, hämodynamische Eignung (die Strömungsmechanik des Blutes, die Hämodynamik, betreffend), lange Haltbarkeit und eine einfache Implantation.<sup>18</sup>

Antithrombogenität ist die Eigenschaft eines Materials, Thrombusbildung zu verhindern beziehungsweise zu unterdrücken. Im Falle einer Thrombusbildung kann sich der Thrombus lösen, Arterien verstopfen und zu Herzinfarkt und Schlaganfall führen. Ein Thrombus direkt an der Klappe kann die hämodynamischen Strömungen negativ beeinflussen. Mechanische Herzklappen sind anfällig für Thrombenbildung, daher müssen sich Patienten mit mechanischen Klappen lebenslang einer Antikoagulantientherapie unterziehen.<sup>19,20</sup> Eine Nebenwirkung ist die verhinderte Selbstheilung von Wunden.

Die künstliche Klappe darf die hämodynamischen Eigenschaften im Vergleich mit einer natürlichen Klappe nicht zu stark beeinflussen. Veränderungen der hämodynamischen Eigenschaften durch eine künstliche Herzklappe können zu Verwirbelungen der Strömung, Zerstörung roter Blutkörper und einer Hämolyse führen.<sup>21</sup> Daher ist zu beachten, dass die Strömungseigenschaften der Klappe zu keiner Beeinträchtigung führen.

Eine lange Haltbarkeit der Klappenimplantate sollte gewährleistet sein, um die Wahrscheinlichkeit für weitere chirurgische Eingriffe zu minimieren. Ein plötzliches Versagen des Implantats würde schwerwiegende medizinische Folgen bis hin zum Tod des Patienten nach sich ziehen. Nach den zehn Hauptanforderungen an eine Herzklappenprothese aufgestellt von Harken<sup>22,23</sup> sollte eine optimale Herzklappenprothese:

1. keine Embolie hervorrufen,
2. chemisch inert sein und keine Blutzellen schädigen,
3. keinen Widerstand gegen den physiologischen Fluss bilden,
4. schnell und komplett schließen,
5. während der entsprechenden Phase geschlossen bleiben,
6. sehr gute Haltbarkeit aufweisen,
7. an einer angebrachten physiologischen Position, vorzugsweise orthotop implantierbar sein,
8. keine Störung für den Patienten darstellen (geräuscharm etc.),

9. eine zufriedenstellende Heilung der Grenzfläche zwischen Implantat und Patient bieten und
10. technisch einfach implantierbar und fixierbar sein

### Mechanische Herzklappen

Die ersten Klappenprothesen waren mechanische Klappen, die eine einfache Ventilfunktion erfüllten. Auf die ersten Ballklappenprothesen (Hufnagel, Starr Edwards) folgten Kippscheibenprothesen (Bjork-Shiley, Hall-Kaster) und Doppelflügelprothesen (St. Jude) (Abbildung 5).<sup>24</sup>

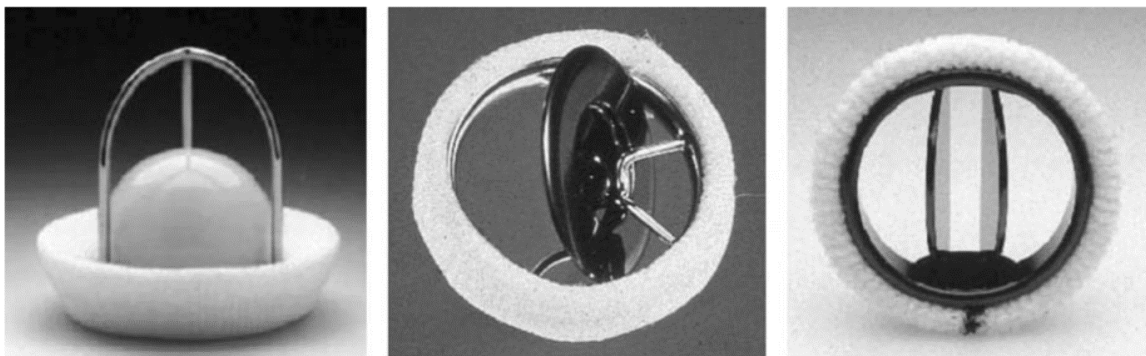


Abbildung 5: Mechanische Herzklappenprothesen: Links: Starr-Edwards caged-ball valve. Mitte: Bjork-Shiley tilting disk valve. Rechts: St. Jude Medical bileaflet tilting disk heart valve. <sup>25,26</sup>

Als Hauptvorteil von mechanischen Klappen gilt ihre Haltbarkeit, nachteilig wiederum ist die mit der Implantation lebenslang einhergehende Antikoagulationstherapie.<sup>27</sup> Außerdem stellen die starren Klappenflügel (oder Kugel der Ballklappenprothese) eine Quelle für Verwirbelungen des Blutstromes dar, was zu einem Energieverlust und damit zu einer höheren Herzarbeit führt. Zudem können die Verwirbelungen zu Totwassergebieten in den Aortenbulben führen. Hier steht das Blut und koaguliert, was Thrombosen hervorrufen kann.<sup>15</sup> Lösen sich diese Thromben, kann nicht selten die Verstopfung einer Arterie zu Schlaganfällen und Lähmungserscheinungen führen.

Scherkräfte durch die Klappenflügel können Erythrozyten schädigen und eine Hämolyse verursachen. Hieraus resultiert eine verringerte Sauerstoffaufnahme im Blut und eventuell eine Koagulation.<sup>21</sup>

Die großen Kräfte, die auf die Klappe wirken und damit auch auf die Befestigung im Annulus, können eine Vernarbung des haltenden Gewebes oder eine Ablation auslösen. Kommt es zu Fehlfunktionen, ist ein verfrühter Austausch der Prothese erforderlich.<sup>15</sup>



### Biologische Herzklappen

Biologische Klappenersätze bestehen in der Regel aus drei Segeln, die aus biologischem Material vom Tier aufgebaut und in einem stabilen Gerüst fixiert werden (Abbildung 6). Hierfür werden zumeist die Aortenklappen vom Schwein oder das Perikardgewebe (Herzbeutelgewebe) vom Rind verwendet. Anatomisch ähneln die biologischen Klappen der menschlichen Aortenklappe mehr als die mechanischen Klappen.<sup>25</sup> Unabhängig voneinander implantierten Dr. Donald Ross und Brian Barratt-Boyes schon 1962 erste explantierte humane Aortenklappen im Menschen.<sup>28,29</sup> Die mangelnde Verfügbarkeit der Klappen in verschiedenen Größen, eine schwierige Sterilisation und Lagerung sowie eine unzureichende Haltbarkeit führten zu einer bevorzugten Verwendung von biologischen Xenotransplantaten (Xenograft), hauptsächlich vom Schwein oder vom Rind.<sup>30</sup>

Durch ihre geringere Thrombogenität werden biologische Klappen gerade in älteren Patienten bevorzugt.<sup>31,32</sup> Sie sind einfach und sicher zu implantieren und erfordern keine Antikoagulationstherapie.<sup>33</sup> Schon im Jahr 2009 waren bis zu 45 % der implantierten Herzklappen weltweit Bioprothesen.<sup>34</sup> Ein entscheidender Nachteil liegt jedoch in ihrer Haltbarkeit. Aufgrund von Abstoßung des Donorgewebes im Empfänger müssen Xenografts von lebenden Zellen befreit werden. Die Prozesse zur Verhinderung von Antigenität führen aber bislang zu einer gesteigerten Anfälligkeit für Verkalkung und Degeneration der Klappe.<sup>35</sup> Die Haltbarkeit von biologischen Klappen beträgt zwischen mindestens 10-15 Jahren bei Patienten über 65 Jahre, bei unter 35 jährigen aber weniger als fünf Jahre.<sup>36</sup> Als Grund für die geringe Haltbarkeit bei jüngeren Patienten wird das stärkere Immunsystem vermutet, die Mechanismen sind aber noch nicht vollständig verstanden.<sup>37</sup> Zudem weisen Bioprothesen eine milde Form der Stenose auf, da die Öffnungsfläche durch Kommissuren, die Konstruktion der Segel und die Festigkeit des verwendeten Gewebes begrenzt wird.<sup>14</sup>

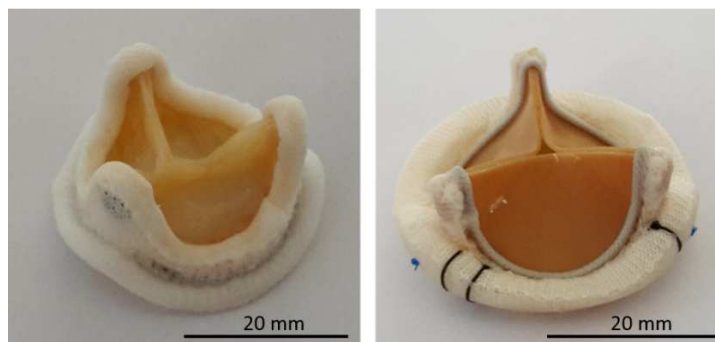


Abbildung 6: Biologische Klappen: (Links) Hancock porcine valve von Medtronic. (Rechts) Edwards Perimount Magna mit Segeln aus bovinem Perikardgewebe.



## Transkatheterklappen

Bei einer schwerwiegenden Aortenklappenstenose ist ein operativer Herzklappenersatz der beste Weg, Symptome zu lindern, die Lebensqualität zu erhöhen und die Lebenserwartung zu verlängern. Allerdings liegen die Risikofaktoren für einen Eingriff am offenen Herzen bei etwa 30 – 40 % der Patienten so hoch, dass sie für eine Herzklappenoperation nicht geeignet sind.<sup>38</sup> Die minimalinvasive perkutane Herzklappenimplantation am schlagenden Herzen ist mit einem geringeren Risiko verbunden und kann Hochrisikopatienten einen Klappenersatz ermöglichen.

1985 führte Cribier erstmals eine Ballonvalvuloplastie als katheterbasierten Eingriff für die Behandlung einer Aortenstenose durch. Im Jahr 2000 gelang Bonhoeffer et al. die erste minimalinvasive Implantation einer Pulmonalklappe (Platin-Iridium Stent mit boviner innerer Halsvene) als Behandlung einer Pulmonalatresie.<sup>39</sup> 2002 hat Cribier die erste Aortenklappe transkatheterbasiert implantiert.<sup>5</sup> Bis 2013 wurden weltweit etwa 60000 Herzklappen minimalinvasiv implantiert, wobei der Anteil der minimalinvasiven Klappenimplantationen am Gesamtanteil der Klappenimplantationen stetig wächst.

Bei der transkathetergestützten Klappenimplantation wird die Klappe gekrimpt, d.h. auf einen kleineren Durchmesser zusammengedrückt und in einen Katheter eingebracht. Dieser Katheter wird nun perkutan (durch die Haut), in den meisten Fällen transfemorale oder transapikal eingeführt. Der Katheter wird unter Röntgenbildkontrolle an die Position der Aortenklappe geleitet und die Klappe aus dem Katheter und an der Position der kranken Herzklappe entfaltet. Dies geschieht bei NiTi-Stent getragenen Klappen automatisch, hervorgerufen durch die superelastischen Eigenschaften des Materials (siehe Kapitel 2.2.2). Klappen mit Edelstahl-Stent werden durch einen Ballon expandiert. Die Implantation kann am schlagenden Herzen durchgeführt werden, eine Herz-Lungenmaschine wird im Gegensatz zum operativen Herzklappenersatz nicht benötigt.

Die ersten TAVI-Klappen waren die Percutaneous Heart Valve (Percutaneous Valve Technologies, NJ, USA) und Cribier-Edwards Transcatheter Heart Valve (Edwards LifeSciences, Irvine, CA, USA). Beide bestanden aus einem Edelstahl-Stent und Segeln aus bovinem Perikard Gewebe.

Die heutzutage am häufigsten eingesetzten TAVI-Klappen sind die Medtronic CoreValve und Edwards Sapien (Abbildung 7).<sup>40</sup> Die CoreValve Klappe ist ein selbstexpandierender Klappenstent aus NiTi mit Segeln, gefertigt aus bovinem Perikardgewebe. Die Edwards

Sapien besteht aus einem Edelstahl-Stent mit Segeln aus bovinem Perikard und ist eine Weiterentwicklung der Cribier-Edwards Transkatheter Herzklappe. Der Edwards Sapien Klappenstent wird mittels Ballon expandiert.

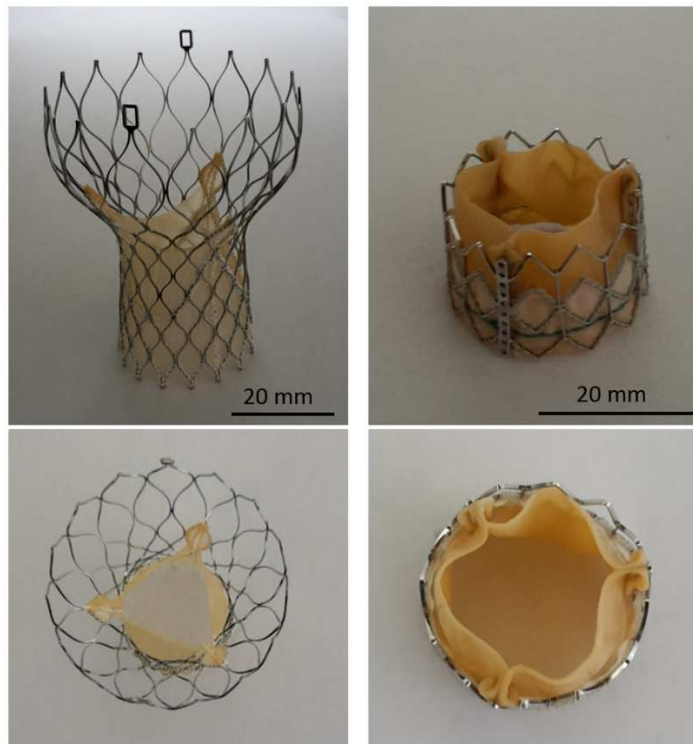


Abbildung 7: Transkatheterklappenimplantate: Links die Medtronic CoreValve und rechts die Edwards Sapien XT.

### Tissue Engineering

Ein weiterer Ansatz in der Entwicklung von Herzklappenprothesen ist das sogenannte Tissue Engineering (Gewebe konstruktion bzw. Gewebezüchtung). Bei dieser Methode wachsen lebende Zellen (*in vitro* oder *in vivo*) auf biokompatiblen 3D-Gerüsten. Durch Vermehrung und Differenzierung ergeben sich funktionale Gewebestrukturen. Ziel ist es, eine Herzklappe zu entwickeln, welche zusätzlich die Fähigkeit zu Wachstum und Regeneration besitzt. Die Gerüste können dafür biologisch, synthetisch oder biodegradierbar sein. Eine selbstauflösende synthetische Matrix könnte das Gerüst für eine weiterwachsende Gewebematrix bilden und so die Funktion des ursprünglichen natürlichen Gewebes ersetzen. Für junge Patienten würde eine solche mitwachsende Klappe spätere Re-Operationen vermeiden. Die Gerüststruktur stellt einen sehr wichtigen Teil da, weil die Eigenschaften durch Geometrie, Oberflächeneigenschaften, Porendichte und Porengröße, Biokompatibilität, chemische Degradierung und mechanische Eigenschaften grundlegend die Haltbarkeit und Funktionalität des Implantats im Körper bestimmen.<sup>41,42</sup>

## NiTi-Herzklappenprothesen

Stepan et al. haben 2005 eine Butterfly-Herzklappe aus einem 8  $\mu\text{m}$  dicken NiTi Film eingespannt in einen Teflonring entwickelt (Abbildung 8). In dynamischen *in vitro* Versuchen in einem kommerziellen Herzklappentester (Harvard Aparatus) zeigte die Klappe eine vergleichbare Leistung wie eine zugelassene Bioprothese von Edwards Lifescience (Perimount). Eine leicht abgewandelte Form der Klappe wies nach  $10^6$  Zyklen im Herzklappentester keine sichtbaren Beschädigungen des NiTi-Films auf, was auf ihre Haltbarkeit und damit eine Eignung des dünnen NiTi-Films für Herzklappen schließen lässt.<sup>43</sup>

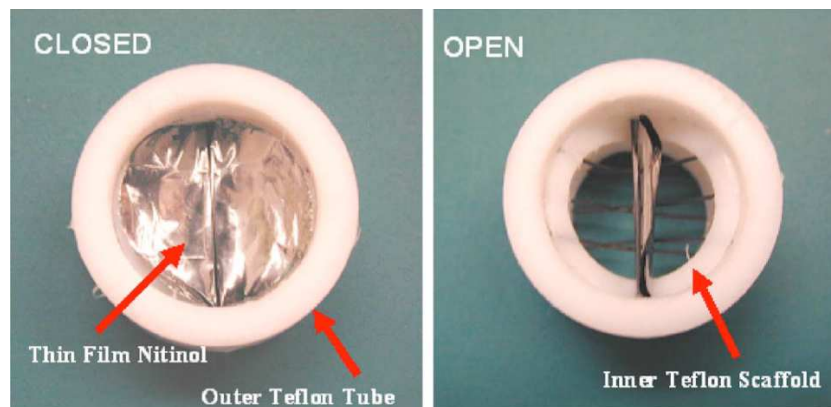


Abbildung 8: NiTi-Butterfly-Klappe von Stepan, Levi und Carman.<sup>43</sup>

Alavi et al. haben 2015 mit einem nasschemischen Ätzverfahren NiTi-Segel mit einer Dicke von 25  $\mu\text{m}$  aus dünnen Schichten hergestellt, die mit Löchern versehen waren.<sup>44-46</sup> Die runden Löcher hatten einen Durchmesser von 240  $\mu\text{m}$  und einen Abstand von 320  $\mu\text{m}$  (Abbildung 9). Diese NiTi-Segel dienten als stabile Basis für die sukzessive Besiedelung mit glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen. Die gesamte Schichtdicke der Segel betrug mit dem Gewebe insgesamt etwa 800  $\mu\text{m}$ . In pulsatilen *in vitro* Tests zeigten

die Segel ein gutes Öffnungs- und Schließverhalten. Das Gewebe blieb während der dynamischen Tests stabil.

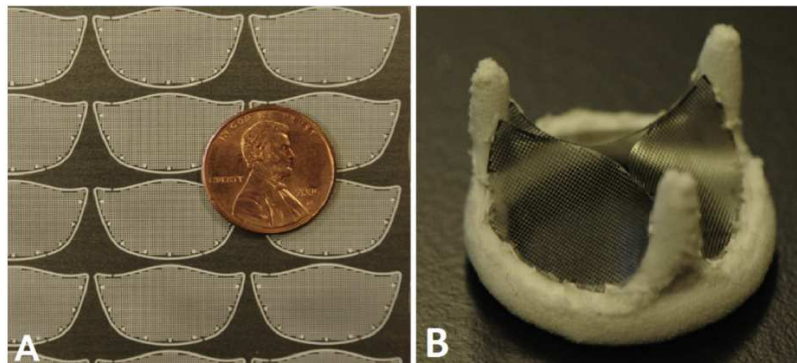


Abbildung 9: NiTi-Gerüst für Tissue Engineering nach Alavi. <sup>44</sup>

Ein weiterer Ansatz zur Entwicklung von NiTi-Herzklappensegeln ist das PercValve, entwickelt von ABPS (Abbildung 10a und b).<sup>47</sup> Das PercValve besteht aus 10 µm dünnem und mit Löchern versehenem NiTi (eNitinol). Die Strukturierung der NiTi-Filme führt zu einer höheren Elastizität der Segel. Die Klappe wurde subcoronar in ersten Tierversuchen implantiert. Sie zeigte einen geringen Öffnungsdruck und nach 10 Tagen sind die Klappen komplett mit einer Endothelschicht bedeckt. Die Klappe kann in einen 10 French (Fr) Katheter, was einem Durchmesser von 3,3 mm entspricht, komprimiert werden (Abbildung 10c).

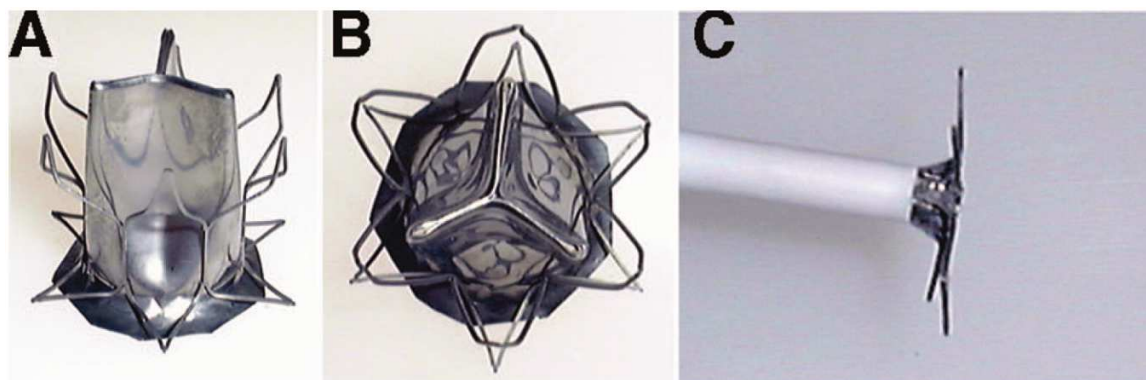


Abbildung 10: PercValve von ABPS. <sup>47</sup>

## Verwendete Referenzklappen

Als Referenzklappen für die Tests wurden zwei etablierte biologische Klappen verwendet (Abbildung 11). Die Carpentier-Edwards 2650 S.A.V. (19 mm Porcine Aortal von Edwards Lifescience) besteht aus Segeln einer Schweine-Aortenklappe. Das Modell hat einen Durchmesser von 19 mm.

Eine weitere Referenz war die 7000TFX Perimount Magna Bovin Mitral von Edwards Lifescience mit drei Segeln aus Rinderperikard. Die Klappe hat einen Durchmesser von 27 mm.

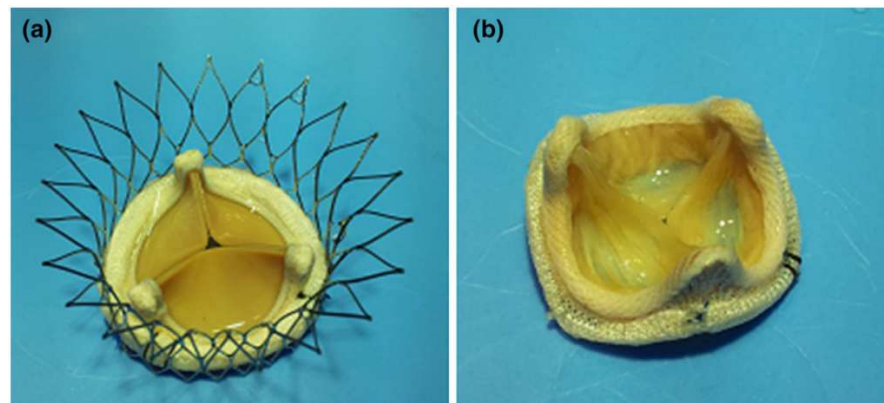


Abbildung 11: Verwendete Referenzklappen: a) 7000TFX Perimount Magna 25 mm Bovin Mitral von Edwards Lifescience, b) Carpentier-Edwards 2650 S.A.V. 19 mm Porcine Aortal von Edwards Lifescience.

## 2.2 Eigenschaften von NiTi

In diesem Kapitel werden die Eigenschaften von binärem und äquiatomarem NiTi beschrieben. NiTi ist eine sogenannte Formgedächtnislegierung, die über Eigenschaften wie Formgedächtniseffekt, Superelastizität und zusätzlich über eine hervorragende Biokompatibilität verfügt. Diese Eigenschaften machen NiTi zu einem interessanten Material für selbstexpandierbare Implantate.

### 2.2.1 Martensitische Umwandlung

Unterhalb der Schmelztemperatur können Formgedächtnislegierungen temperaturabhängig in unterschiedlichen Phasen vorliegen. Die Hochtemperaturphase ist das Austenit, die Niedrigtemperaturphase das Martensit. Der Austenit ist meist eine kubische Phase und das

Martensit hat eine niedrigere Symmetrie. Austenit von NiTi hat eine kubische bcc (B2)-Struktur und Martensit hat eine monokline B19' Kristallstruktur.

Die thermische Umwandlung wird durch vier charakteristische Temperaturen beschrieben:

- $M_s$  (Martensit Starttemperatur) ist die Temperatur, bei der während des Kühlens die Umwandlung von Austenit zu Martensit beginnt.
- $M_f$  (Martensit Endtemperatur) ist die Temperatur, bei der die komplette Austenit-Phase in Martensit umgewandelt ist.
- $A_s$  (Austenit Starttemperatur) ist die Temperatur während des Heizens, bei der die Umwandlung von Martensit zu Austenit beginnt.
- $A_f$  (Austenit Endtemperatur) ist die Temperatur, bei der die komplette Phase in Austenit umgewandelt ist.

Die martensitische Umwandlung ist eine diffusionslose Phasenumwandlung erster Ordnung. Wird eine kritische Temperatur unterschritten, startet die martensitische Umwandlung, bei der die Atome zeitgleich eine geordnete Scherbewegung ausführen (Abbildung 12). Da der Martensit eine geringere Symmetrie besitzt, können aus einer Hochtemperaturphase verschiedene Varianten des Martensit gebildet werden. Wird die Temperatur wieder erhöht, startet ab einer kritischen Temperatur die Rücktransformation zum Austenit mit der ursprünglichen atomaren Ausrichtung. Aufgrund des grundlegenden Charakters der Umwandlung durch eine kooperative Bewegung der Atome wird die Umwandlung auch als displazive Transformation bezeichnet. Auf diese Weise können Verschiebungen kleiner als die interatomaren Abstände eine makroskopische Formänderung hervorrufen.

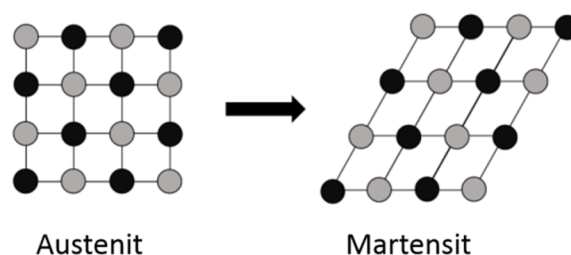


Abbildung 12: Schematische Darstellung der martensitischen Umwandlung.

Die treibende Kraft für die spontane martensitische Umwandlung ist eine Differenz der chemischen freien Energie zwischen Hochtemperatur- und Niedrigtemperaturphase (Abbildung 13a). Eine hohe Grenzflächenenergie aufgrund von Defekten und der Inkompatibilität der Martensit- und Austenitgitter erschwert die Keimbildung. Um die Keimbildung der neuen Phase voranzutreiben, bedarf es eines Überschusses der freien

Energie. Eine Kühlung des Materials bis zur Temperatur  $M_s$  ist erforderlich, damit die Differenz der freien Energie ausreicht und die martensitische Umwandlung startet. Die umgekehrte Transformation zum Austenit erfolgt erst ab einer Temperatur  $A_s$ . Diese Temperaturdifferenz zwischen Martensit und Austenit sind der Grund für die Hysterese. Die Temperaturbereiche zwischen  $M_s$  und  $M_f$ , sowie zwischen  $A_s$  und  $A_f$  resultieren aus der thermoelastischen Transformation, beschrieben von Kurdjumov und Khandros.<sup>48</sup>

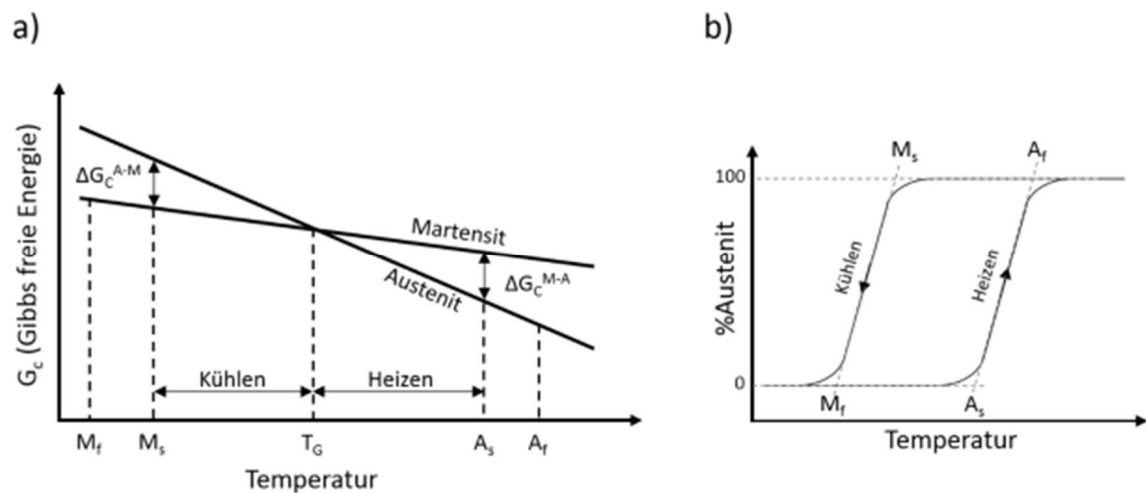


Abbildung 13: a) Darstellung der Freien Energie von Martensit und Austenit. b) Schema der temperaturabhängigen Umwandlung und der damit verbundene Hysterese.

Abbildung 13b zeigt die Hysterese der thermisch induzierten martensitischen Umwandlung.

Die charakteristischen Temperaturen können durch die Stöchiometrie des Materials (Abbildung 14) und eine thermische Behandlung beeinflusst werden. Dies ermöglicht eine Anpassung der Eigenschaften des Materials an die speziellen Anforderungen der Anwendung.



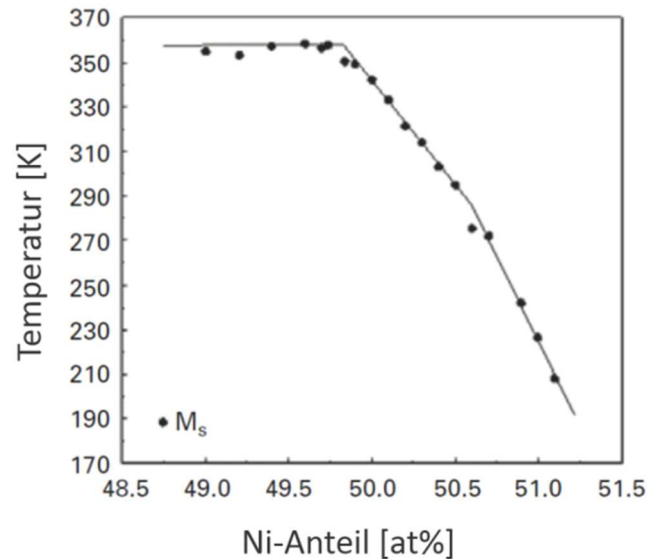


Abbildung 14: Abhängigkeit von der  $M_s$  Temperatur vom atomaren Ni-Anteil in der NiTi Legierung.<sup>49</sup>

### 2.2.2 Superelastizität

Bei der Superelastizität handelt es sich um eine reversible stressinduzierte martensitische Umwandlung, die in einem Temperaturfenster zwischen  $A_s$  und  $M_d$  unter mechanischer Belastung auftritt (Abbildung 15).  $M_d$  ist die maximale Temperatur, bei der eine martensitische Phasenumwandlung mechanisch induziert werden kann und liegt etwa 50 – 100 K oberhalb von  $A_f$ .<sup>50</sup> Diese Eigenschaft führt dazu, dass superelastische Materialien nach einer beträchtlichen Verformung unter Entlastung in ihre Ausgangsform zurückkehren. Unterhalb der  $A_s$  zeigt NiTi ein linear elastisches Verhalten. Oberhalb von  $M_d$  erfolgt eine nicht reversible plastische Verformung durch Gleiten nach Überschreiten der Hookschen Elastizitätsgrenze.<sup>51</sup> Das am stärksten ausgeprägte superelastische Verhalten wird bei einer Temperatur unmittelbar oberhalb von  $A_f$  erzielt. Eine zunehmende Temperatur jenseits von  $A_f$  führt zu einem Anstieg der Plateauspannungen bei Be- und Entlastung. Oberhalb von  $M_s$  steigt die erforderliche Spannung, die eine martensitische Umwandlung induziert, in Abhängigkeit von der Temperatur an.<sup>52</sup> Dieser lineare Anstieg kann durch die Clausius Clayperon Beziehung beschreiben werden:<sup>53</sup>

$$\frac{d\sigma}{dT_{Ms}} = \frac{\rho \cdot \Delta H}{\varepsilon \cdot T_{Ms}}$$



$\sigma$  beschreibt die angelegte uniaxiale Spannung,  $\Delta H$  die Massenenthalpie der Transformation pro Volumeneinheit,  $T_{Ms}$  die Martensit-Starttemperatur und  $\varepsilon$  die Transformationsdehnung in Richtung der angelegten Spannung.

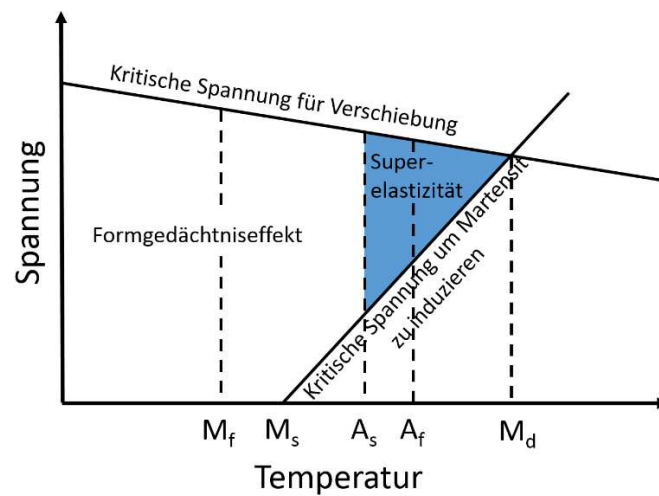


Abbildung 15: Schematische Darstellung vom Formgedächtniseffekt und Superelastizität im Spannungs-Temperatur-Diagramm.

Medizinische Implantate haben daher eine  $A_f$ -Temperatur unterhalb von  $37^\circ\text{C}$  Körpertemperatur, um ein optimales superelastisches Verhalten der selbstexpandierbaren Implantate während der Implantation zu gewährleisten.

Das Verhalten der superelastischen Legierung bei einer Dehnung oberhalb der  $A_f$ -Temperatur ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt. Erreicht die Spannung den kritischen Wert  $\sigma_k$ , beginnt die martensitische Umwandlung. Wenn die vollständige Umwandlung abgeschlossen ist, kann der Martensit zusätzlich eine elastische Verformung bis zu einem bestimmten Grad ( $\varepsilon_{\max}$ ) erfahren. Unter Entlastung vollzieht sich die umgekehrte Phasentransformation und die Probe nimmt ihre ursprüngliche Form ein.

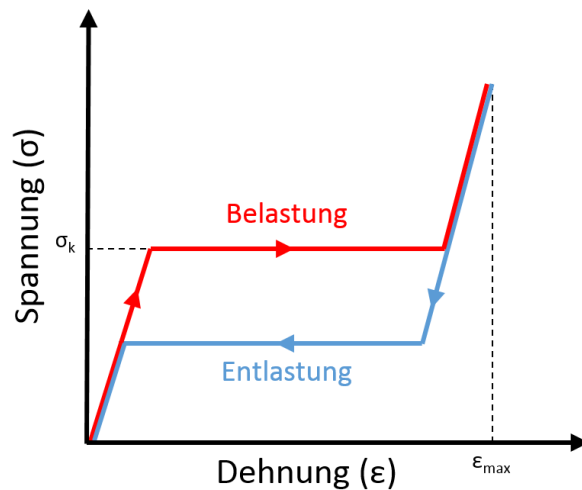


Abbildung 16: Schema für ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm einer superelastischen Legierung unter mechanischer Belastung ( $T > A_f$ ).  $\sigma_k$  und  $\epsilon_{max}$  beschreiben die kritische Spannung der spannungsinduzierten martensitischen Transformation und die maximale superelastische Dehnung.

### 2.2.3 Formgedächtniseffekt

Eine Formgedächtnislegierung, die bei einer Temperatur unterhalb der  $M_f$  oder zwischen  $M_f$  und  $A_s$  (Abbildung 15) durch Dehnen, Stauchen oder Biegen verformt wird, kann durch Erhitzen wieder in ihren Ursprungszustand zurückgeführt werden.

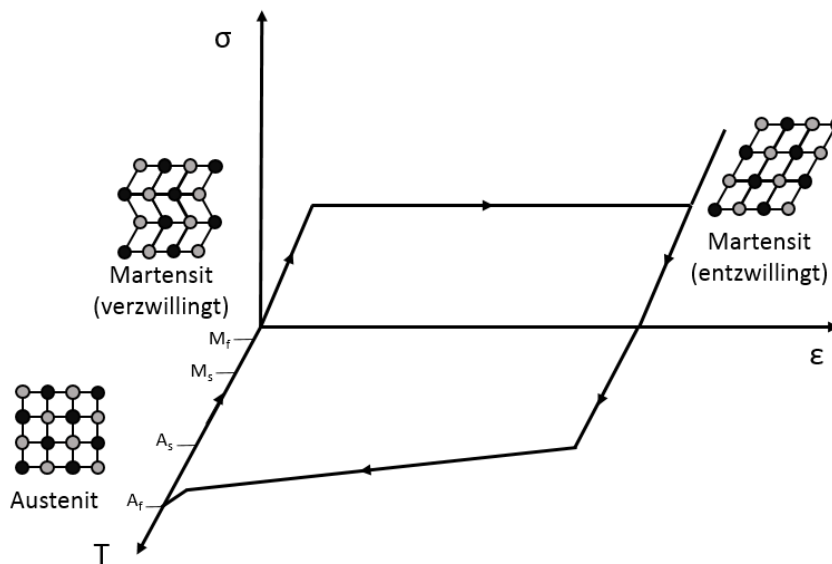


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Formgedächtniseffekts.

Die schematische Darstellung des Formgedächtniseffekts ist in Abbildung 17 dargestellt. Wird das Material auf eine Temperatur unterhalb der  $M_f$  Temperatur gekühlt, liegt das Material als verzwillingter Martensit vor. Durch eine mechanische Spannung wird das Material zuerst elastisch verformt. Ab einer kritischen Spannung beginnt die Entzwillung

der Martensitstruktur. Durch Erhitzen findet die reversible Umwandlung in Austenit statt und die Probe geht in ihre Ursprungsform zurück.

#### 2.2.4 Biokompatibilität

Ein sehr wichtiger Aspekt von Materialien in der Herstellung von Implantaten ist eine gute Biokompatibilität, welche die biologische Reaktion des Empfängers sowie die Degradierung (Zersetzung) des Implantats im Körper beschreibt.<sup>54</sup> Die Nickelallergie gehört mit zu den am häufigsten auftretenden Allergien und aufgrund des hohen Ni-Anteils (> 50 %) ist NiTi für medizinische Anwendungen Bestandteil zahlreicher Untersuchungen. Menschliches Gewebe enthält in etwa 0,01 ppm Nickel und eine höhere Menge an freigesetztem Ni eines Implantats kann allergieauslösend, toxisch oder krebserregend wirken. Dabei gelten Ni und seine anorganischen Verbindungen als mindergiftig, organische Nickelverbindungen können hingegen zum Teil hochgiftig sein.

NiTi wird heute als Implantatmaterial in vielen medizinischen Anwendungen wie Stents, Vena Cava Filter, Septums Okkluder sowie orthodontische Drähte seit Jahren erfolgreich eingesetzt.<sup>55-57</sup> *In vitro* Versuche in physiologischer Umgebung zeigen eine bessere Korrosionsbeständigkeit von NiTi als 316L Stahl und eine vergleichbare wie reines Titan; beide Materialien werden hauptsächlich für die Herstellung von Implantaten verwendet.<sup>58</sup> NiTi bildet eine TiO<sub>2</sub>-Schicht auf der Oberfläche, die als stabiler Schutz gegen Korrosion wirkt und eine Freisetzung von Ni aus dem Material einschränkt.<sup>59,60</sup> Die Korrosionseigenschaften sind von dieser Oxidschicht abhängig und eine Behandlung der Oberfläche durch Elektropolieren, Erhitzen und Passivierung kann zu einer Verbesserung der Korrosionseigenschaften führen.<sup>54,61</sup> Hierbei zeigte sich, dass eine gleichmäßige und durchgängige Oxidschicht einflussreicher ist als die Zusammensetzung der Oxidschicht oder ihre Schichtdicke.<sup>59</sup>

Eine nicht einheitliche Prozessierung von NiTi, unterschiedliche Probengrößen und Untersuchungsverfahren führen zu sehr unterschiedlichen Ni-Freisetzungsergebnissen in der Literatur. In der Arbeit von Bogdanski sind einige wichtige Referenzen zur Ni-Freisetzung aus NiTi vergleichend dargestellt.<sup>62</sup>

Im Vergleich mit rostfreiem Stahl und Co-Cr Legierungen zeigt NiTi eine erhöhte Ni-Freisetzung in den ersten Tagen in einer Lösung (11-6 ng/l). Nach einigen Tagen sinkt die Ni-Freisetzung allerdings unter die Nachweisgrenze.<sup>54</sup> Eine ebenfalls anfänglich hohe Ni Konzentration konnte von Rhyhänen et al. in Zellkulturmedium gemessen werden (NiTi:

125–87µg/l, Edelstahl: 7 µg/l).<sup>63</sup> Nach zwei Tagen war der Wert jedoch vergleichbar mit Edelstahl (NiTi: 23-5 µg/l, Edelstahl: 11-1 µg/l). Ein ähnliches Ergebnis mit einer anfänglich höheren Ni-Freisetzung, das nach 10 Tagen unter die Nachweisgrenze abfällt, zeigte Wever et al. mit NiTi in Hanks Lösung.<sup>64</sup>

Weitere Ergebnisse von Untersuchungen von NiTi-Drähten in künstlichem Speichel zeigten eine weitaus höhere Ni-Freisetzung als Edelstahl. Zudem wurde ein Anstieg der Ni-Freisetzung während mechanischer Belastung von 2,3 µg/l im Vergleich zu unbelasteten Drähten mit 1,6 µg/l gemessen.<sup>65</sup>

Die Zytotoxizität von NiTi wurde in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen humanen Zellen untersucht. Aber auch die anfänglich hohe Konzentration an Ni-Ionen scheint das Zellwachstum nicht zu beeinflussen.<sup>63</sup> Studien zur Untersuchung der Ausbreitung und des Zellwachstums von humanen Haut-Fibroblasten auf elektropoliertem und mechanisch poliertem NiTi zeigten ein ähnliches Ergebnis wie das Wachstum auf den Kontrollproben.<sup>60,66</sup> Habijan et al. haben die Zellproliferation von Mesenchymalen Stammzellen auf Ti und gesputterten NiTi-Dünnschichten verglichen. Es zeigte sich ein gleiches Zellwachstum auf NiTi und Ti innerhalb von 7 Tagen. Zudem wurde keine Zellaktivierung beobachtet.<sup>67</sup>

Wohlschlögel et. al. zeigten verbesserte Korrosionseigenschaften von gesputterten NiTi-Dünnschicht im Vergleich zu medizinischen NiTi-Rohren.<sup>68</sup> Einer Herstellung von NiTi-Dünnschichten ohne Einschlüsse im Hochvakuum und mit glatter Oberfläche werden gute Korrosionseigenschaften zugeschrieben.

Eine weitere wichtige Eigenschaft für Implantate ist die Unterdrückung von Thrombenbildung. Ein Thrombus kann sich vom Implantat lösen, Gefäße im Gehirn oder Koronargefäße verengen oder verschließen und so zu einem Schlaganfall oder einem Herzinfarkt führen. Vergleichende Studien an Stents zeigen eine geringere Thrombozytenaggregation an NiTi als an 316L-Stahl, was auf eine geringere Thrombusbildung im Körper hinweist.<sup>69,70</sup> Eine Beschichtung von Stents mit Dünnschicht-NiTi zeigte in *in vitro* Experimenten von Kealey et al. eine geringere Thrombenbildung als eine Beschichtung mit ePTFE, das heute am meisten verwendete Material für Beschichtungen zur Minderung von Thrombogenität.<sup>71</sup>

Durch die guten Korrosionseigenschaften, das gute Zellwachstum und die Antithrombogenität wird NiTi heute eine exzellente Biokompatibilität zugeschrieben. Weitere Studien sind jedoch nötig, da die Oberflächen- und Materialeigenschaften stark durch Prozesse in der Fertigung von Implantaten beeinträchtigt werden können und bisher

kein allgemeiner Standard für die Oberflächenbeschaffenheit von NiTi festgelegt wurde. Weiterhin sind viele Implantate, gerade Herzklappensegel, ständiger Belastungs- und Entlastungszyklen sowie einer Verformung ausgesetzt. Die Biokompatibilität und die Ni-Freisetzung unter zyklischer Bewegung muss noch weiter untersucht werden, um eine mögliche Ni-Freisetzung und eine damit einhergehende Gefährdung der Patienten auszuschließen.

## **2.3 Herstellung von NiTi-Filmen**

### **2.3.1 Magnetronspütern**

Die Herstellung der NiTi-Dünnschichten erfolgt mittels Sputterdeposition. Bei der Sputterdeposition handelt es sich um ein PVD-Verfahren (Physikalische Gasabscheidung), bei dem Atome durch energiereiche Ionen aus einem Target herausgeschlagen werden, sich auf einem Substrat niederschlagen und einen festen Film entstehen lassen. In dieser Arbeit wurde das DC-Magnetronspütern Verfahren angewendet. Beim Spütern wird zwischen einer negativ geladenen Kathode (Target) und einer Anode mit dem Wafer als Substrat eine Spannung angelegt. Zwischen Kathode und Anode wird ein inertes Gas (Ar) eingeleitet, welches durch die angelegte Spannung ionisiert und ein Plasma bildet. Die positiv geladenen Gasionen werden durch das elektrische Feld auf das Target beschleunigt und durch ihre hohe kinetische Energie schlagen sie Atome aus dem Targetmaterial heraus. Diese freien Teilchen können sich auf dem Substrat niederlassen und bilden dort einen Film (Abbildung 18).

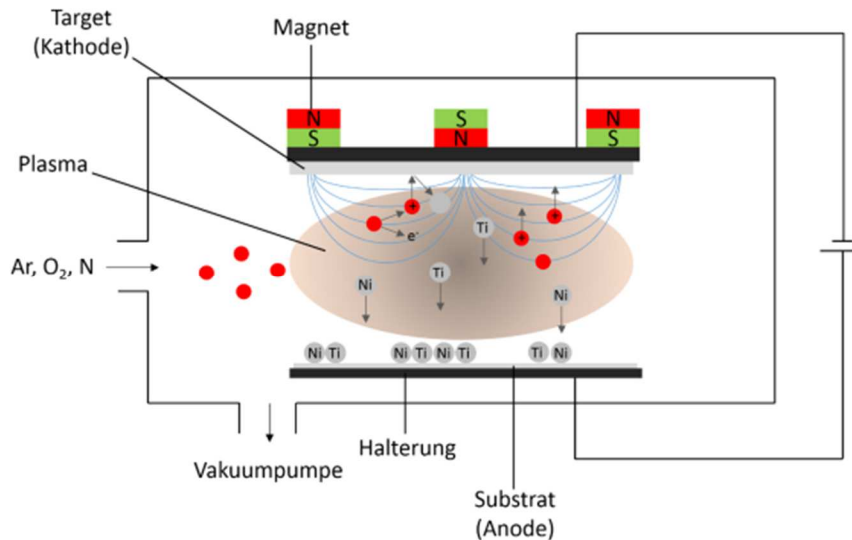


Abbildung 18: Schematische Darstellung des DC-Magnetronsputter Prozesses.

Die Abscheidungsrate ist abhängig von der Sputterrate und die Sputterrate ist wiederum abhängig von dem Gasdruck in der Kammer. Ein höherer Gasdruck bedeutet, dass mehr Gasionen auf das Target treffen und dadurch mehr Teilchen herausgeschlagen können, bedeutet jedoch auch eine verringerte freie Weglänge. Ein wichtiger Faktor für die quantitative Beschreibung der Abscheidung ist der Sputter Yield:

$$\text{Sputter Yield} = \frac{\# \text{ herausgelöste Teilchen}}{\# \text{ Target treffende Ionen}}$$

die Anzahl der aus dem Target gelösten Teilchen pro eintreffendes Ion.<sup>72</sup> Das Modell von Wehner und Anderson (Abbildung 19) zeigt einige mögliche Prozesse, die ausgelöst werden, wenn ein Ion die Oberfläche trifft.<sup>73</sup>

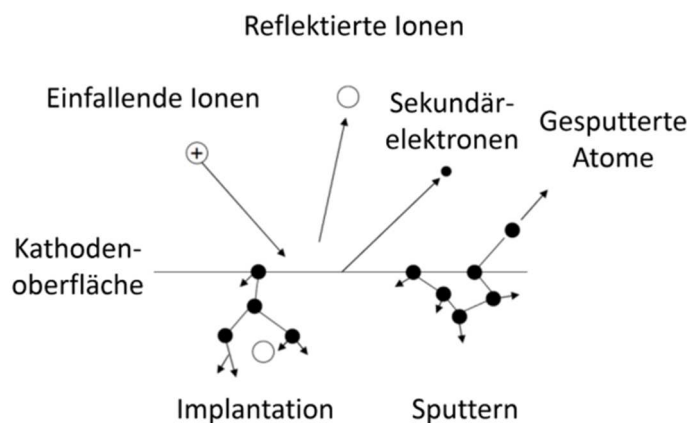


Abbildung 19: Einfaches Modell für Prozesse, die Ionen auslösen können, wenn sie auf die Kathode treffen; nach Wehner und Anderson.<sup>73</sup>

Geringe Energien der Ionen (< 10 – 100 eV) reichen normalerweise nicht aus, um Targetatome herauszulösen und haben einen geringen Sputter Yield zur Folge. Im

Gegensatz dazu führt eine zu große Energie ( $> 10 \text{ keV}$ ) dazu, dass die Ionen tief in das Targetmaterial eindringen und Ionen-Implantation erfolgt, was ebenfalls zu einer Verringerung des Sputter Yield führt.<sup>74</sup> Die optimale Energie liegt in dem Bereich dazwischen und im Idealfall kann ein Gasion mehrere Targetatome herauslösen. Normalerweise liegt der Sputter Yield in einem Bereich zwischen 1 und 2 bei einer optimierten Ionenenergie.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Abscheidungsrate beeinflusst, ist der Ionenfluss. Um den Ionenfluss im Plasma zu maximieren, wird ein Magnetron verwendet. Ein Magnetfeld senkrecht zum elektrischen Feld zwingt die Elektronen im Plasma auf eine Helixbahn. Die Weglänge des Elektrons wird vergrößert und damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Elektron ein Gasatom ionisiert. Die Folge eines zusätzlichen Magnetfeldes ist ein höherer Anteil von Gasionen im Plasma und damit ein höherer Ionenfluss und Sputter Yield. Die Wachstumsrate des Films ist abhängig vom Sputter Yield und dem Transport der Teilchen durch das Plasma hin zum Substrat. Der Sputter Yield weist zusätzlich eine Winkelabhängigkeit als Funktion des Targetmaterials und der Energie der einfallenden Ionen auf. Im Allgemeinen nimmt die Winkelabhängigkeit mit steigendem Sputter Yield ab.<sup>75</sup>

Die Eigenschaften von superelastischen Filmen sind stark von der Stöchiometrie des Materials abhängig. Aufgrund der Winkelverteilung der gesputterten Komponenten ist der Fluss der gesputterten Teilchen abhängig vom Ausstoßwinkel und führt zu einem charakteristischen Verlust von Ti während des Sputter Prozesses.<sup>76-78</sup>

Die Mikrostruktur des gesputterten NiTi ist abhängig von der Substrattemperatur. Auf einem gekühlten Substrat wird die NiTi-Dünnschicht im amorphen Zustand abgeschieden und kann durch einen späteren Erhitzungsprozess kristallisiert werden. Grundsätzlich kann das Filmwachstum durch die folgenden sechs Punkte zusammengefasst werden: 1) Adsorption des Atoms an der Oberfläche, 2) Diffusion, 3) Reaktion der adsorbierten Atome untereinander und mit der Oberfläche des Substrats und die Bildung von Bindungen des Films. 4) Die Keimbildung beschreibt den Prozess der Aggregation des Materials und ist abhängig von der Oberflächenenergie des Substrats. Hier werden drei unterschiedliche Arten unterschieden: Frank-Van der Merwe (Schicht), Volmer-Weber (Inseln) und Stranski-Krastanov. 5) Während des Wachstums entwickelt der Film eine Struktur/Morphologie. Ein Modell von Thornton beschreibt die Mikrostruktur eines gesputterten Films in Abhängigkeit von der Temperatur des Substrats  $T_s$ , dem Schmelzpunkt des gesputterten Materials  $T_m$  und dem Gasdruck des Sputter Gases

(Abbildung 20 und Tabelle 4).<sup>79</sup> 6) Letztlich kommt es zu einer Diffusionswechselwirkung zwischen dem Substrat und dem Grundmaterial im Film.

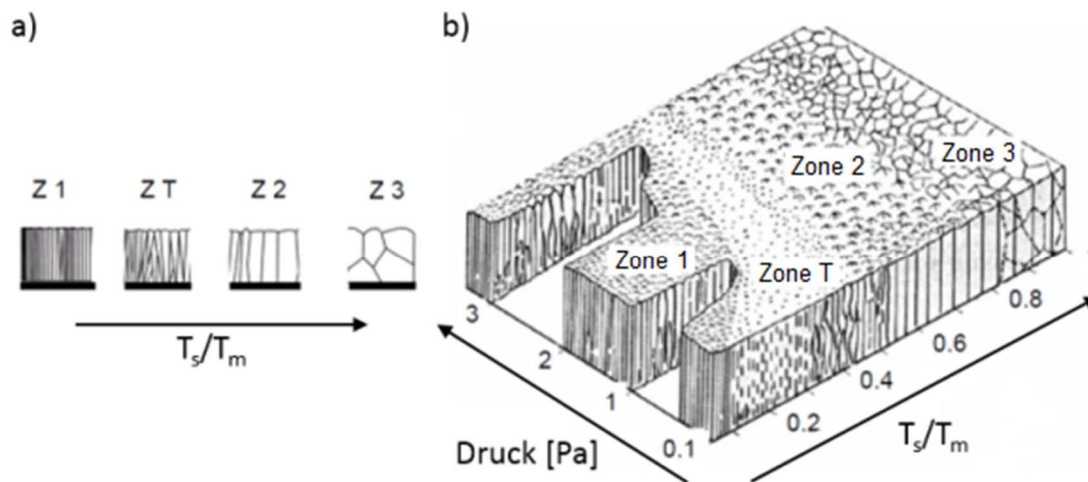


Abbildung 20: a) Schematische Darstellung des Strukturzonenmodells, b) Mikrostrukturen für gesputterte Filme nach dem Modell von Thornton in Abhängigkeit von  $T_s$ ,  $T_m$  und dem Gasdruck.<sup>80</sup>

Zone	$T_s / T_m$	Mikrostruktur	Mechanische Eigenschaften
Z1	< 0,1 (0,15 Pa) bis 0,5 (4 Pa)	Poröse Grenzen, faserartige Körner. Z1 begünstigt durch Substrat Rauheit und schrägem Abscheidungswinkel.	Hart
ZT	0,1 – 0,4 (0,15 Pa) bis 0,4 – 0,5 (4 Pa)	Faserartige Körner, dichte Korngrenzen.	Hohe Versetzungsdichte, hart. Hohe Festigkeit, niedrige Duktilität.
Z2	0,4 – 0,7	Säulenförmige Körner, dichte Korngrenzen.	Hart, niedrige Duktilität.
Z3	0,6 – 1,0	Große, gleichachsige Körner und glänzende Oberfläche.	Niedrige Versetzungsdichte, weiche rekristallisierte Körner.

Tabelle 4: Strukturzonen in gesputterten Filmen nach Thornton.<sup>72</sup>

### 2.3.2 UV-Lithographie

Der zweite wichtige Schritt neben der Abscheidung der Filme auf dem Substrat ist die Strukturierung durch Lithographie. Die UV-Lithographie ist eine Methode zur Übertragung eines bestimmten Musters auf eine fotosensible Polymerschicht. Eine dünne Schicht des Fotolacks wird durch Spin-Coating, Spray-Coating oder Dip-Coating-Verfahren auf einen Silizium-Wafer als Substrat aufgetragen. Unterschiedliche Parameter wie die



Beschaffenheit des Lacks und Spin-Geschwindigkeit beim Spin-Coating beeinflussen die erreichte Schichtdicke.

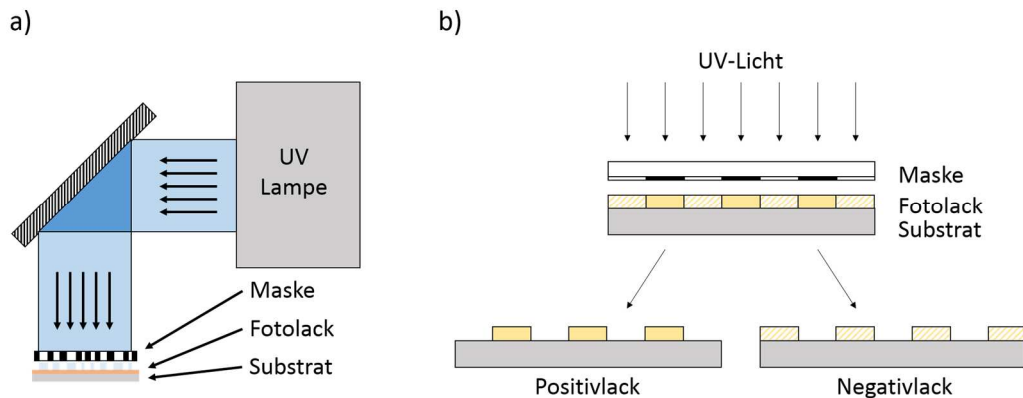


Abbildung 21: a) Schematische Darstellung und Aufbau des Mask Aligners b) Lithographie-Prozess: Nach der Belichtung des Fotolacks folgt die Entwicklung.

In der Lithographie wird ein Fotolack, der aus einem Polymer besteht, einer Strahlung ausgesetzt. Meistens wird UV-Strahlung verwendet; um bessere Auflösungen zu erzielen, wäre die viel aufwendigere Elektronenstrahl-Lithographie die bessere Alternative. Der belichtete Fotolack wird anschließend entwickelt und im Idealfall bildet er ein exaktes Abbild der Maske auf dem Substrat ab. Die üblichen Schritte in der Lithographie zur Strukturierung von Dünnschichten sind die Präparation des Substrats, das Auftragen des Fotolacks durch Spin-Coating, Softbake, UV-Belichtung, Entwicklung, Hardbake und eine abschließende optische Inspektion. Die Präparation dient dem Zweck, eine nicht kontaminierte Oberfläche zu erhalten, um die Haftung des Lacks zu verbessern. Dies wird durch eine gründliche Reinigung mit organischem Lösungsmittel, eine Erhitzung zur Entfernung von Feuchtigkeit sowie den Einsatz eines Adhäsions-Promoters erreicht. Auf der Si-Oberfläche bildet sich Siloxane (SiOH), das für eine schlechtere Haftung des Lacks verantwortlich ist. Adhäsions-Promoter wie Hexamethyldisiloxane (HMDS) ersetzen im Allgemeinen die OH-Gruppen durch organische funktionelle Gruppen, die eine verbesserte Haftung des Lacks ermöglichen.<sup>81</sup>

Im nächsten Schritt wird der Fotolack durch Spin-Coating auf das Substrat aufgetragen. Durch eine Rotation des Substrats mit Geschwindigkeiten zwischen 2000 und 5000 Drehungen pro Minute verteilt sich der aufgetragene Lack homogen auf dem Substrat. Die daraus resultierende Lackschicht wird durch Prozessparameter wie Rotationsgeschwindigkeit und -dauer, Beschleunigung und Lackeigenschaften (Viskosität, Anteil der Lösungsmittel zu Feststoffen) beeinflusst. Die resultierende Schichtdicke kann

dabei grob durch die Viskosität  $\nu$  und die Rotationsgeschwindigkeit  $\omega$  abgeschätzt werden.<sup>81</sup>

$$\text{Schichtdicke} \sim \frac{\nu^{0,4}}{\omega^{0,5}}$$

Der Fotolack enthält etwa 20 bis 40% Lösungsmittel. Ein anschließender Softbake stabilisiert die Lackschicht und entfernt durch Erwärmen einen großen Teil der enthaltenen Lösungsmittel aus dem Lack. Nach dem Softbake erfolgt die Belichtung des Fotolacks. UV-Licht sorgt für eine chemische Umwandlung des Polymers. Positiver Fotolack wird durch die Belichtung lösbarer, verantwortlich dafür ist eine Schwächung der Polymerketten. Negativer Fotolack erfährt eine Stabilisierung durch Cross-Linking der Ketten und wird dadurch weniger löslich. Als Maske dient eine Glasplatte mit einem lichtundurchlässigen Cr-Muster. Während der Belichtung kann das Substrat in Kontakt mit der Maske sein, oder es wird ein definierter Abstand zwischen Substrat und Maske eingestellt. Der Vorteil des Kontaktes liegt in der besseren Auflösung, nachteilig ist eine mögliche Kontamination oder sogar eine Schädigung der Maske. Außerdem muss die Maske nach jeder Belichtung geprüft und gereinigt werden. In der Massenproduktion werden daher Nicht-Kontaktverfahren verwendet. Die erreichbare Auflösung hängt von der Distanz zwischen Maske und Substrat  $d$  und der verwendeten Wellenlänge  $\lambda$  ab:<sup>74</sup>

$$\text{Auflösung} \sim \sqrt{d\lambda}$$

Um trotz dieser Limitierung in der Massenproduktion sehr gute Auflösungen zu erhalten, werden Linsen eingesetzt, die das Abbild auf die Oberfläche projizieren (projection printing). Bei UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 193 nm werden mit dieser Methode heute Strukturen weit unter 100 nm produziert.<sup>74</sup>

Die Belichtungszeit  $t_B$  wird aus der für den Fotolack charakteristischen Energie  $E$  und der Intensität der einfallenden Strahlung  $I$  berechnet

$$t_B = \frac{E}{I}$$

Nach der Belichtung wird ein Post-Belichtungs Bake ausgeführt, um die Fotoreaktion im Lack abzuschließen. In der anschließenden Entwicklung wird der Fotolack selektiv gelöst, sodass ein binäres Abbild der Cr-Maske aus Fotolack und komplett freier Oberfläche auf dem Substrat zurückbleibt. Ein abschließender Hardbake bei etwa 120°C stabilisiert die Lackschicht für weitere Prozesse.

### 2.3.3 Ätzen

Ein weiterer Schritt in der Strukturierung von Dünnschichten ist das Ätzen. Dabei wird das zu ätzende Festkörpermaterial, welches nicht von schützendem Fotolack bedeckt ist, in eine Flüssig- oder Gasphase umgewandelt.<sup>82</sup> Hierbei wird zwischen nasschemischem und trockenem Ätzen unterschieden. Nasschemisches Ätzen zeichnet sich dabei durch hohe Ätzraten und stark selektives Ätzen aus (Selektivität beschreibt das Verhältnis von der Ätzrate des zu ätzenden Materials zur Ätzrate des Fotolacks oder anderer nicht zu ätzenden Komponenten). Die Ätzrate ( $\ddot{A}R$ ) ist die abgetragene Schichtdicke in Abhängigkeit von der Zeit:

$$\ddot{A}R = \frac{\text{Abgetragene Schichtdicke}}{\text{Zeit}}$$

Nachteil des chemischen Ätzens ist jedoch ein isotropes Ätzen, bei dem die Abtragsrate des Materials in vertikaler sowie horizontaler Richtung gleich ist. Folge ist ein Unterätzen, bei dem Material unter dem Fotolack oder unter der schützenden Schicht abgetragen wird. Anisotropes Ätzen wird durch gerichtete Abtragung erreicht. Ionen eines Plasmas werden durch ein elektrisches Feld auf das Substrat beschleunigt. Das Ätzen entspricht hier zu einem Teil dem chemischen Ätzen, indem das Plasma mit der Oberfläche reagiert und zu einem zweiten Teil physikalischem Sputtern, indem die energiereichen Teilchen durch Kollision die Oberfläche des Substrats abtragen. Die chemische Komponente führt auch hier zu einem isotropen Ätzen mit hoher Selektivität. Die physikalische Komponente ätzt anisotrop und stark gerichtet, weist aber eine geringe Selektivität auf. Unterschiedliche Materialien werden mit etwa gleicher Rate abgetragen. Eine Möglichkeit, selektives chemisches und gleichzeitig gerichtetes Ätzen zu erreichen, ist das reaktive Ionen-Ätzen. Hier rufen die Ionen des Plasmas eine chemische Reaktion mit den Atomen an der Oberfläche hervor und tragen auf diese Weise Material ab. Nachteile des Plasma-unterstützten Ätzens sind die geringe Ätzrate, geringe Selektivität und hohe Kosten; durch hohe Energien dringen Teilchen tief in die zu ätzenden Schichten ein und können Defekte im Material hervorrufen und durch parasitäre Ablagerungen können sich bereits geätzte Teilchen an der Oberfläche ablagern.<sup>82-84</sup>

### 3 Methoden

Die Herstellung und die Methoden zur Charakterisierung der NiTi-Dünnschichten sowie die experimentellen Aufbauten zur Charakterisierung der NiTi-Herzklappensegel sind Inhalt dieses Kapitels.

#### 3.1 Probenpräparation

Die Herstellung der freitragenden NiTi-Dünnschichten erfolgt durch einen mehrstufigen Prozess aus einer Materialabscheidung durch Magnetronspütern sowie einer Strukturierung mittels UV-Lithographie und Nassätzverfahren.

Für die Herstellung der NiTi-Dünnschichten standen zwei Sputteranlagen zur Verfügung. Eine Alcatel 450 Anlage für 4“-Substrate und zusätzlich eine Oerlikon Balzers Anlage für 6“-Substrate.

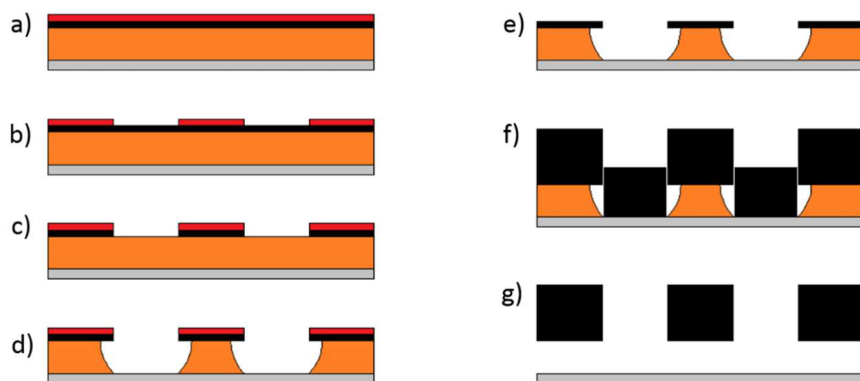


Abbildung 22: Ablaufdiagramm für den Herstellungsprozess von freitragenden NiTi-Dünnschichten nach Lima de Miranda.<sup>85</sup>

Die Sputterparameter für die Abscheidung von Cu und NiTi sind in Tabelle 5 dargestellt. Um freitragende Filme zu erhalten, wird zuerst eine Opferschicht Cu auf dem Substrat abgeschieden (Abbildung 22). Im zweiten Schritt wird eine dünne Schicht NiTi mit etwa 450 nm Dicke auf die Cu-Schicht abgeschieden.

Parameter	Cu	NiTi
Leistung / W	400	300
Druck / mbar	$< 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
Ar Gas Flussrate / SCCM	20	20
Sputter Druck / mbar	$4 * 10^{-3}$	$2 * 10^{-3}$
Target-Substrat Abstand / cm	6	4,7

*Tabelle 5: Sputterparameter für die Abscheidung von Cu und NiTi mit der Alcatel 450 Anlage.*

Anschließend wird mittels eines Spin-Coating-Verfahrens Fotolack 2  $\mu\text{m}$  dick AZ1518 auf dem Substrat aufgetragen (Abbildung 22a). Nach dem Auftragen erfolgt ein Softbaking-Prozess für 1 min bei 100°C. Anschließend wird der Lack auf dem Substrat im Maskaligner mit UV-Licht und einer Chrommaske strukturiert. Es handelt sich bei dem AZ 1518 um einen Positiv-Lack, was bedeutet, dass die mit UV-Licht beleuchteten Strukturen im Lack geschwächt werden und sich im darauffolgenden Entwicklungsprozess im AZ 726 Entwickler auflösen. Für die UV-Belichtung des Fotolacks zur Strukturierung der Filme wurde ein Süss MA6 Mask Aligner verwendet. Die UV-Lampe liefert eine Intensität von 30  $\text{mW}/\text{cm}^2$  auf der gesamten Oberfläche des Substrats. Die Belichtungszeit beträgt bei einer Belichtungs-dosis von 50  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  1,7 s. Das in Chrom auf der Maske befindliche Muster wird als Muster auf den Fotolack übertragen (Abbildung 22b). Nach der Entwicklung folgt der sogenannte Hardbake bei 120°C für 1 min.

Im nächsten Schritt wird das NiTi in den Bereichen, in denen der Lack entfernt wurde, durch ein nasschemisches Verfahren mit einer HF-haltigen Lösung geätzt (Zusammensetzung (100 ml): 80 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 14 ml  $\text{HNO}_3$ , 6 ml HF, ~5 g  $\text{NiSO}_4$ ) (Abbildung 22c). Mit einer verdünnten  $\text{HNO}_3$ -Lösung (Zusammensetzung (100ml): 25ml  $\text{HNO}_3$  und 75 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) wird anschließend die freiliegende Kupferschicht geätzt, was durch den isotropen Ätzvorgang zu einer sogenannten Pilzstruktur führt (Abbildung 22d). Der Lack wird entfernt und das Substrat gereinigt. In einem weiteren Sputterprozess wird die gewünschte Schichtdicke an NiTi auf dem Substrat abgeschieden. Das NiTi wächst sowohl auf den Pilzstrukturen als auch auf den Tälern in den Zwischenräumen (Abbildung 22f). Der NiTi-Film wächst dabei nicht zusammen. In verdünnter  $\text{HNO}_3$ -Lösung kann die Kupferschicht später nasschemisch gelöst werden und die freitragenden Filme werden von dem Substrat getrennt (Abbildung 22g).

### 3.1.1 Formgebungsverfahren

Die gesputterten, freitragenden NiTi-Filme sind amorph. Durch einen Glüh- oder Erhitzungsprozess werden die Filme kristallisiert. Ein Formgebungsverfahren für die dreisegelige Herzklappenform wurde entwickelt, um die freitragenden planaren NiTi-Filme in eine 3D-Herzklappensegel Form zu bringen. Dazu wurden Formen aus Edelstahl in der Form der Herzklappe angefertigt. Der NiTi-Film wird mit Hilfe dieser Form und einem negativen Abdruck derselben in die Form der Herzklappensegel gebracht und in diesem Zustand erhitzt (Abbildung 23). Der NiTi-Film kristallisiert und behält sie anschließend bei.

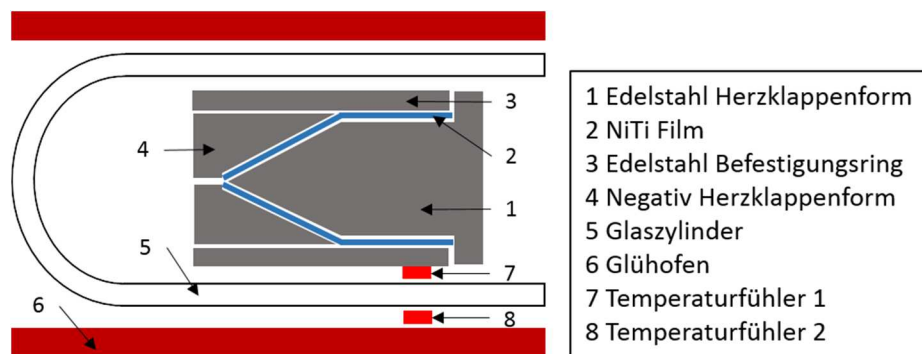


Abbildung 23: Schematischer Querschnitt durch den Aufbau für das Formgebungsverfahren.

### 3.2 Zellbesiedelung

Die natürliche Herzklappe besteht aus zwei Schichten, einer bindegewebsartigen Schicht aus valvulären interstitiellen Zellen (VIC) und einer Oberfläche aus valvulären endothelialen Zellen (VEC).<sup>86,87</sup> Die VIC, auch Myofibroblasten genannt, sorgen für den Strukturerthalt und den Wiederaufbau der Klappe. Sie besitzen die Eigenschaften von Fibroblasten und glatten Muskelzellen.<sup>88,89</sup> Die VEC haben die Eigenschaften von vaskulären Endothelzellen und bilden eine antithrombogene Oberfläche.<sup>90,91</sup>

Um die Funktionalität von NiTi-Dünnschicht hinsichtlich Tissue Engineering zu untersuchen, wurden Versuche zur Zellbesiedelung mit adulten Endothelzellen, CD133+ Vorläuferzellen und glatte Muskelzellen durchgeführt. CD133+ Progenitorzellen wurden aus dem Knochenmark eines Schafes gewonnen und können sich *in vitro* zu Endothelzellen differenzieren. Weitere Versuche zur Zellbesiedelung von NiTi-Dünnschichten wurden mit glatten Muskelzellen und adulten Endothelzellen aus der Artetia carotis vom Schaf durchgeführt. Die Prozesse zur Zellgewinnung sind in der Literatur von Boldt et al. detailliert beschrieben.<sup>92</sup>

## **Zelladhäsion**

Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biochrom AG Deutschland) gehalten. Dieses Medium wurde zusätzlich mit 10% fetalem Kälberserum (FBS, Biochrom AG), 1% Penicillin und Streptomycin (100 U/ml, Biochrom AG) sowie 5 ng/ml Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF, PeproTech) angereichtert. Während der Wachstumsphase befand sich das Medium mit den Zellen in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit. Reguläres Subkultivieren wurde mit 0,25% Trypsin/0,05% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Biochrom AG) durchgeführt. Während der Zelladhäsion wurden die freitragenden Proben auf PTFE-Haltern befestigt, um eine Zelladhäsion auf den Proben ohne Zellkontakt mit der Petrischale zu gewährleisten.

## **3.3 Film Charakterisierung**

### **3.3.1 Rasterelektronenmikroskopie**

Um vergrößerte Aufnahmen der Strukturen zu erhalten, wurden im Zuge dieser Arbeit unterschiedliche Rasterelektronenmikroskope (REM) verwendet. Ein Zeiss Ultra Plus REM wurde für die Aufnahmen der NiTi-Dünnschicht Strukturen verwendet und ein Hitachi S-4800 der Arbeitsgruppe Funktionelle Morphologie und Biomechanik von Prof. Dr. Gorb in der Sektion Biologie der Universität zu Kiel zur Charakterisierung von zellbesiedelten NiTi-Strukturen.

### **3.3.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie**

Ein ULTRA Series Field Emission Scanning Electron Microscope von Carl Zeiss Microscopy mit Möglichkeit für die Energiedispersive Röntgenspektroskopie wurde verwendet, um die Zusammensetzung der NiTi-Dünnschichten zu bestimmen (EDX: Oxford instruments INCA 3.04). Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Material mit einheitlichen Elektronen angeregt. Durch ein einfallendes Elektron wird ein Elektron aus der K-Schale des Atoms herausgeschlagen. Diese Leerstelle wird sofort von einem Elektron aus einem höheren Orbital besetzt und die Energiedifferenz in Form von Röntgenstrahlung freigesetzt. Der Übergang von Elektronen vom L zum K Orbital erzeugt

hierbei die  $K_{\alpha}$ -Linie und ein Elektronenübergang vom M auf das K Orbital erzeugt die  $K_{\beta}$ -Linie. Die Energie der frei gewordenen Röntgenquanten und damit ihre Wellenlänge ist abhängig von der Energiedifferenz der Orbitale. Diese Strahlung ist charakteristisch für jedes Element und somit können Rückschlüsse auf die Stöchiometrie des Materials gezogen werden. Für eine Kalibrierung stand eine  $Ni_{50}Ti_{50}$  Standardprobe zur Verfügung, um die genaue Zusammensetzung der hergestellten Dünnschichten genau bestimmen zu können. Die Messungen wurden von Dr. Christiane Zamponi aus der Arbeitsgruppe Anorganische Funktionsmaterialien im Nanolabor der Technischen Fakultät in Kiel durchgeführt.

### 3.3.3 Röntgenbeugung

Röntgenbeugung wurde angewendet, um die kristalline Phase des NiTi zu charakterisieren. Ein Gerät der Marke Seifert XRD 3000 TT Röntgendiffraktometer (Cu  $K_{\alpha}$  hat eine Wellenlänge von  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ) wurde hierfür verwendet. Bei dieser Messmethode trifft ein monochromatischer Röntgenstrahl unter dem Winkel  $\theta$  auf die Probe und unter dem Winkel  $2\theta$  wird der reflektierte Strahl detektiert (Abbildung 24). Unter Erfüllung der Bragg-Bedingung kommt es zur konstruktiven Interferenz der reflektierten Strahlung, und ein charakteristischer Peak wird detektiert. Die Bragg-Bedingung lautet: <sup>80</sup>

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

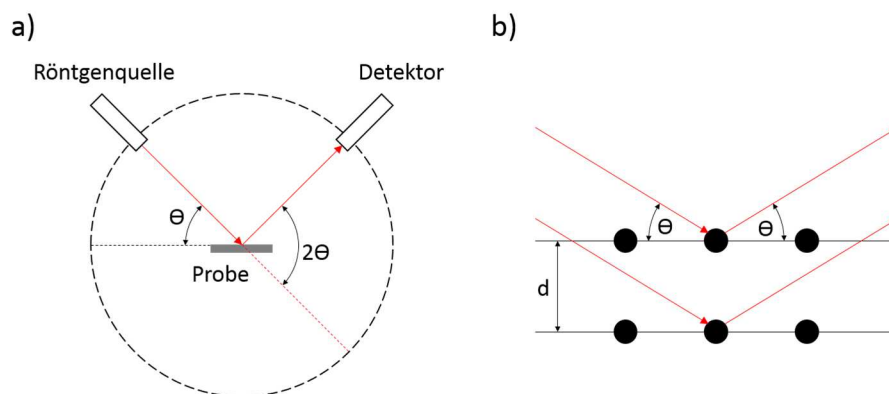


Abbildung 24: a) Aufbauschema für die Röntgenbeugung zur Bestimmung der kristallinen Phasen  
b) Bragg Bedingung.

### 3.3.4 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die Dynamische Differenzkalorimetrie ist ein thermisches Verfahren, das zur Bestimmung der Phasenübergänge von Austenit zu Martensit der NiTi-Dünnschichten eingesetzt wurde. Es wurde ein Differentialkalorimeter von Perkin Elmer verwendet. Die zu untersuchende



Probe befindet sich hierbei in einem Tiegel und ein leerer Tiegel dient als Referenzprobe. Während des stetigen Abkühlens und des anschließenden Aufheizvorganges wird die Wärmemenge gemessen, die der Probe zugeführt werden muss. Kommt es zu einer endothermen oder exothermen Reaktion in Folge einer Phasenumwandlung, weicht die zugeführte Wärmemenge der Probe von der Referenz ab und die differenzielle Messung weist einen Peak auf. Die Messungen wurden in einem Bereich von  $-80^{\circ}\text{C}$  bis  $+60^{\circ}\text{C}$  mit einer Rate von  $10\text{ K/min}$  durchgeführt.

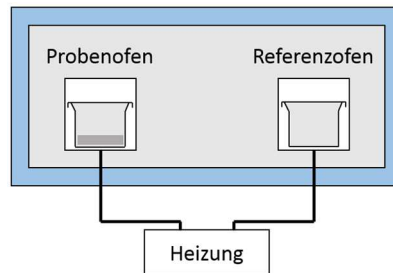


Abbildung 25: Schematischer Aufbau der Differenzialkalorimetrie.

Eine endotherme Reaktion führt dazu, dass der Probe mehr latente Wärme als der Referenz zugeführt wird, was sich in einem Peak in der Messung niederschlägt. Bei einer exothermen Reaktion wird die bei der Umwandlung entstehende Wärme abgeführt, was in der Messung zu einem negativen Peak führt. Der Beginn des Peaks bestimmt dabei den Anfang der Umwandlung und das Ende des Peaks den Zustand, nach dem die Probe komplett umgewandelt ist.

### 3.3.5 Zugtests

Zugtests sind eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Materialien. Unter einer definierten Dehnung wird die mechanische Spannung gemessen und so können Informationen über die spannungsinduzierte Umwandlung in Martensit, das superelastische Plateau und die Bruchdehnung gewonnen werden. Zugtests an freitragenden NiTi-Dünnschichten wurden an einer Zwick/Roell Z0.5 Zugmaschine durchgeführt. Die Probe befand sich dabei in einer isolierten beheizbaren Kammer und die Zugtests wurden bei Raumtemperatur oder bei Körpertemperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  ausgeführt.

### 3.3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Zellbesiedelung auf strukturierten NiTi-Dünnschichten zu untersuchen, wurde Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden Fluoreszenzfarbstoffe durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, so dass diese Licht mit einer anderen Wellenlänge emittieren. Bestimmte Filter sorgen dafür, dass nur das emittierte Licht beobachtet wird. Für die Aufnahmen wurden ein Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS NT) sowie ein Fluoreszenzmikroskop (IX 81, Olympus, Germany) verwendet. Die zu untersuchenden Zellen haben die charakteristischen Farbstoffe während der Inkubation aufgenommen. Als Farbstoff wurde in den Experimenten zu dieser Arbeit Calcein-AM (AM = Acetoxymethylester) eingesetzt. Dieser Farbstoff wird durch die Zellmembran von lebenden Zellen aufgenommen. Im Inneren der Zelle werden die Acetoxymethyl- und die Acetatgruppen durch Esterasen abgespalten und in Calcein umgewandelt. Bindet das Calcein Kalziumionen, führt dies zu einer Fluoreszenz, welche ein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge 494 nm und ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 517 nm hat. Da abgestorbene Zellen keine Esteraseaktivität aufweisen, findet keine Umwandlung in Calcein statt. Daher werden auf diese Weise nur vitale Zellen grün markiert.

## 3.4 Klappencharakterisierung

Für die Charakterisierung der NiTi-Dünnschicht-Klappensegel standen verschiedene Aufbauten zur Verfügung, die in diesem Kapitel beschrieben werden.

### 3.4.1 *In vitro* Kreislauf Testsystem

Um die erste Charakterisierung der NiTi-Dünnschicht Herzklappen durchzuführen, wurde ein einfaches dynamisches Kreislaufsystem entwickelt. Mit diesem Aufbau können systolische sowie diastolische Bedingungen über die Klappe erzeugt werden. Ein Kolben wird von einem Motor angetrieben. Über die Geschwindigkeit des Kolbens werden die Herzschlagraten und damit das Herzminutenvolumen eingestellt. Mit einem Kolbendurchmesser von 75 mm und einem Kolbenhub von 63 mm ergibt sich ein Pumpvolumen von 70 ml pro Schlag. Weitere verwendete Testparameter sind in der Tabelle 6 dargestellt. Um die radiale Stabilität der Klappenform während der Tests zu

gewährleisten, wurden die 3D-Segelform von innen mit einem speziell geformten dünnen Blech stabilisiert und in die Klappenhalterung mit einem Moosgummiring geklemmt. Der Moosgummiring verhindert zusätzlich einen paravalvulären Rückfluss während der Tests.

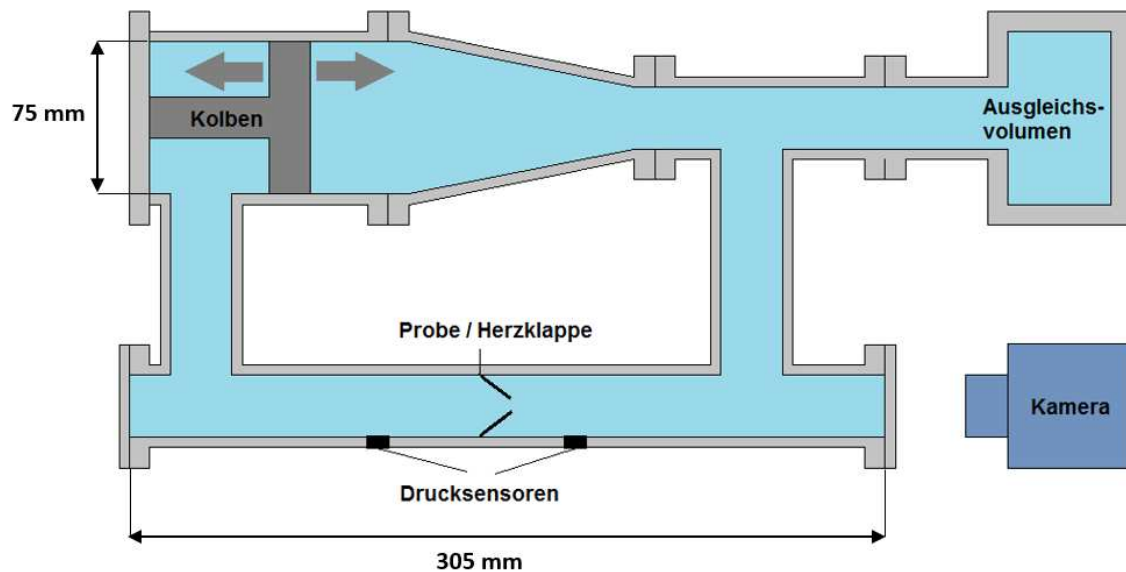


Abbildung 26: Schematischer Aufbau des *in vitro* Kreislauf Testsystems zur dynamischen Charakterisierung der Herzklappensegel. Der Kolben hat einen Durchmesser von 75 mm und pumpt mit einem Kolbenhub von 63 mm ein Volumen von 70 ml pro Schlag.

Frequenz / Hz	0,69	1,05	1,2	1,35
Herzrate / Schläge/min	41	63	72	81
Herzminutenvolumen / l/min	3,1 ± 0,2	4,7 ± 0,3	5,4 ± 0,4	6,1 ± 0,4

Tabelle 6: Pumpfrequenz und das daraus resultierende Schlagvolumen und das Herzminutenvolumen.

Mit einer Kamera können die Öffnungssequenzen während der dynamischen Funktion aufgenommen werden. Es befinden sich zwei Drucksensoren in jeweils subvalvulärer und supra-valvulärer Position. Aus den Daten wurden die transvalvulären Druckdifferenzen während der Systole und der Diastole ausgewertet. Die Druckdifferenzen geben Aufschluss über das Öffnungs- und Schließverhalten der Klappensegel.

### 3.4.2 Pulsduplikatorsystem

Eine weitere hydrodynamische *in vitro* Charakterisierung der NiTi-Dünnschicht-Klappensegel erfolgte mit einem pulsatilem Herzklappentester in der Herz- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel (UKSH).<sup>15,94,95</sup> Der Aufbau besteht aus einer Antriebseinheit mit einem Schrittmotor und einem Hubkolben zur

Erzeugung eines Vortriebs des Messfluids. Als Messfluid wird destilliertes Wasser verwendet, um einen hohen hygienischen Aufwand und Ablagerungen zu vermeiden und Sichtbarkeitsmessungen zu ermöglichen. Die Messtrecke ist so konstruiert, dass ein charakteristisches Anströmungsprofil einer Herzklappe ausgelöst werden kann. Subvalvulär und supravulvulär befinden sich Drucksensoren, um die transvalvulären Druckdifferenzen während der pulsativen Messung aufzuzeichnen. Das oben angebrachte Flüssigkeitsreservoir ist luftdicht verschließbar. Dadurch kann ein definierter Gegendruck/Vordruck durch das eingeschlossene Luftpolster in dem Kreislaufsystem erzeugt werden. Für die Tests wurde ein Vordruck von 80 mmHg eingestellt, was in etwa den physiologischen Voraussetzungen einer Aortenklappe entspricht. An der Rückflusstrecke befindet sich ein Rücklaufventil, das eine Abdichtung der Rückflusstrecke während der Systole (Auswurfphase) bildet und einen Fluidfluss während der Diastole gewährleistet.

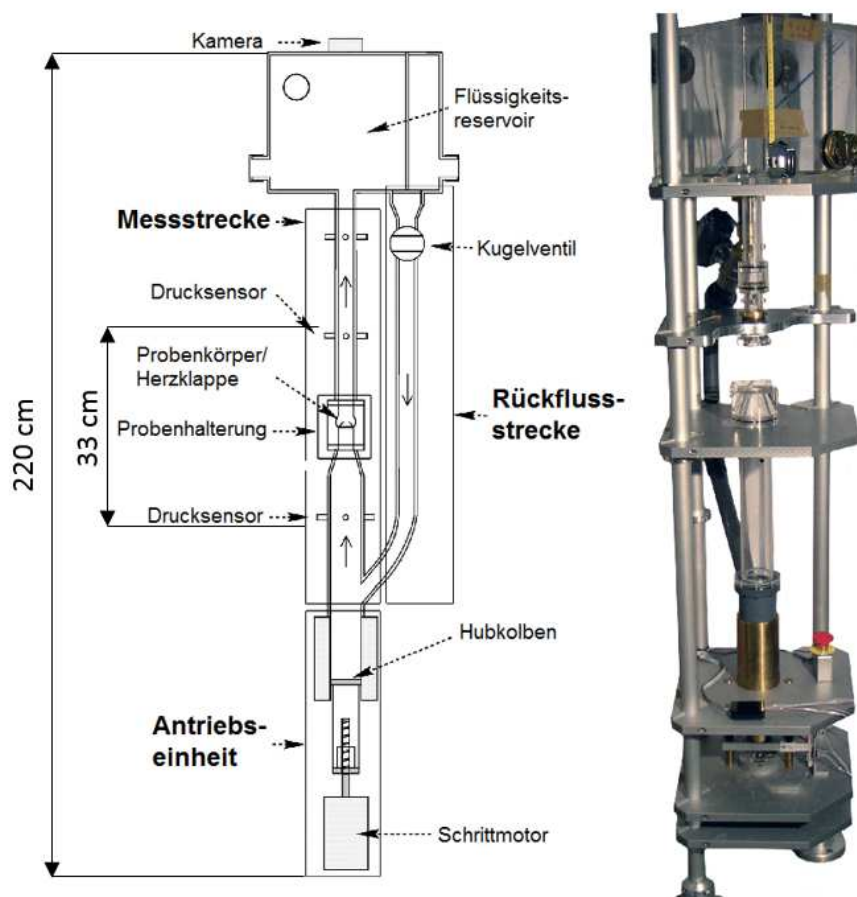


Abbildung 27: Experimenteller Aufbau des Pulsduplikatorsystems.<sup>94</sup>

Durch den Kolbenhub kann das Schlagvolumen (70 ml) eingestellt werden. Die Geschwindigkeit des Kolbenhubs definiert die Schlagrate (40 – 75 Schlägen pro Minute). Das Herzminutenvolumen ergibt sich aus der Schlagrate des Schlagvolumens und liegt bei 2,8 l/min, 3,5 l/min, 4,2 l/min, 4,9 l/min und 5,25 l/min bei Herzraten von 40, 50, 60, 70 und 75 Schlägen/min. Eine oberhalb des Flüssigkeitsreservoirs angebrachte Kamera nimmt die Öffnungs- und Schließbewegung der Klappe auf. Aus diesen Sequenzen kann die effektive Öffnungsfläche sowie der Performance Index (Verhältnis von effektiver Öffnungsfläche zu Klappenquerschnittsfläche) ermittelt werden. Außerdem können Rückschlüsse auf die Beweglichkeit der Klappensegel erhalten werden, auf ihre gleichmäßige und übereinstimmende Bewegung und auf einen hinreichenden Verschluss. Aus den Videoaufnahmen und den gemessenen Druckdifferenzen und im Vergleich mit etablierten biologischen Klappenprothesen, kann so die Funktionalität der Herzklappensegel charakterisiert und beschrieben werden.

### **3.4.3 Dynamische Langzeitmessung und Ni-Freisetzung**

Da die dynamischen Aufbauten zur Charakterisierung der systolischen und diastolischen Eigenschaften der Klappensegel nicht für Langzeitmessungen mit vielen Zyklen geeignet sind, wurde ein weiterer Aufbau für bis zu  $1,5 \times 10^6$  Öffnungszyklen benutzt. Dieser experimentelle Aufbau wurde auch verwendet, um die Ni-Ionen Freisetzung der Dünnschicht-Klappensegel über einen Zeitraum von 15 Tagen unter Bewegung zu bestimmen. Der Aufbau besteht aus einer Peristaltikpumpe einer Herz-Lungen-Maschine und einem Wasserkreislauf mit Probenhalter und Ausgleichsvolumen. Als Testfluid wurde 1 l Reinstwasser verwendet. Die Messungen wurden mit einer Rate von  $70 \text{ min}^{-1}$  und einem Schlagvolumen von etwa 23 ml durchgeführt. Das Schlagvolumen liegt zwar unterhalb des natürlichen durchschnittlichen Schlagvolumens von 70 ml, reicht jedoch für eine regelhafte Klappenöffnung aus.

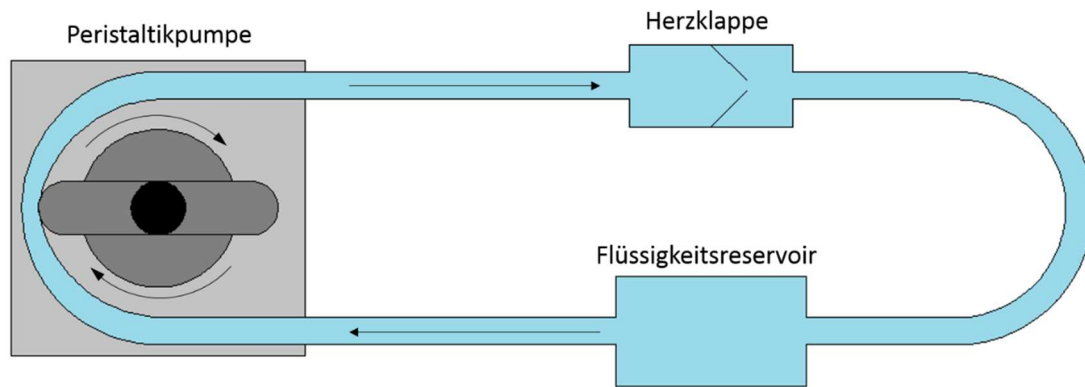


Abbildung 28: Schematischer Aufbau für dynamische Langzeitmessung der Klappensegel. Die Peristaltikpumpe sorgt für einen pulsatilen Fluss durch die Klappe, wodurch die Klappensegel öffnen und schließen.

Die Langzeitmessungen liefen über einem Zeitraum von 5 bis 15 Tagen, was insgesamt  $5 \times 10^5$  bis  $1,5 \times 10^6$  Öffnungszyklen entspricht. Die Entwicklung des Experiments und die Messungen wurden von Constantin Fühner in der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein im Rahmen einer medizinischen Dissertation ausgeführt.

Zusätzlich wurden während der Langzeittests alle drei Tage Proben der Flüssigkeit entnommen, um die Ni-Freisetzung der Klappensegelbewegung und damit unter mechanischer Belastung zu analysieren. Die Ni-Konzentration wurde durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) von Dr. Dieter Garbe Schönberg am Institut für Geowissenschaften, Abteilung Geologie der Christian-Albrechts Universität zu Kiel, bestimmt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 NiTi-Herzklappen mit 14 mm Durchmesser

Für die Prozessentwicklung und erste Tests für Herzklappensegel aus Dünnschicht-NiTi wurden Proben mit einer Alcatel 450 Magnetron-Sputteranlage hergestellt. Im folgenden Abschnitt werden die Eigenschaften der NiTi-Filme gezeigt. Weiter folgen die Beschreibung der Klappenmodelle und eine dynamische Charakterisierung unterschiedlicher NiTi-Klappensegel.

#### 4.1.1 Segeldesign und mechanische Eigenschaften

Die NiTi-Dünnschichten für die Herzklappensegel wurden nach dem Verfahren aus Abschnitt 2.3 auf einem Si-Substrat hergestellt. Die stöchiometrische NiTi-Zusammensetzung ist mittels EDX über das gesamte 4"-Substrat bestimmt worden (Abbildung 29). Außerhalb eines 4 cm x 4 cm großen Bereichs nimmt die Ti-Konzentration stark zu, bzw. die Ni-Konzentration stark ab. Da die mechanischen Eigenschaften der NiTi-Dünnschichten sehr stark von der Stöchiometrie des Materials abhängen, können die zu verwendenden Proben nur aus dem homogen verteilten Bereich des Substrats verwendet werden. Im homogen zusammengesetzten Bereich auf dem Substrat besteht das Material zu 50,4 at.-% Ni und 49,6 at.-% Ti.

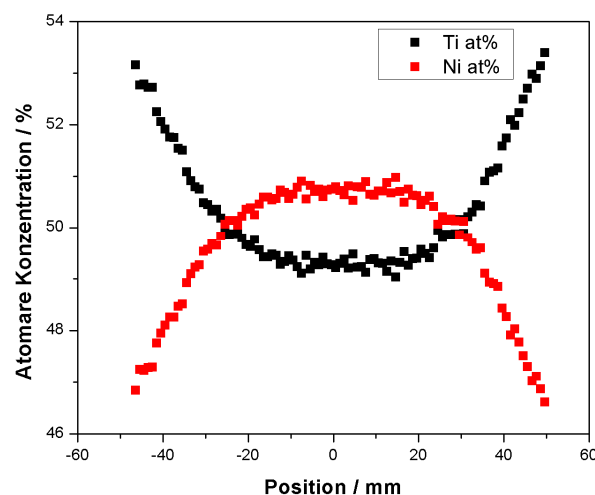


Abbildung 29: EDX-Daten für den NiTi-Film auf dem Substrat. Eine homogene, Ni-reiche Zusammensetzung wird in einem Bereich von 4 cm im Zentrum des Substrats erreicht.

Für die Charakterisierung der NiTi-Dünnschichten wurden die Phasenübergangstemperaturen mit Dynamischer Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry - DSC) bestimmt (Abbildung 30a und b) und in Tabelle 7 dargestellt. Am Rand des homogen zusammengesetzten Bereiches sind die Phasenübergangstemperaturen etwas höher, was durch eine leicht höhere Ti-Konzentration hervorgerufen wird. Die  $A_f$  Temperaturen liegen im Bereich von 21 – 25°C, einer für medizinische Anwendungen geeignete Temperaturspanne, da das Material bei 37°C Körpertemperatur in der austenitischen Phase vorliegen soll. Die Zugkurve bei 37°C zeigt den austenitischen elastischen Bereich (Abbildung 30). Ab einer Spannung von etwa 400 MPa erfolgt die Phasenumwandlung von Austenit zu Martensit. Das charakteristische Plateau reicht bis zu einer Zugdehnung von etwa 5 %. Bei 4% Dehnung und Entlastung erreicht die Probe ihren Ausgangszustand durch Rücktransformation von Martensit zu Austenit ohne plastische Verformung. Die Probe erreicht eine Bruchdehnung von ~20% bei einer Spannung von etwa 1400 MPa. Mit steigender Testtemperatur steigt die kritische Spannung an dem die martensitische Umwandlung beginnt. Die Steigung ist in Abbildung 30d als Temperatur-Spannungs-Diagramm aufgetragen. Die Steigung liegt bei  $d\sigma/dT = 7,7$  MPa/K.

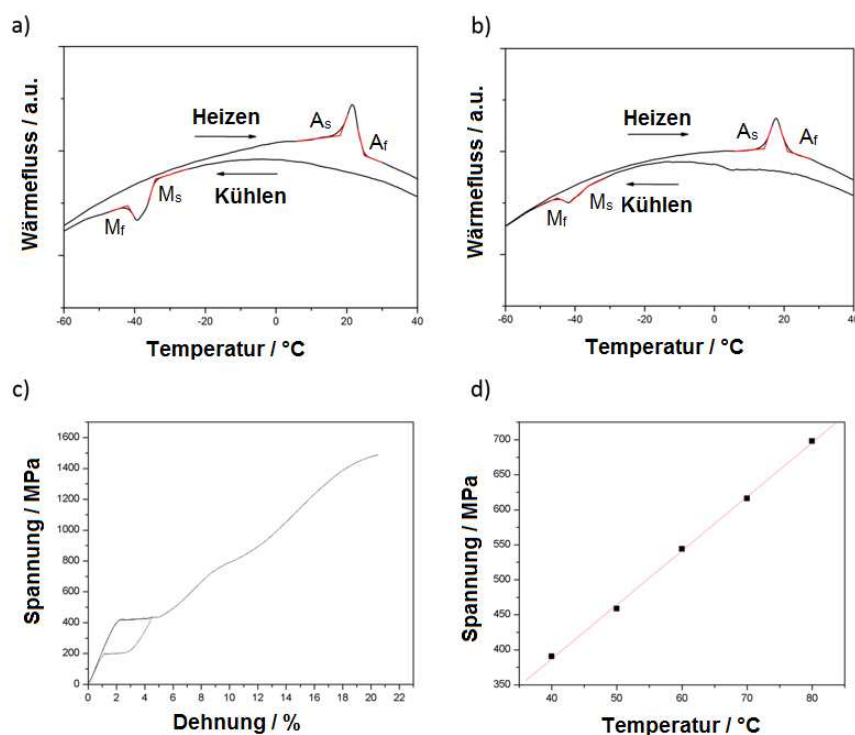


Abbildung 30: a) DSC Messung für gesputterte Dünnschichten im Zentrum der Proben, b) DSC für den Probenrand, c) superelastische Zugkurve der NiTi-Dünnschicht bei 37°C, d) Temperaturabhängigkeit der dehnungsinduzierten martensitischen Umwandlung.



Position	$M_f / ^\circ\text{C}$	$M_s / ^\circ\text{C}$	$A_s / ^\circ\text{C}$	$A_f / ^\circ\text{C}$
Zentrum	-42	-34,4	18,3	24,9
Probenrand	-45,1	-36,7	14,4	21,3

Tabelle 7: Phasenübergangstemperaturen im Zentrum sowie am Rand des homogen zusammengesetzten Bereichs. Eine leichte Variation in der Stöchiometrie führt zu einer Änderung der Phasenübergangstemperaturen.

Die freitragenden Filme für die ersten Klappenmodelle wurden nach dem vorher beschriebenen Verfahren gesputtert, durch Lithographie und nasschemische Prozesse strukturiert und vom Substrat gelöst (Kapitel 3.1). Die zweidimensionale Form der ersten Klappenmodelle ist in Abbildung 31 dargestellt.

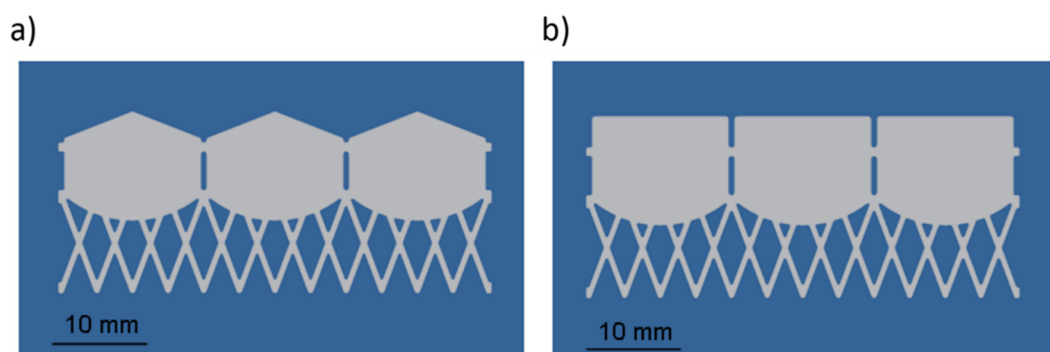


Abbildung 31: 2D-Form der dreiflügeligen Klappen a) Dreiblättrige Struktur für die Klappen ohne Koaptationsfläche b) 2D-Klappendesign für Klappen mit Koaptationsfläche.

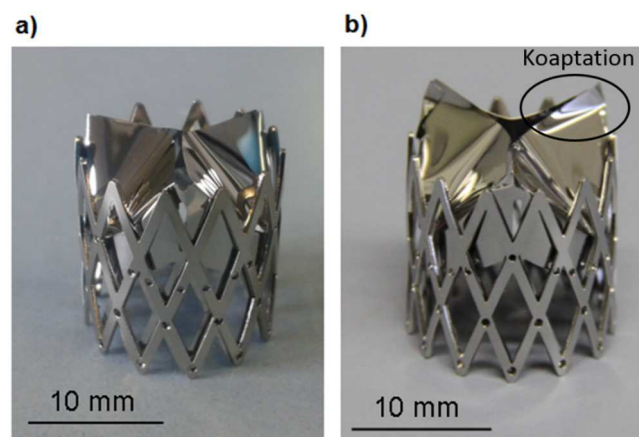


Abbildung 32: a) 3D-Herzklappenmodell ohne Koaptationsfläche b) 3D Herzklappenmodell mit Koaptationsfläche. Die Fixierung der Klappensegel an dem tragenden Stent wurde für die Versuche durch einfaches Kleben erreicht.<sup>96</sup>

Die im amorphen Zustand gesputterten und vom Substrat gelösten 2D-Herzklappenstrukturen werden zuerst bei einer Temperatur von  $650^\circ\text{C}$  für 5 min gegläht, um den kristallinen Zustand zu erreichen. In einem zweiten Schritt werden die Klappen in einer speziellen Edelstahlform, die der Form der späteren 3D-Herzklappenform entspricht,

bei 750°C für 20 min gegläht. Nach dieser Behandlung erhalten die Proben ihre 3D-Herzklappenform. Für die ersten Versuche im Kreislaufsystem wurden die Segel in 10 µm, 15 µm und 20 µm Schichtdicke hergestellt. Um den Einfluss von einem Überlapp zwischen zwei benachbarten Segeln zu untersuchen, wurde die Klappen mit 15 µm Schichtdicke mit einer Koaptationsfläche hergestellt (Abbildung 32). Um den Klappensegeln eine radiale Stabilität während der pulsatilen Experimente zu geben, wurden die NiTi-Dünnschicht Segel mit einem stabilen tragenden NiTi-Stent verklebt.

#### 4.1.2 Systolische Druckdifferenz

Die erste Charakterisierung der NiTi-Dünnschicht-Herzklappen wurde mit dem Kreislauf Testsystem durchgeführt (Abschnitt 3.4.1). Mit diesem Aufbau können systolische sowie diastolische Bedingungen über die Klappe erzeugt werden. Um die radiale Stabilität der Klappenform während der Tests zu gewährleisten, wurden die 3D-Segelform von innen mit einem kronenartig geformten, dünnen, runden Blech stabilisiert. Durch dieses dünne Blech wird die an den Stent anliegende NiTi-Dünnschicht zwischen dem Blech und dem Stent eingeklemmt, um der Klappe eine bessere Stabilität in der Halterung während der pulsatilen Tests zu verleihen. Ein Moosgummiring umschließt die Klappe und verhindert eine paravalvuläre Leckage. Über die Geschwindigkeit des Kolbens werden die Herzschlagraten und damit das Herzminutenvolumen eingestellt. Die verwendeten Testparameter sind in der Tabelle 6 dargestellt.

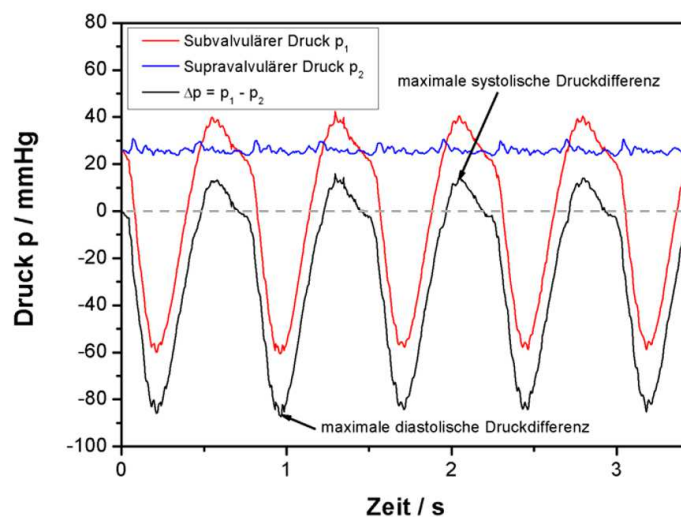


Abbildung 33: Zeitlicher Druckverlauf an den Drucksensoren im Kreislaufsystem bei einer Frequenz von 1,2 Hz: Druckmessung vor der Klappe (rot), Druckmessung hinter der Klappe (blau) und die sich daraus ergebende Druckdifferenz (schwarz). Eine positive Druckdifferenz  $> 0$  wird der systolischen Phase, eine Druckdifferenz  $< 0$  der diastolischen Phase zugeordnet.

Die gemessenen Druckdifferenzen über die Klappe geben Aufschluss über die systolischen Eigenschaften der Klappen (Abbildung 33).

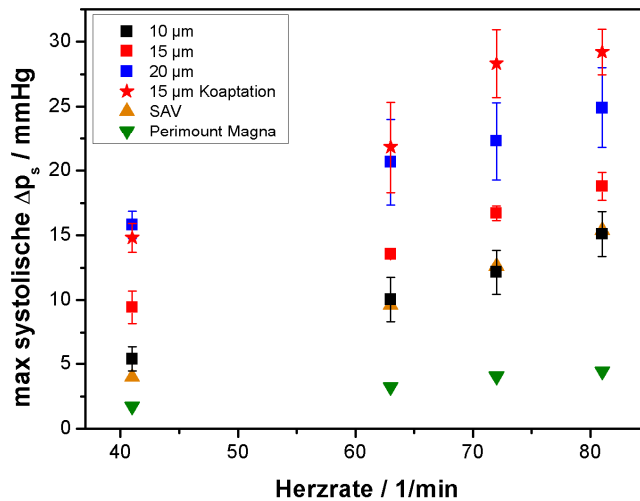


Abbildung 34: Maximale transvalvuläre Druckdifferenz während der Systole. Die biologische Klappe Perimount Magna (26 mm Durchmesser) und die Edwards S.A.V. (Durchmesser 19 mm) erreichen die geringsten systolischen Druck. Die NiTi-Klappe mit 10 µm dicken Segeln erreicht den gleichen Druck wie die Carpentier-Edwards-S.A.V. Schweineklappe. Mit zunehmender Schichtdicke wird der Öffnungsdruck größer und die maximale systolische Druckdifferenz nimmt zu. Die 15 µm Klappe mit Koaptationsfläche hat die größte systolische Druckdifferenz.<sup>96</sup>

Die systolische Druckdifferenz ist stark von der Öffnungsfläche abhängig und damit ein Indikator für die Beweglichkeit und den hydrodynamischen Widerstand der Klappe. Eine geringere Druckdifferenz wird einer größeren Öffnungsfläche, besserer Beweglichkeit der Segel sowie einer geringeren Herzarbeit zugeordnet. Während der Messung variiert der supralvalvuläre Druck kaum (Abbildung 33). Während der Systole, also der Auswurfphase mit einer geöffneten Klappe, ist der subvalvuläre Druck größer als der Druck hinter der Klappe und es ergibt sich eine transvalvuläre Druckdifferenz  $> 0$  mmHg. Die Messungen in Abbildung 34 zeigen die kleinste systolische transvalvuläre Druckdifferenz für NiTi-Klappen mit einer Schichtdicke von 10 µm ( $5,4 \pm 1,0$  bis  $15,1 \pm 1,7$  mmHg). Die NiTi 10 µm Klappe erreicht damit vergleichbare Werte wie Edwards S.A.V (4,0 bis 15,4 mmHg). Mit steigender Filmschichtdicke werden auch die systolischen Druckdifferenzen größer. Mit 15 µm Dicke liegen die Werte im Bereich von  $9,4 \pm 1,3$  bis  $18,8 \pm 1,1$  mmHg, für 20 µm liegen sie noch höher bei  $15,8 \pm 1,1$  bis  $24,9 \pm 3,1$  mmHg. Die Klappen mit der Koaptationsfläche der Segel weisen die höchsten maximalen systolischen transvalvulären

Druckdifferenzen auf  $(14,8 \pm 1,1$  bis  $29,2 \pm 1,8$  mmHg). Keine der NiTi-Klappen erreicht den sehr geringen systolischen Öffnungsdruck der Edwards Lifesciences Perimount Magna ( $1,7 - 4,4$  mmHg). Die systolische transvalvuläre Druckdifferenz ist eng mit der absoluten Größe der Öffnungsfläche verbunden. Eine kleinere Druckdifferenz weist auf eine größere Öffnungsfläche hin. Durch den größeren Klappendurchmesser der biologischen Referenzklappen, insbesondere der Perimount Magna, und der damit verbundenen größeren maximal erreichbaren Öffnungsfläche, sind die Druckdifferenzen viel kleiner, die Werte somit schwer vergleichbar.

### 4.1.3 Öffnungsfläche und Performance Index

Zusätzlich zu den Druckdifferenzen wird während der pulsatilen Messung die Bewegung der Klappen mit einer Kamera aufgenommen. Aus den Sequenzen kann die Öffnungsfläche der Klappen bestimmt werden. Die Größe der Öffnungsfläche ist hierbei eng mit dem systolischen Druck verknüpft. Zur Auswertung wird der Performance Index (PI) bestimmt, der aus dem Verhältnis von maximaler Öffnungsfläche zu Querschnittsfläche der Klappe bestimmt wird. Der größte PI von  $51,6 \pm 5,8$  bis  $65,1 \pm 7,5\%$  wurde für die  $10 \mu\text{m}$  NiTi-Klappe gemessen (Abbildung 35). Darauf folgt die  $15 \mu\text{m}$  NiTi-Klappe ( $34,3 \pm 5,4$  bis  $51,5 \pm 5,8\%$ ), Edwards Perimount Magna und Carpentier-Edwards-S.A.V. ( $34,9 - 46,8\%$  und  $40,9 - 46,4\%$ ). Die  $20 \mu\text{m}$  NiTi-Klappe ( $15,1 \pm 2$  bis  $40,8 \pm 4,6\%$ ) weist gerade bei geringen Herzminutenvolumen von  $3,1$  l/min einen kleinen PI auf. Die kleinsten Werte wurden für die  $15 \mu\text{m}$  NiTi-Klappe mit Koaptationsfläche bestimmt ( $9,4 \pm 1,8$  bis  $32,6 \pm 1\%$ ). Die gemittelten Werte für die effektive Öffnungsfläche über ein Herzminutenvolumen von  $3,1$  bis  $6,1$  l/min sind in der Tabelle 8 zusammengefasst. Die ISO 5840 gibt eine minimale effektive Öffnungsfläche für Herzklappenprothesen von  $0,7 \text{ cm}^2$  für einen Durchmesser von  $19 \text{ mm}$  und  $1,2 \text{ cm}^2$  für einen Klappendurchmesser von  $25 \text{ mm}$  bei einem Herzminutenvolumen von  $5 \text{ l/min}$ .<sup>97</sup> Die von Marquez et al. bestimmten Werte für die gleichen Modelle Carpentier-Edwards-S.A.V., sowie Perimount Magna betragen  $1,06 \text{ cm}^2$  und  $1,76 \text{ cm}^2$ <sup>98</sup>.

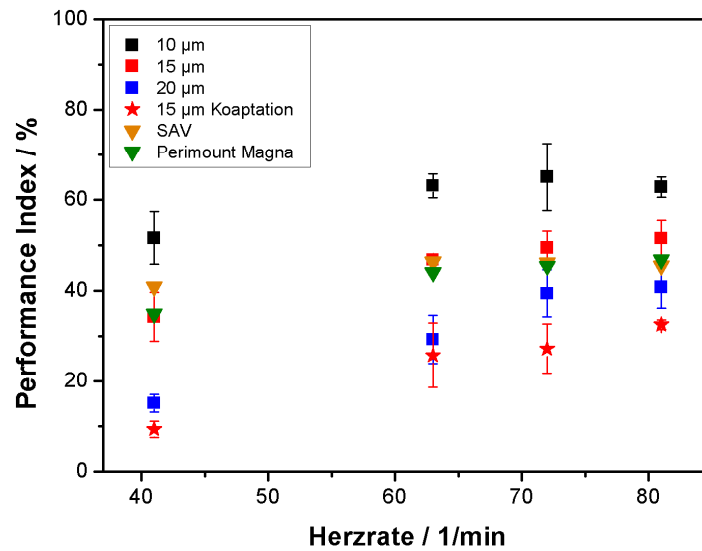


Abbildung 35: Performance Index für die NiTi-Klappen mit unterschiedlichen Schichtdicken sowie mit und ohne Koaptationsfläche. 10 µm hat den größten Performance Index gefolgt von der 15 µm Klappe und den biologischen Referenzen Perimount Magna und Carpentier-Edwards-S.A.V.<sup>96</sup>

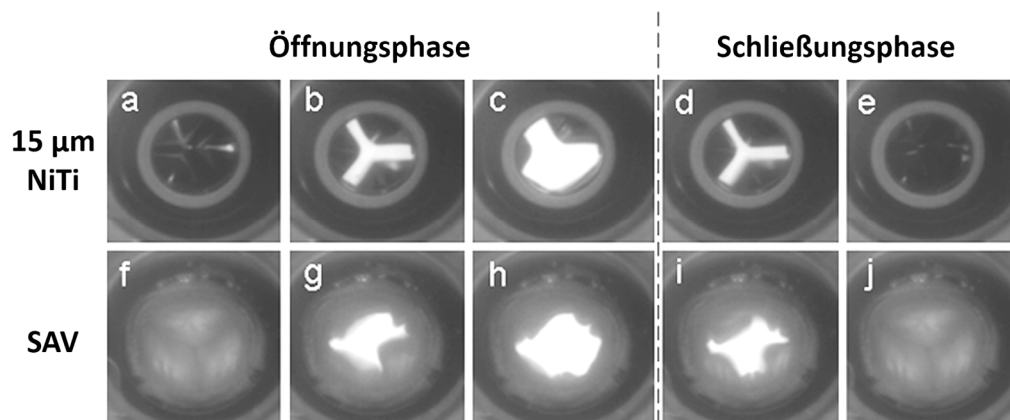


Abbildung 36: Öffnungs- und Schließungssequenz während eines Zyklus für eine 15 µm NiTi-Klappe ohne Koaptationsfläche (a-e) sowie zum Vergleich die Sequenz für die Carpentier-Edwards-S.A.V. Schweineklappe (f-j) bei einer Herzrate von 72 Schlägen/min und einem Herzminutenvolumen von 5,4 l/min.<sup>96</sup>

	10 µm	15 µm	20 µm	15 µm Koap	SAV	Perimount
Durchmesser (mm)	14	14	14	14	19	25
$\Delta p_s$ (mmHg)	10,7 ± 4,1	14,6 ± 4,1	20,1 ± 3,8	23,5 ± 6,7	10,4 ± 4,9	3,4 ± 1,2
PI (%)	60,6 ± 6,1	45,5 ± 7,7	31,1 ± 11,9	23,7 ± 10,0	44,7 ± 2,6	42,8 ± 5,4
EÖF (cm <sup>2</sup> )	0,93 ± 0,09	0,70 ± 0,11	0,48 ± 0,18	0,36 ± 0,15	1,27 ± 0,07	1,78 ± 0,22
EÖF Marquez et al (cm <sup>2</sup> ) <sup>98</sup>					1,06	1,76

Tabelle 8: Gemittelte Werte des systolischen transvalvulären Drucks, des PI und der effektiven Öffnungsfläche über ein Herzminutenvolumen von 3,1 -6,2 l/min für die getesteten Klappen. Als Vergleichswerte wurden bestimmt von Marquez et al.<sup>96</sup>

Zusammen geben die systolische Druckdifferenz und die eng mit dieser Differenz in Verbindung stehende Öffnungsfläche Aufschluss über den hydrodynamischen Widerstand der Segel im vorwärts gerichteten Fluss. Weiterhin wurde die Beweglichkeit der Flügel analysiert. Die Ergebnisse zeigen einen geringeren Performance Index für dickere Filmstärken. Die 10 µm und die 15 µm NiTi-Dünnschicht-Segel zeigen die beste Effizienz der NiTi-Klappen verglichen mit den biologischen Referenzklappen. Dies äußert sich durch geringen systolischen Druck, sowie eine große Öffnungsfläche. Die Bildsequenz (Abbildung 36) zeigt das Öffnen und Schließen von 15 µm NiTi-Segeln bei einer Herzrate von 72 Schlägen/min und einem Herzminutenvolumen von 5,4 l/min. Bei der maximal geöffneten Klappe ist zu sehen, dass die drei Flügel zu einem unterschiedlichen Grad öffnen und daher keine besonders gute Segel-Komplianz (Übereinstimmung) der Segel gegeben ist (im Vergleich zur biologischen S.A.V.-Klappe). Die Gorlin Formel gibt eine Relation zwischen effektiver Öffnungsfläche und dem Herzminutenvolumen (HMV), Herzrate (HR), systolische Ausstoßphase (SAP) und der systolische Druckdifferenz ( $\Delta p_s$ ) an <sup>99</sup>:

$$EÖF(cm^2) = \frac{HMV(\frac{ml}{min})}{HR(\frac{1}{min}) \times SAP(s) \times 44,3 \times \sqrt{\Delta ps(mmHg)}}$$

Laut Gorlins Formel ist die EÖF proportional zu  $\frac{1}{\sqrt{\Delta ps}}$ . Die Perimount Magna hat aufgrund ihres Durchmessers von 25 mm die größte mögliche Öffnungsfläche von 4,15 cm<sup>2</sup>. Die mögliche Öffnungsfläche der Carpentier-Edwards-S.A.V. mit einem Durchmesser von 19 mm berechnet sich zu 2,84 cm<sup>2</sup>. Die NiTi-Klappen mit einem Durchmesser von 14 mm haben hingegen nur eine maximale Öffnungsfläche von 1,54 cm<sup>2</sup>. Die kleinste verfügbare Referenzklappe war die S.A.V. mit einem Durchmesser von 19 mm. Bei den gleichen hydrodynamischen Testparametern für Herzminutenvolumen, Herzrate und Dauer der systolischen Auswurfphase kann der Einfluss der Klappengröße auf den systolischen Druck mit der einfachen Relation

$$\frac{\Delta p_1}{\Delta p_2} = \frac{EÖF_2^2}{EÖF_1^2}$$

abgeschätzt werden. Mit dieser Beziehung und durch den Größenunterschied der Klappen – insofern von einem gleichen PI ausgegangen wird - entspricht die systolische Druckdifferenz von der Perimount Magna nur 15 % und die der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe 30 % der systolischen Druckdifferenz der NiTi-Klappe mit dem geringeren Durchmesser. Da die gesamte effektive Öffnungsfläche in Relation zur systolischen Druckdifferenz steht, kann davon ausgegangen werden, dass die geringe gemessene

systolische Druckdifferenz der biologischen Klappen auf den größeren Klappendurchmesser und nicht auf einer Material- oder designabhängigen Eigenschaft beruht. Vor diesem Hintergrund weisen die 10  $\mu\text{m}$  und 15  $\mu\text{m}$  NiTi-Segel gute Eigenschaften hinsichtlich der systolischen Druckdifferenz und der Öffnungsfläche auf.

#### 4.1.4 Diastolische Druckdifferenz

In der diastolischen Phase erzeugt der Kolben vor der Klappe einen Unterdruck, die Klappe ist geschlossen, in dem Volumen zwischen der Klappe und dem Kolben kann kein Wasser nachfließen. Je größer der erzeugte Unterdruck ist, desto weniger Medium fließt in das Volumen vor der Klappe. Eine größere absolute Druckdifferenz ist also auf ein besseres Schließverhalten, ein geringeres Rückflussvolumen und damit eine bessere Suffizienz der Klappe zurückzuführen.

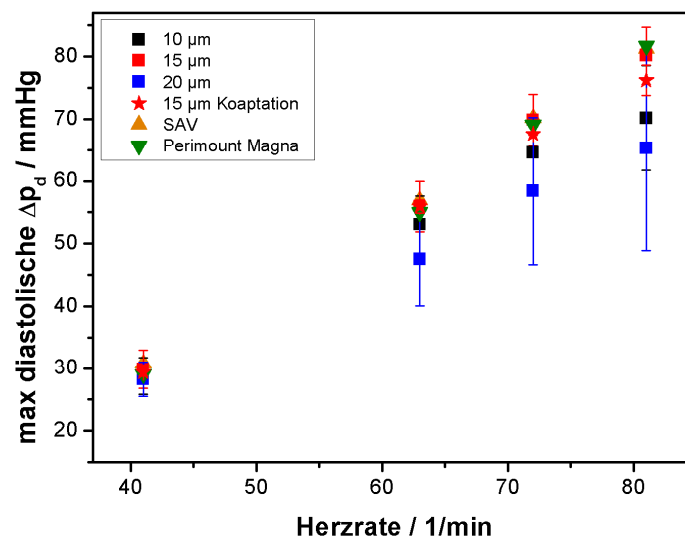


Abbildung 37: Maximale diastolische transvalvuläre Druckdifferenzen.<sup>96</sup>

Die größten diastolischen transvalvulären Druckdifferenzen (Abbildung 37) erreichen die 15  $\mu\text{m}$  NiTi-Segel zusammen mit den biologischen Referenzklappen  $29,9 \pm 3 - 80,2 \pm 4,6$  mmHg (Perimount Magna:  $29 - 81,7$  mmHg und Carpentier-Edwards-S.A.V.:  $30,8 - 81,2$  mmHg). Die 15  $\mu\text{m}$  Klappe mit der Koaptationsfläche wurde mit einer etwas geringeren Druckdifferenz charakterisiert ( $29,4 - 76,2$  mmHg). Die 10  $\mu\text{m}$  NiTi-Segel erreichen eine maximale transvalvuläre Druckdifferenz von  $28,8 \pm 3 - 70,2 \pm 8,4$  mmHg. 20  $\mu\text{m}$  Segel weisen gerade bei höherem Herzminutenvolumen die geringste maximale diastolische

transvalvuläre Druckdifferenz auf, mit Werten von  $28,3 \pm 2,8 - 65,3 \pm 16,4$  mmHg. Die normale physiologische diastolische Druckdifferenz im Menschen beträgt im Ruhezustand etwa 80 mmHg.

#### 4.1.5 Statisches Rückflussvolumen

Eine weitere Methode für die quantitative Untersuchung der Suffizienz der Klappen ist die Messung des Rückflussvolumens unter einem bestimmten statischen Druck. In dieser Messung wurden bei unterschiedlichen Drücken von 5,2 kPa, 10 kPa und 15 kPa die Rückflussvolumen durch die geschlossene Klappe bestimmt (Abbildung 38).

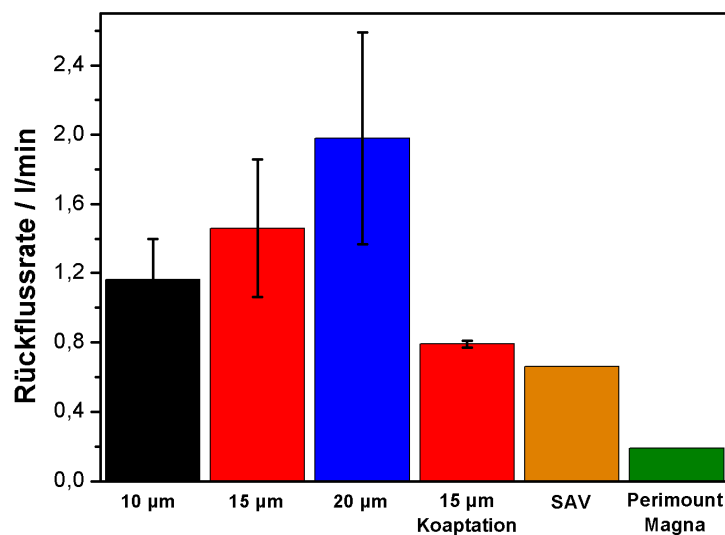


Abbildung 38: Rückflussrate durch die geschlossene Klappe unter einem Druck von 10 kPa (75 mmHg).<sup>96</sup>

Hierbei ist eine Vergrößerung des Rückflussvolumens mit steigender NiTi-Filmstärke von 10 zu 20 µm zu beobachten. Unter einer Wassersäule mit einem Druck von 10 kPa steigt das Rückflussvolumen von  $1,16 \pm 0,24$  l/min für 10 µm NiTi-Segel und  $1,46 \pm 0,4$  l/min für 15 µm NiTi-Segel auf  $1,98 \pm 0,61$  l/min für 20 µm NiTi-Segel an. Bei dieser Messung zeigt die Koaptationsfläche zwischen zwei benachbarten Segeln eine Verbesserung der Klappeneigenschaft. Die Klappe mit 15 µm Filmstärke und Koaptationsfläche hat mit  $0,79 \pm 0,02$  l/min das geringste gemessene Rückflussvolumen der NiTi-Klappen. Diese Klappe erreicht vergleichbare Werte wie die Carpentier-Edwards-S.A.V. mit 0,66 l/min. Die Perimount Magna mit Segeln aus bovinem Perikard erreicht das geringste



Rückflussvolumen mit 0,19 l/min. Weitere Werte für einen Druck von 5,2 kPa und 15 kPa sind in der Tabelle 9 dargestellt.

	10µm	15 µm	20 µm	15 µm Koap	SAV	Perimount
<b>RV / l/min (5,2 kPa)</b>	0,84 ± 0,17	1,11 ± 0,30	1,85 ± 0,91	0,63 ± 0,06	0,37 ± 0,02	0,11 ± 0,01
<b>RV / l/min (10 kPa)</b>	1,16 ± 0,24	1,46 ± 0,40	1,98 ± 0,61	0,79 ± 0,02	0,61 ± 0,02	0,17 ± 0,01
<b>RV / l/min (15 kPa)</b>	1,56 ± 0,45	1,79 ± 0,47	2,25 ± 0,66	1,06 ± 0,09	0,88 ± 0,03	0,22 ± 0,01

*Tabelle 9: Rückflussvolumen (RV) der geschlossenen Klappe unter einem Druck von 5,2 kPa bis 15 kPa. Mit größer werdender Filmstärke steigt die Steifigkeit der Segel. Dadurch schließen die Segel im statischen Zustand schlechter und das Rückflussvolumen nimmt zu. Die Koaptationsfläche verringert das Rückflussvolumen und es beträgt in etwa nur noch 57 % im Vergleich mit der 15 µm NiTi-Klappe ohne Koaptationsfläche.*

Zusammen mit der diastolischen Druckdifferenz ist die Rückflussmessung eine Methode um die Suffizienz der Klappensegel zu analysieren. Eine suffiziente Klappe hält während der Diastole eine hohe Druckdifferenz aufrecht. Valvuläre sowie paravalvuläre Leckage mindert die Druckdifferenz. Die Rückflussmessungen zeigen eine Zunahme des Rückflussvolumens mit zunehmender Filmstärke. Eine Änderung des Designs mit einer Koaptationsfläche verringert das Rückflussvolumen der 15 µm NiTi-Segel im statischen Zustand auf 57% und erreicht vergleichbare Werte wie die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe. In den pulsatilen Messungen zeigt die 15 µm Klappe ohne Koaptationsfläche die höchsten Druckdifferenzen und damit die beste Suffizienz. Insgesamt zeigt das Design mit Koaptation unter Bewegung in pulsatiler Messung jedoch ein größeres Rückflussvolumen als die Klappe ohne Koaptation. Dies wird vermutlich durch eine designspezifische schlechtere Beweglichkeit der Segel verursacht, die auch in der Öffnung der Segel mit Koaptation deutlich wird (kleinste Öffnungsfläche und höhere systolische Druckdifferenzen).

Die NiTi-Klappensegel mit 20 µm Filmstärke weisen in allen Messungen unzureichende Eigenschaften auf. Das hohe Rückflussvolumen und der geringe diastolische Druck deuten auf schlechte Schließeeigenschaften der Klappe hin. Zusätzlich wurden bei diesen Segeln eine kleinere Öffnungsfläche sowie ein höherer systolischer Druck im Vergleich zu den 10 µm und 15 µm NiTi-Klappensegeln gemessen. Laut dieser ersten durchgeführten Tests zeigen die NiTi-Klappensegel mit 10 µm und 15 µm Filmstärke gerade bei einer Herzrate von 72 Schlägen/min und einem Herzminutenvolumen von 5,4 l/min, was in etwa den physiologischen Bedingungen entspricht, verglichen mit den biologischen Referenzklappen gute Eigenschaften. Die ersten Tests deuten auf die Verwendbarkeit von NiTi-Dünnschicht-Klappensegeln im Bereich des kardiovaskulären Klappenersatz hin.

## 4.2 NiTi-Herzklappen mit 20 mm Durchmesser

### 4.2.1 Segeldesign und mechanische Eigenschaften

Die Herstellung der NiTi-Dünnschichtsegel mit 20 mm Durchmesser erfolgte mit einer Oerlikon Balzers-Sputteranlage. Da die in Kapitel 4.1 getesteten Segel mit 10  $\mu\text{m}$  und 15  $\mu\text{m}$  Schichtdicke die besten Ergebnisse erzielt haben, wurden die Dünnschichten für diese Versuche ebenfalls mit 10  $\mu\text{m}$  und mit 15  $\mu\text{m}$  Schichtdicke hergestellt. Die Stöchiometrie des gesputterten NiTi-Films auf dem gesamten Substrat ist in Abbildung 39 dargestellt. Die Filme sind Ni reich mit einem Ni-Anteil von 50,5 %  $\pm$  0,4 %.

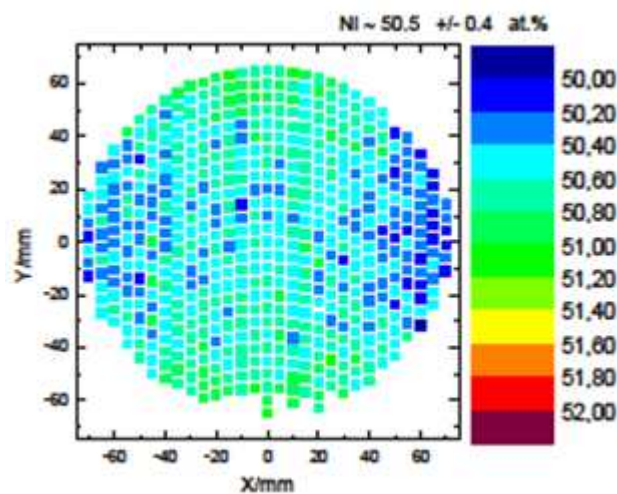


Abbildung 39: Ni-Anteil der gesputterten Dünnschicht auf dem gesamten Substrat (EDX Aufnahme von Dr. Christiane Zamponi), hergestellt mit der Oerlikon Balzers-Anlage.

Die Fertigung und Strukturierung der freitragenden NiTi-Dünnschichten folgt den Schritten beschrieben in Kapitel 2.3 und insbesondere in Abbildung 22.

Die dreisegeligen Klappen wurden für einen Klappendurchmesser von 20 mm entworfen. Die Geometrie der Klappe spielt eine wichtige Rolle für die Spannungsverteilung und die Dynamik der Klappensegel. Zusätzlich beeinflusst die Geometrie die Effizienz der Klappe hinsichtlich Öffnungsfläche und transvalvulären Druckdifferenzen. Damit ist das Design neben der Materialauswahl einer der wichtigen Faktoren, der die Leistung und die Haltbarkeit von Herzklappenprothesen bestimmt.<sup>100</sup>

Um den Einfluss der Geometrie der Klappensegel zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Designs entwickelt. Die 2D-Designs der Lithographiemaske für die entwickelten Designs sind in der Abbildung 40 dargestellt. Die Höhe unterscheidet sich, so dass die Segelhöhe der 3D-geformten Klappe 14 mm und die des zweiten Designs 18 mm

beträgt. Die Benennung des Designs der Klappen wird im weiteren Verlauf der Arbeit mit  $D(\text{Durchmesser})XX(\text{Durchmesser in mm})H(\text{Höhe})YY(\text{Höhe in mm})$  und zusätzlich der Schichtdicke angegeben.

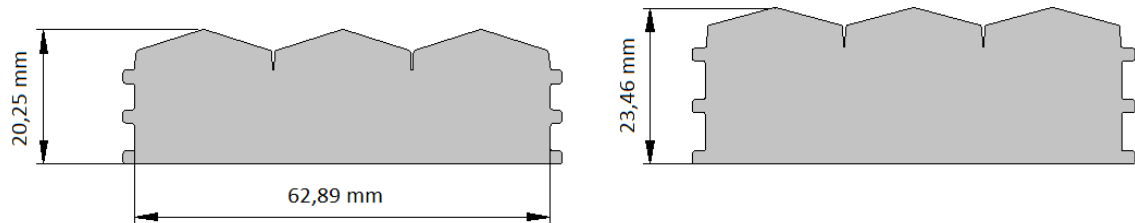


Abbildung 40: 2D-Design für den Lithographieprozess: a) Modell D20H14 und b) Modell D20H18.

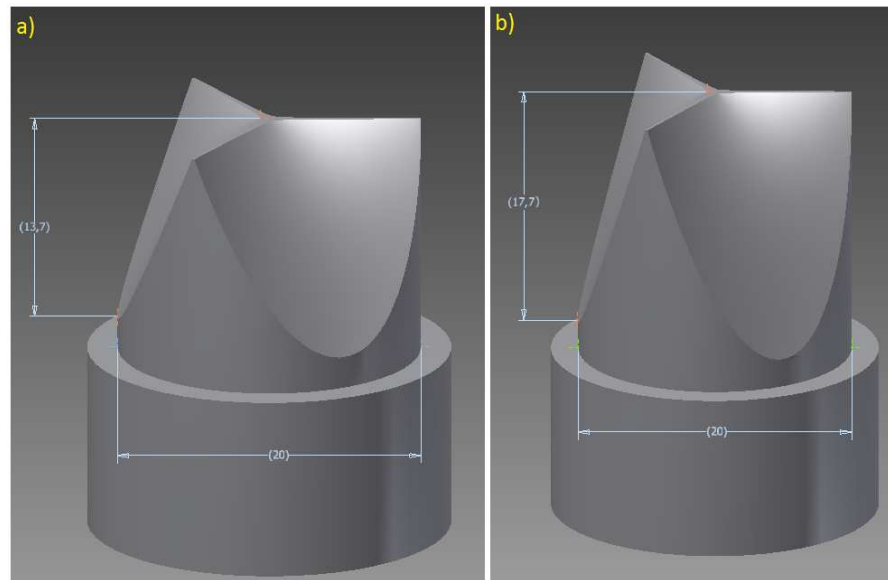


Abbildung 41: 3D-Modell der Edelstahl Formwerkzeug: a) Form der D20H14 Klappensegel mit einer Höhe von 13,7 mm und einem Durchmesser von 20 mm, b) Form zur Herstellung der D20H18 Klappensegel (Höhe 17,7 mm und Durchmesser 20 mm).

Um die freitragenden planaren NiTi-Dünnschichten in eine 3D-Herzklappenform zu bringen, wurden zwei spezielle Formen, welche die gewünschte Herzklappenform wiedergeben, entwickelt. Diese Formen wurden in der zentralen Werkstatt des Physikzentrums der Universität zu Kiel aus Edelstahl gefertigt. Die gesputterten freitragenden NiTi-Segelstrukturen sind amorph und wurden in dieser Form während eines Erhitzungsprozesses kristallisiert. Sie erhalten so ihre gewünschte 3D-Klappenform (Abbildung 41). Unterschiedliche Temperaturverläufe während des Erhitzens führen hierbei zu unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften des Materials.

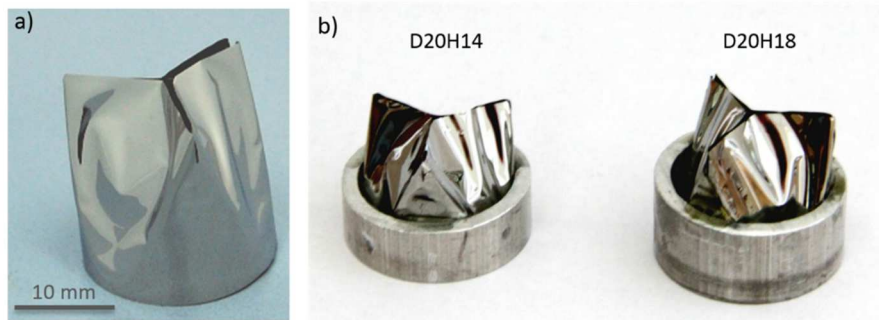


Abbildung 42: a) 3D-geformte und kristallisierte NiTi-Dünnschicht Herzklappensegel (D20H18), b) D20H14 und D20H18 NiTi-Klappensegel fixiert in einem Metallring als Halterung für hydrodynamische Tests.

In der RTA kristallisiertes Material zeigte gute mechanische Eigenschaften bei einem Temperaturverlauf von 650°C für 5 Minuten und 500°C für 20 Minuten. Die Probe hat eine  $A_f$  Temperatur von 9,9°C, zeigt Superelastizität bei 37°C und bei Raumtemperatur und erreicht eine maximale Dehnung von 13 % (37°C) sowie 15% (Raumtemperatur) (Abbildung 43).

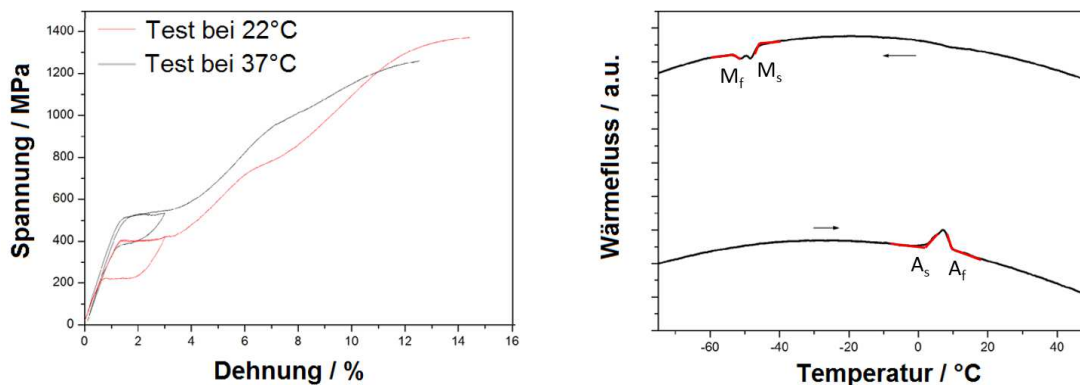


Abbildung 43: Erhitzen in der RTA bei 650°C für 5 min und 500°C 20 min.  $A_f$ -Temperaturen von 9,9°C.

Die unterschiedlichen Temperaturverläufe, die für den Erhitzungsprozess in der Form gewählt wurden, waren 780°C/20min und 500°C/20min sowie 830°C/20min und 500°C/20min. Die Einstellungen geben die am Ofen eingestellte Temperatur wieder. Die zu erhitzende Probe befindet sich in der Edelstahlform in einem Glasrohr. In dem Glasrohr herrscht ein Druck unter unterhalb  $5 \times 10^{-6}$  mbar vor. Die Temperaturverläufe während des Erhitzens an der Oberfläche der Edelstahlform, gemessen mit Temperaturfühler 2 (Abbildung 23), sind in der Abbildung 44 dargestellt. Die Temperatur des Ofens wird zu Anfang auf 830°C (bzw. 780°C) eingestellt. Die Temperatur an der Oberfläche der Edelstahlform steigt an bis sie ihren maximalen Wert von 805°C (765°C) erreicht. Diese Temperatur wird für etwa 5 min konstant gehalten. Anschließend wird der Ofen entfernt,

um die Probe auf 500°C abzukühlen. Die Temperatur von 500°C wird für 20 min konstant gehalten.

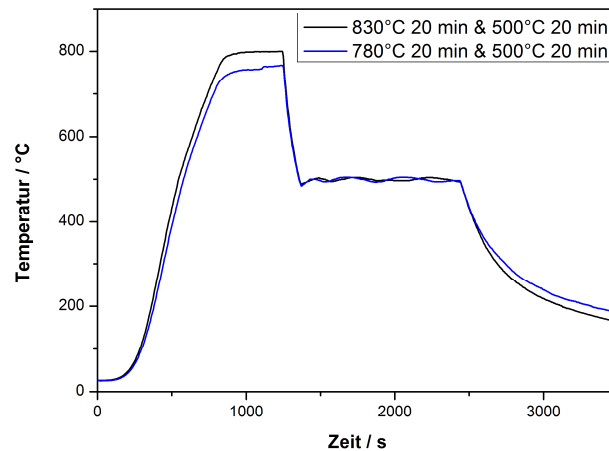


Abbildung 44: Temperaturverläufe, gemessen an der Oberfläche der Edelstahlform während des Erhitzens.

Die Eigenschaften eines Films, der bei 780°C/20min&500°C/20min erhitzt wurde, sind in Abbildung 45 dargestellt. Die  $A_f$ -Temperaturen betragen 18,9°C und 20,6°C, die Probe ist bei 37°C und bei Raumtemperatur superelastisch und erreicht eine maximale Bruchdehnung von 13 % (37°C) und 14 % (Raumtemperatur).

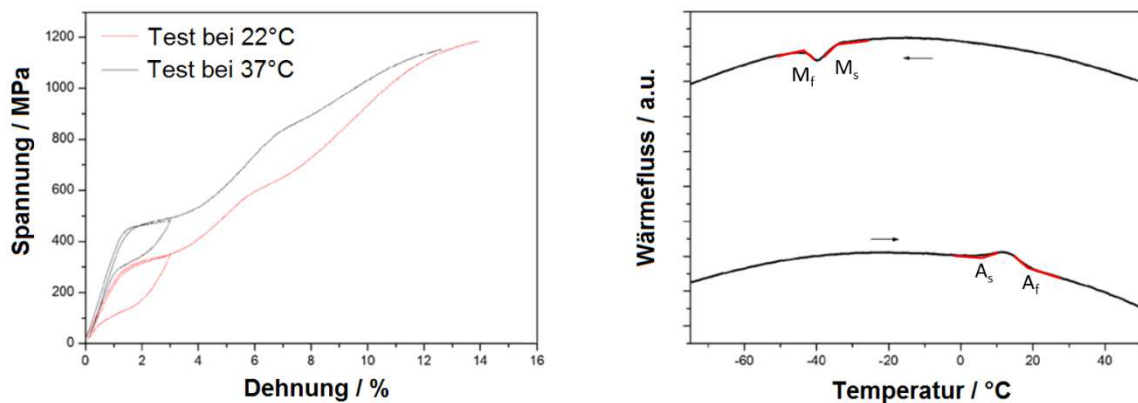


Abbildung 45: Zugkurven. Die Proben wurden bei 780°C 20 min und 500°C 20 min erhitzt. Die  $A_f$ -Temperaturen liegen bei 18,9°C und 20,6°C. Bei einer Testtemperatur von 37°C zeigt das Material superelastisches Verhalten.

Die mechanischen Eigenschaften des Materials, erhitzt unter der Einstellung von 830°C/20min&500°C/20min, ist in der Abbildung 46 dargestellt. Die gemessenen  $A_f$ -Temperaturen der Proben betragen 14,3°C und 16,8°C. Beide Proben zeigen bei einer Umgebungstemperatur von 37°C sowie bei Raumtemperatur ausgeprägte Superelastizität bei einer Bruchdehnung von 12 % (37°C) und 14 % (Raumtemperatur).

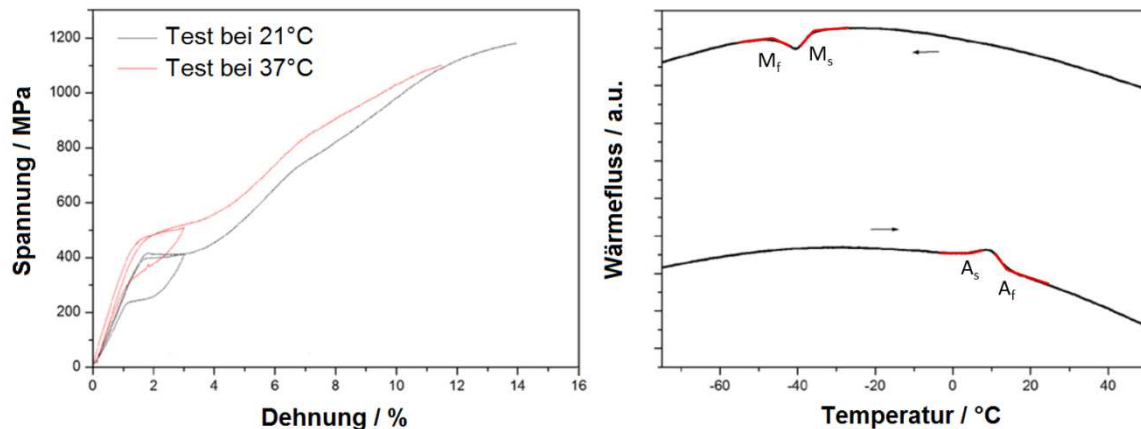


Abbildung 46: Erhitzen der Proben mit 830°C 20 min und 500°C 20 min. Bei 37°C und Raumtemperatur superelastisches Verhalten. Af Temperatur von 14,3°C und 16,8°C.

Die XRD-Messungen in der Abbildung 47 zeigt das Material bei Raumtemperatur in der Austenit-Phase ohne Ausscheidungen.

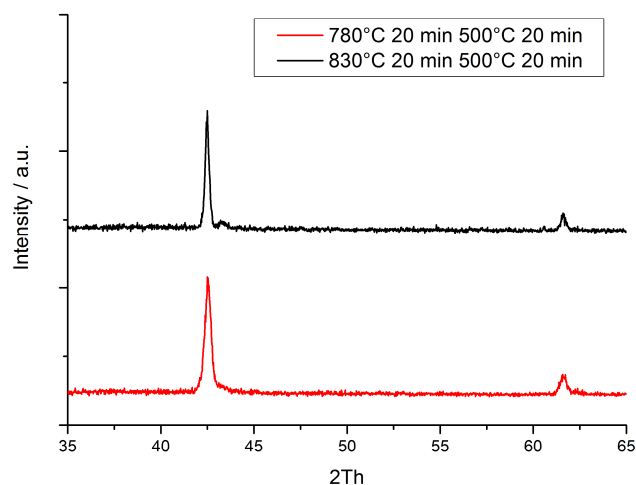


Abbildung 47: XRD Messung von dem NiTi-Material nach der Erhitzung in der Herzklappenform. Die 2θ-peaks zeigen den (110)-Peak bei 42,4° und den (200)-Peak bei 61,6° für kubisches NiTi.

Um Superelastizität bei Raumtemperatur und damit der Umgebungstemperatur der Proben bei hydrodynamischen Tests zu gewährleisten, wurde für den Erhitzungsprozess der zu testenden Klappensegel eine Temperatureinstellung mit 830°C/20min und 500°C/20min gewählt. 780°C/20min und 500°C/20min ist ein geeigneter Erhitzungsprozess für Proben, die bei Körpertemperatur superelastisch sein sollen.

#### 4.2.2 Systolische Druckdifferenz

Die hydrodynamische *in vitro* Charakterisierung der NiTi-Dünnschicht-Klappensegel erfolgte mit einem pulsatilem Herzklappentester (Kapitel 3.4.2). Aus den Videoaufnahmen und den gemessenen Druckdifferenzen und in Vergleich mit etablierten biologischen Klappenprothesen, kann so die Funktionalität der Herzklappensegel charakterisiert und beschrieben werden. Aus den Druckmessungen kann die mittlere transvalvuläre Druckdifferenz während der Auswurfphase, der Systole, und während der geschlossenen Phase, der Diastole, bestimmt werden. In der Abbildung 48 ist zu erkennen, dass während der Systole der subvalvuläre Druck höher ist als der supra-valvuläre Druck. Es ergibt sich eine positive Druckdifferenz. Die Größe dieser Druckdifferenz steht in enger Beziehung mit der Größe der Öffnungsfläche und der Flexibilität der Segel. Eine kleine Druckdifferenz bedeutet eine große Öffnungsfläche und damit einen kleinen hydrodynamischen Widerstand der Klappe. Die Funktion der Klappe erreicht einen größeren Volumenauswurf bei geringerer Herzarbeit.

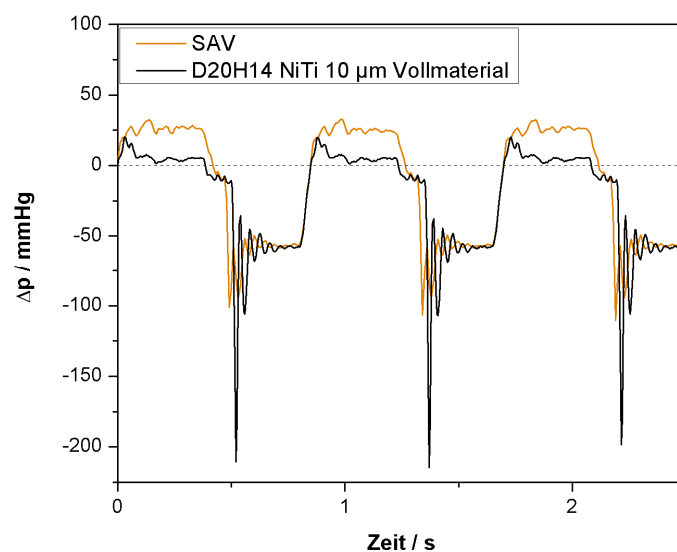


Abbildung 48: Transvalvuläre Druckdifferenz einer D20H14 NiTi-Klappe und zum Vergleich (orange) einer Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe. Druckdifferenzen  $> 0$  werden der systolischen Phase mit offener Klappe zugeordnet, Druckdifferenzen  $< 0$  der diastolischen Phase.

Die diastolische Druckdifferenz bezieht sich auf die Schließeeigenschaften der Klappensegel. Bei größeren absoluten Werten der diastolischen Druckdifferenz sind das valvuläre und das paravalvuläre Rückflussvolumen geringer.

Die negativen Spitzen im Druckverlauf während des Beginns der Diastole beruhen auf einem Messartefakt. Kurzzeitig nach dem Schließen der Klappe wird ein sehr starker Unterdruck vor der Klappe erzeugt, bis das Kugelventil der Rücklaufstrecke öffnet.

Die mittleren systolischen transvalvulären Druckdifferenzen sind in Abbildung 49 in Abhängigkeit von der simulierten Herzrate aufgetragen. Die Werte für alle NiTi-Klappensegel sind deutlich geringer, als die Werte der biologischen Referenzklappe Carpentier-Edwards-S.A.V. D20H14 und D20H18 mit einer Segeldicke von 10  $\mu\text{m}$  erreichen die geringsten systolischen Druckdifferenzen ( $3,0 \pm 0,1 \text{ mmHg}$  –  $5,5 \pm 0,5 \text{ mmHg}$ ). Die Druckdifferenz für die D20H14 Segel in 15  $\mu\text{m}$  liegt etwas höher bei  $5,3 \pm 0,5 \text{ mmHg}$  bis  $7,6 \pm 0,5 \text{ mmHg}$ . Durch die Änderung des Designs mit einer Segelhöhe von 18 mm erhöht sich die systolische transvalvuläre Druckdifferenz für die D20H18 Klappensegel mit 15  $\mu\text{m}$  Filmstärke bei  $6,1 \pm 1,2 \text{ mmHg}$  bis  $8,6 \pm 1,2 \text{ mmHg}$  leicht. Die Werte für die biologische Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe liegen viel höher bei  $9,5 \pm 0,2 \text{ mmHg}$  bis  $25,5 \pm 0,8 \text{ mmHg}$ . Zudem nimmt die systolische Druckdifferenz der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe mit zunehmender Herzfrequenz und höherem Herzminutenvolumen stark zu. Die Druckdifferenzen der NiTi-Klappensegel nehmen in dem gemessenen Bereich von 40 – 75 Schlägen/min und einem Schlagvolumen von 70 ml nur leicht zu.

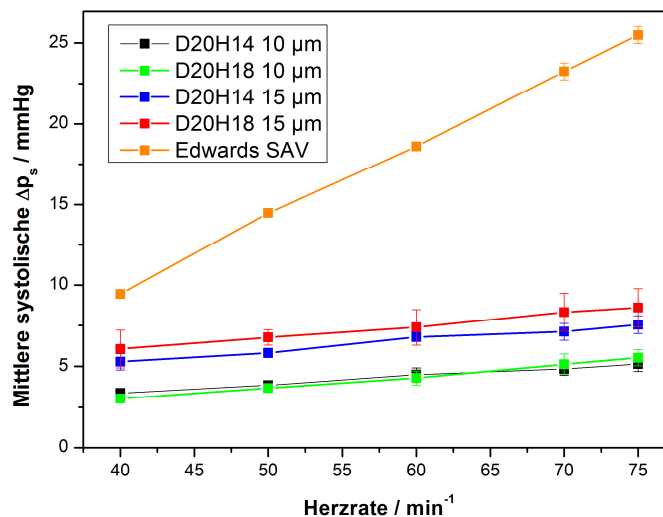


Abbildung 49: Mittlere systolische Druckdifferenz der Vollmaterial-Klappensegel. D20H14 in 10  $\mu\text{m}$  (schwarz), 15  $\mu\text{m}$  (blau) und D20H18 in 10  $\mu\text{m}$  (grün) und 15  $\mu\text{m}$  (rot). Alle NiTi-Klappensegel haben einen deutlich geringeren Öffnungsdruck verglichen mit der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe.



### 4.2.3 Öffnungsfläche und Performance Index

Aus den aufgenommenen Videosequenzen wurde die Öffnungsfläche der NiTi-Klappensegel und der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe ermittelt. Für jede Klappe wurden fünf aufeinanderfolgende Öffnungszyklen betrachtet, die mittleren Werte dieser fünf maximalen Öffnungsflächen berechnet und in Abhängigkeit der Herzrate aufgetragen (Abbildung 50). Der Performance Index der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe bleibt über den gesamten gemessenen Bereich konstant bei 32%. Das bedeutet, die Klappe erreicht schon unter geringem Druck ihre maximale Öffnungsfläche. In dieser Testreihe erreichen die D20H14 NiTi-Klappensegel mit einer Schichtdicke von 10  $\mu\text{m}$  die höchsten Werte für die relative Öffnungsfläche  $42,8 \pm 3 \%$  bis  $59,7 \pm 0,7 \%$ . Die relative Öffnungsfläche der NiTi-Klappensegel mit 15  $\mu\text{m}$  Stärke liegt etwas unterhalb der 10  $\mu\text{m}$  Klappensegel. Insgesamt erreicht das Design D20H14 mit der geringeren Segelhöhe für beide Schichtdicken eine größere Öffnungsfläche als die D20H18 Klappensegel.

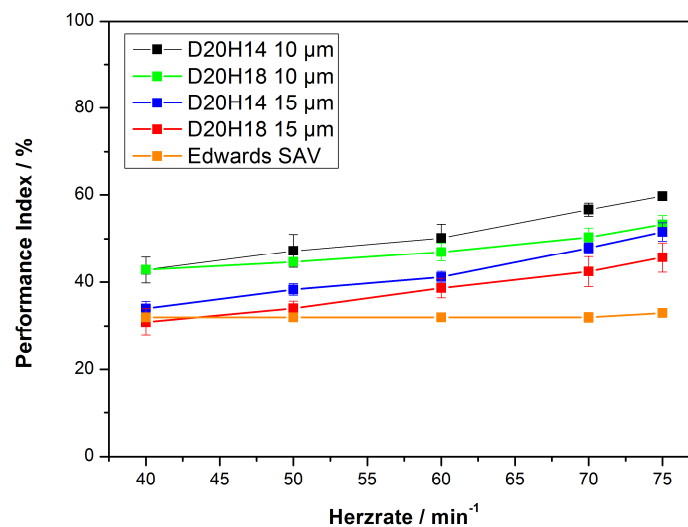


Abbildung 50: Performance Index oder relative Öffnungsfläche der Vollmaterialklappen mit einem Durchmesser von 20 mm. NiTi-Klappensegel haben in dem gemessenen Bereich größere Öffnungsflächen als die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe. Die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe hat über den gemessenen Bereich eine konstante Öffnungsfläche, während für die NiTi-Klappensegel mit steigender Herzrate auch die Öffnungsfläche zunimmt.

Die Druckdifferenz der NiTi-Klappensegel nimmt mit zunehmender Herzfrequenz kaum zu, aber die relative Öffnungsfläche vergrößert sich um etwa 15 %. Die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe erreicht schon bei 40 Schlägen/min ihre maximale Öffnungsfläche. Bei steigender Herzrate öffnet die Klappe nicht weiter als 33 % und die

sysolische Druckdifferenz nimmt bei einer Herzrate im Vergleich von 40 Schlägen/min und 75 Schlägen/min um 16 mmHg zu.

In den Öffnungssequenzen bei  $70 \text{ min}^{-1}$  Herzfrequenz für die verschiedenen Klappen (Abbildung 51) ist zu erkennen, dass die NiTi-Dünnschicht-Klappen zu Beginn der Öffnungsphase gleichmäßig öffnen. Wenn die maximale Öffnungsfläche erreicht wird, öffnen nicht alle drei Segel simultan. Bei allen NiTi-Klappen ist ein Segel komplett geöffnet, und zwei Segel jeweils zu einem unterschiedlichen Grad. Mindestens ein Klappensegel bewegt sich nur minimal.

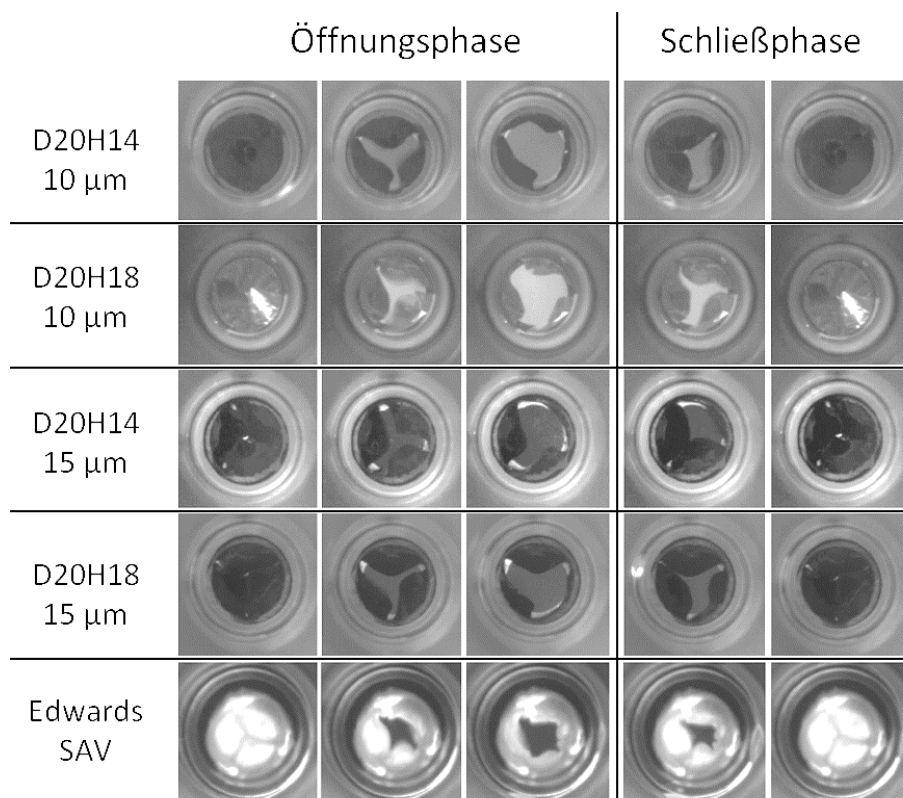


Abbildung 51: Öffnungssequenzen der NiTi-Klappensegel und der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe bei einer Herzrate von  $70 \text{ min}^{-1}$ . Die maximalen Öffnungsflächen der NiTi-Klappensegel sind größer als die der Referenz. Durch die Kommissur benachbarter Segel der biologischen Klappe ist die Öffnungsfläche begrenzt. Besonders bei den NiTi 15  $\mu\text{m}$  Klappensegeln fällt auf, dass die Segel nicht gleichmäßig öffnen und schließen. Außerdem öffnet jeweils eines der drei Segel nur zu einem kleinen Grad.

Während der Schließphase schließen aufgrund der nicht gleichmäßigen Maximalöffnung die zwei zuvor nicht komplett geöffneten Klappensegel zuerst, während das komplett geöffnete Segel kurze Zeit später zuklappt. Dieses Verhalten konnte bei allen Vollmaterial-Dünnschichtklappen beobachtet werden. Dieses Verhalten stellt einen Nachteil für die Langlebigkeit der Klappen dar. Im Idealfall sollten im geschlossenen Zustand die

benachbarten Klappensegel aneinander drücken und sich so gegenseitig stabilisieren. Dadurch wird die Spannung am äußeren befestigten Rand zwischen den Klappen minimiert. In diesem Bereich wirken im Normalfall die höchsten Spannungen und die Klappensegel reißen an dieser Stelle. Bei ungleichmäßiger Schließung ist die Kraft aufgrund der fehlenden Stabilisierung auf die schon geschlossenen Klappensegel höher. Die höhere Belastung auf die einzelnen Segel steigert die Wahrscheinlichkeit für ein Versagen der Klappensegel.

Herzrate Modell	40 min <sup>-1</sup>	50 min <sup>-1</sup>	60 min <sup>-1</sup>	70 min <sup>-1</sup>	75 min <sup>-1</sup>
D20H14 10 µm					
D20H18 10 µm					
D20H14 15 µm					
D20H18 15 µm					
Edwards SAV					

Abbildung 52: Maximale Öffnungsfläche in Abhängigkeit von der Herzrate. NiTi-Klappensegel zeigen gerade bei 15 µm Schichtdicke eine ungleichmäßige Öffnung der Segel. Die gesamte Öffnungsfläche ist für die NiTi-Klappensegel größer als die Öffnungsfläche der Referenzklappe. Die D20H14 in 10 µm Schichtdicke erreicht schon bei geringen Herzraten einen guten Performance Index.

In Abbildung 52 ist die maximale Öffnungsfläche in Abhängigkeit der Herzrate dargestellt. Die D20H14 10 µm zeigt bei 40 min<sup>-1</sup> eine große Öffnungsfläche. Zwei Segel öffnen weit, ein Segel bleibt fast geschlossen. Mit steigendem Herzminutenvolumen wird die Öffnungsfläche größer. Die Öffnungsfläche ist bei 75 min<sup>-1</sup> in etwa 15 % größer als bei 40 min<sup>-1</sup>. Die 15 µm NiTi-Klappensegel weisen eine kleinere maximale Öffnungsfläche auf. Gerade bei geringen Herzraten und dem damit verbundenen geringen Öffnungsdruck bewegt sich nur eines der drei Klappensegel hinreichend. Jeweils zwei Segel bleiben fast geschlossen. Auch hier wird eine Abhängigkeit der Öffnungsfläche von der Herzrate deutlich. Mit steigender Herzrate wird die Öffnungsfläche größer. Die Referenzklappe

erreicht gleich bei  $40 \text{ min}^{-1}$  ihre maximale Öffnungsfläche von 32%. Mit steigender Herzrate bleibt diese Öffnungsfläche konstant.

#### 4.2.4 Diastolische Druckdifferenz

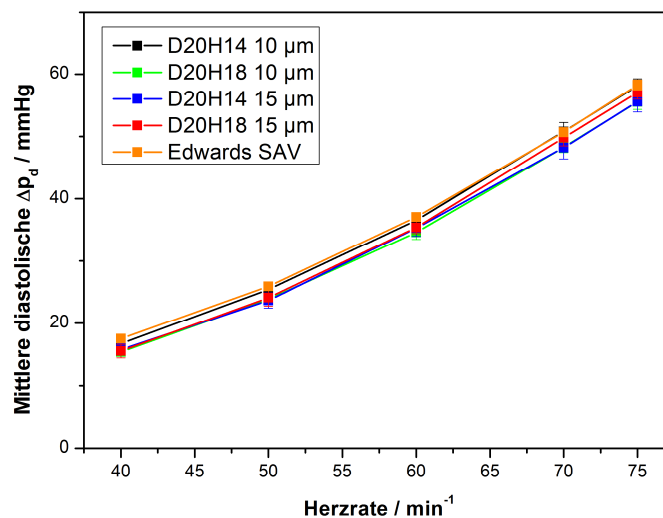


Abbildung 53: Mittlere diastolische Druckdifferenz in Abhängigkeit von der Herzrate in einem Bereich von 40 - 75 1/min. Alle getesteten NiTi-Klappensegel erhalten eine große diastolische Druckdifferenz über die geschlossene Klappe, was auf ein gutes Schließverhalten der Klappensegel zurückzuführen ist.

Die D20 NiTi-Klappensegel zeigen sehr gute Werte in den hydrodynamischen Messungen bezüglich der mittleren transvalvulären diastolischen Druckdifferenz im Vergleich zu der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe (Abbildung 53). Für alle Herzraten variieren die jeweils gemessenen mittleren diastolischen Druckdifferenzen um maximal 3 mmHg. Die D20H14 15  $\mu\text{m}$  zeigt die geringsten Druckdifferenzen, weist jedoch auch nur minimale Abweichungen auf. Die diastolischen Druckdifferenzen liegen zwischen 15,5 mmHg bei einer Herzrate von  $40 \text{ min}^{-1}$  und 58,3 mmHg bei  $75 \text{ min}^{-1}$ . Mit steigender Herzrate steigen die gemessenen diastolischen Druckdifferenzen an. Zusammen mit den Videosequenzen, die ein komplettes Schließen aller NiTi-Dünnschichtsegel zeigen, kann den NiTi-Klappen eine gute Funktionalität hinsichtlich der diastolischen Eigenschaften zugeschrieben werden. Trotz der im vorherigen Kapitel diskutierten ungleichmäßigen Schließbewegung der drei Klappensegel erreichen die Klappen die gleichen mittleren diastolischen Druckdifferenzen wie die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe. Die höchsten Werte und damit das geringste Rückflussvolumen und die besten Schließigenschaften im

hydrodynamischen Test erreichen die D20H14 10  $\mu\text{m}$  und die Carpentier-Edwards S.A.V. Danach folgt die D20H18 15  $\mu\text{m}$  mit geringfügig kleineren diastolischen Druckdifferenzen. Die D20H14 15  $\mu\text{m}$  weist die kleinsten diastolischen Druckdifferenzen auf, die Mittelwerte weichen jedoch nur maximal um 3 mmHg von der Referenzklappe ab.

#### 4.2.5 Dichtigkeit und Rückfluss

Zusätzlich zu den mittleren diastolischen transvalvulären Druckdifferenzen und den Videosequenzen, geben die statischen Rückflussvolumenmessungen weitere Informationen über die Dichtigkeit der Klappen unter einem bestimmten Druck. Hierzu wurden wieder Durchflussraten unter einer Wassersäule mit dem Drücken von 5,2 kPa, 10 kPa und 15 kPa bestimmt (Abbildung 54).

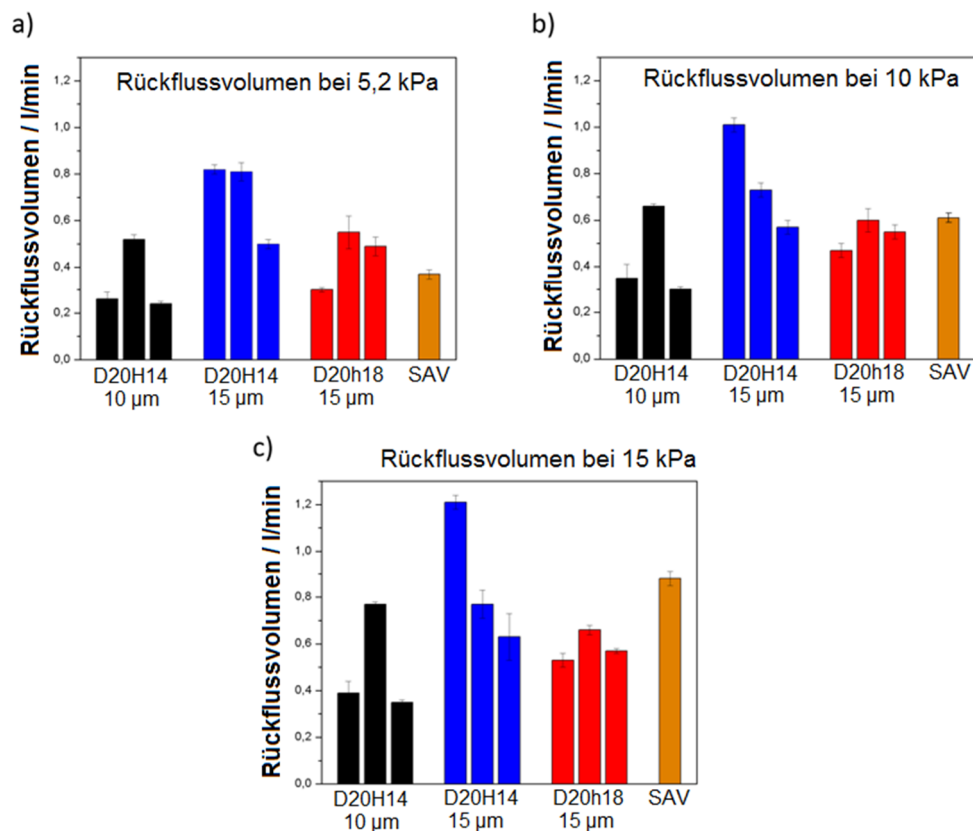


Abbildung 54: Die Mittelwerte und die Standardabweichung der Rückflussvolumina der NiTi-Klappensegel und der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe unter unterschiedlichen statischen Drücken von 5,2 kPa, 10 kPa und 15 kPa (jeweils 3 verschieden Klappen). Das Rückflussvolumen der D20H14 10  $\mu\text{m}$  liegt im Bereich der S.A.V. oder ist kleiner. D20H14 15  $\mu\text{m}$  ist am größten und damit weist die Klappe das größte valvuläre Rückflussvolumen auf. Mit der Designänderung zu 18 mm hohen Segeln nimmt das Rückflussvolumen für die D20H18 Klappe wieder ab. Im Vergleich mit der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe zeigen gerade die 10  $\mu\text{m}$  und die D20H18 15  $\mu\text{m}$  NiTi-Dünnschichtsegel eine sehr gute Dichtigkeit. Liegen die RV bei 5,2 kPa teilweise noch etwas über den Werten der Carpentier-Edwards-S.A.V., weisen sie bei 10 kPa und 15 kPa bessere Werte als die Referenz auf.

Die Durchflussraten sind bei dem kleinsten Druck von 5,2 kPa für die 15 µm Klappen im Schnitt etwas höher als für die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe ( $0,37 \pm 0,02$  l/min). Jeweils zwei der getesteten Klappen haben ein etwas höheres Durchflussvolumen. Bei der D20H14 10 µm Klappensegeln liegt das RV einer Klappe etwas über dem RV der Carpentier-Edwards-S.A.V. Die D20H14 10 µm zeigt das geringste RV der getesteten NiTi-Dünnschicht-Klappensegel ( $0,26 \pm 0,03$  l/min,  $0,52 \pm 0,02$  l/min und  $0,24 \pm 0,01$  l/min). Bei den D20 15 µm Klappensegeln erreichen die Segel mit 18 mm Höhe mit  $0,3 \pm 0,01$  l/min,  $0,55 \pm 0,07$  l/min und  $0,49 \pm 0,04$  l/min die besseren Werte im Vergleich zu den Klappensegeln mit einer Höhe von 14 mm ( $0,82 \pm 0,02$  l/min,  $0,81 \pm 0,04$  l/min und  $0,5 \pm 0,02$  l/min).

Für die D20H14 15 µm wurde das größte RV der NiTi-Klappensegel gemessen. Bei steigendem Druck zeigt sich, dass das RV der Carpentier-Edwards-S.A.V. im Vergleich stärker zunimmt als das RV der NiTi-Klappensegel. Unter einem Druck von 10 kPa liegen bis auf eine D20H14 15 µm Klappe im Bereich der Carpentier-Edwards-S.A.V. ( $0,61$  l/min), meistens weisen sie jedoch kleinere RV auf. Im Test unter 15 kPa sind die Werte der NiTi-Klappensegel geringer als für die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenz.

Modell	$\Delta p_s$ / mmHg	$\Delta p_d$ / mmHg	PI / %	EÖF / cm <sup>2</sup>	RV / l/min
<b>D20H14 10 µm #1</b>	$4,2 \pm 0,5$	$37,9 \pm 17,3$	$49,6 \pm 8,1$	$1,6 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,1$
<b>D20H14 10 µm #2</b>	$4,6 \pm 0,8$	$36,7 \pm 16,6$	$50,9 \pm 7,5$	$1,6 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$
<b>D20H14 10 µm #3</b>	$4,4 \pm 1,0$	$37,9 \pm 17,7$	$53,5 \pm 5,4$	$1,7 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
<b>D20H18 10 µm #1</b>	$4,7 \pm 1,4$	$36,4 \pm 16,8$	$45,7 \pm 3,2$	$1,4 \pm 0,1$	-
<b>D20H18 10 µm #2</b>	$4,3 \pm 1,0$	$35,3 \pm 16,7$	$48,2 \pm 4,4$	$1,5 \pm 0,1$	-
<b>D20H18 10 µm #3</b>	$4,4 \pm 0,9$	$35,8 \pm 16,9$	$48,4 \pm 4,4$	$1,5 \pm 0,1$	-
<b>D20H14 15 µm #1</b>	$6,2 \pm 1,0$	$34,2 \pm 16,2$	$43,8 \pm 7,3$	$1,4 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
<b>D20H14 15 µm #2</b>	$6,6 \pm 0,6$	$35,8 \pm 16,6$	$42,0 \pm 7,9$	$1,3 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$
<b>D20H14 15 µm #3</b>	$6,7 \pm 1,2$	$37,0 \pm 16,9$	$42,0 \pm 6,3$	$1,3 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$
<b>D20H18 15 µm #1</b>	$8,3 \pm 1,2$	$37,6 \pm 17,2$	$36,1 \pm 5,5$	$1,1 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$
<b>D20H18 15 µm #2</b>	$7,3 \pm 1,5$	$35,7 \pm 17,4$	$39,1 \pm 4,9$	$1,2 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$
<b>D20H18 15 µm #3</b>	$6,6 \pm 0,7$	$35,8 \pm 17,2$	$39,9 \pm 8,0$	$1,3 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$
<b>Edwards SAV</b>	$18,3 \pm 6,5$	$37,9 \pm 16,9$	$32,2 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,3$

Tabelle 10: Vergleich der getesteten NiTi-Vollmaterialklappen. Die Werte zeigen jeweils die gemittelten Werte über eine Herzrate von 40 – 75 min<sup>-1</sup> und dem zugehörigen Herzminutenvolumen.  $\Delta p_s$  und  $\Delta p_d$  beschreiben die systolischen sowie diastolischen Druckdifferenzen, PI den Performance Index, EÖF die daraus resultierende effektive Öffnungsfläche. RV ist das Rückflussvolumen, über einen Druck von 5,2 kPa, 10 kPa und 15 kPa gemittelt. Die jeweiligen Fehler geben die Standardabweichung der gemessenen Werte über den gesamten Bereich der Herzrate an (Standardabweichung der Werte bei 40, 50, 50, 70 und 75 bpm).

In der Tabelle sind die RV für die getesteten Klappen gemittelt über den gesamten getesteten Bereich von 5,2 kPa bis 15 kPa vergleichend dargestellt. Zum Vergleich wurden die gemessenen Werte über den gesamten Bereich der Herzrate gemittelt. Für die Bestimmung der Mittelwerte wurden für jede Herzrate jeweils die Werte von fünf aufeinanderfolgenden Öffnungs- bzw. Schließzyklen gemittelt. Aus diesen Mittelwerten zu einer bestimmten Herzrate wurden die Mittelwerte der gesamten Herzrate in der Tabelle 10 und die dazugehörigen Standardabweichungen bestimmt.

Alle D20H14 10  $\mu\text{m}$  und D20H18 15  $\mu\text{m}$  Klappensegel haben gleiche oder geringere RV als die Referenzklappe. Lediglich zwei der D20H14 15  $\mu\text{m}$  Testproben haben im Schnitt höhere RV als die Referenz. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen der diastolischen Druckdifferenz im vorherigen Kapitel. Auch dort erreichten die D20H14 10  $\mu\text{m}$  Klappensegel die besten Werte, gefolgt von den D20H18 15  $\mu\text{m}$  Segeln. Die geringere diastolische Druckdifferenz der D20H14 15  $\mu\text{m}$  Segel deutete auf ein höheres RV hin, was sich in der anschließenden Messung bestätigte.

Des Weiteren sind in der Tabelle alle charakteristischen hydrodynamischen Messgrößen und die Abweichungen über den getesteten Bereich von  $40 \text{ min}^{-1}$  bis  $75 \text{ min}^{-1}$  aufgetragen. Die systolischen Druckdifferenzen liegen für alle NiTi-Dünnschicht-Klappensegel weit unterhalb der Werte der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe. Die systolischen Druckdifferenzen der Carpentier-Edwards-S.A.V. sind zwei bis vier Mal größer. Die geringen Abweichungen der Druckdifferenz deuten auf eine nahezu konstante Druckdifferenz über den getesteten Bereich hin. Die große Abweichung für die Carpentier-Edwards-S.A.V. resultiert aus der Zunahme der Druckdifferenz bei steigender Herzrate. Alle NiTi-Dünnschichtsegel halten während der Diastole eine große Druckdifferenz, vergleichbar mit der Carpentier-Edwards-S.A.V., aufrecht. In Übereinstimmung mit den RV Messungen weist die D20H14 15  $\mu\text{m}$  die geringste diastolische Druckdifferenz und das größte RV auf.

Die NiTi-Dünnschichtklappensegel haben größere relative Öffnungsflächen (PI) als die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe. Aus den PI und der Klappengröße kann die effektive Öffnungsfläche (EÖF) bestimmt werden. Der kleinste Wert liegt bei  $1,13 \pm 0,17 \text{ cm}^2$  (D20H18 15  $\mu\text{m}$ ) und der größte Wert bei  $1,68 \pm 0,17 \text{ cm}^2$  (D20H14 10  $\mu\text{m}$ ). Die EÖF der Carpentier-Edwards-S.A.V. ist in etwa  $1 \text{ cm}^2$  groß. Die Abweichungen in der EÖF sind für die NiTi-Klappensegel größer, was von der größer werdenden EÖF mit steigender Herzrate hervorgerufen wird. In guter Übereinstimmung mit den systolischen Druckdifferenzen wird deutlich, dass bei den NiTi-Klappensegeln die Druckdifferenz konstant bleibt und die

Öffnungsfläche größer wird. Im Gegensatz dazu steigt der systolische Druck der Carpentier-Edwards-S.A.V. mit steigender Herzrate stark an, dafür bleibt jedoch die Öffnungsfläche konstant. Dies zeigt eine bessere Flexibilität und Beweglichkeit der biologischen Klappensegel. Schon unter einem geringen Druck öffnet die Klappe bis zu ihrer maximal erreichbaren Öffnungsfläche. Die EÖF ist jedoch durch die Kommissur zweier benachbarter Segel und damit durch die Konstruktionsart der Klappe begrenzt. Laut ISO 5840 ist die minimale EÖF die erreicht werden muss bei einer Klappengröße von 19 mm Durchmesser und einem Herzminutenvolumen von 5 l/min mindestens  $0,7 \text{ cm}^2$ .<sup>97</sup> Diese Werte werden von allen getesteten Klappen deutlich übertroffen.

#### 4.2.6 Langzeittest und Ni-Freisetzung

Die Ni-Freisetzung der NiTi-Dünnschicht-Klappensegel ist ein wichtiger Faktor hinsichtlich der Biokompatibilität der Klappen. Aufgrund der Unverträglichkeit des menschlichen Körpers gegenüber geringer Mengen Ni-Ionen sollte sichergestellt werden, dass von den Klappensegeln unter Bewegung keine Gesundheitsgefährdung ausgeht. NiTi-Stents und weitere starre NiTi-Implantate haben bereits den Status der Anwendung erreicht. Anders verhält es sich jedoch mit Herzklappensegeln, welche im Blutfluss ständiger Bewegung ausgesetzt sind.

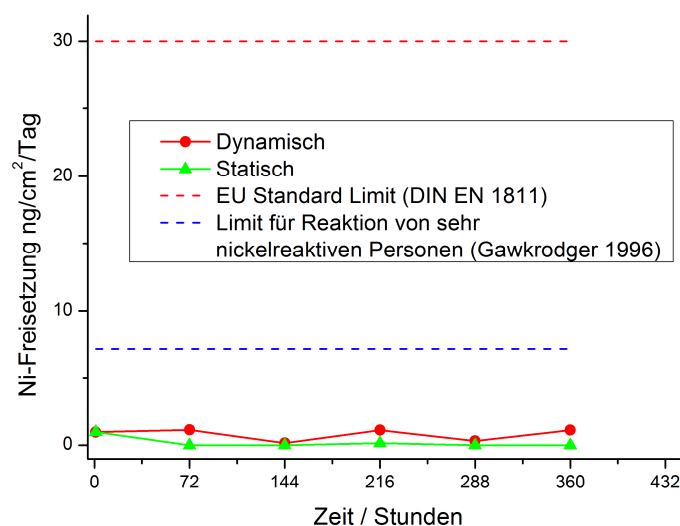


Abbildung 55: Ni-Freisetzung einer NiTi-Dünnschicht Klappe unter Bewegung.  $1,5 \times 10^6$  Zyklen wurden über einen Zeitraum von 18 Tagen getestet.

Um die Ni-Freisetzung der Klappensegel zu untersuchen, wurden eine D20H14  $10 \mu\text{m}$  Klappen mit drei Segeln unter leichter Bewegung für 15 Tage und  $1,5 \times 10^6$  Öffnungszyklen



getestet (mittlerer Druck ~32 mmHg). Als Testfluid wurde Ultrareines Wasser verwendet. Zum Vergleich wurde die Ni-Freisetzung einer statischen Probe in der Flüssigkeit statisch ohne Bewegung über einen Zeitraum von 15 Tage gemessen. Hier wurde ebenfalls alle drei Tage Testfluid entnommen und die Ni-Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 55 und der Tabelle 11 dargestellt.

Die absolute gemessene Ni-Konzentration im Testfluid in Kontakt mit der statischen Probe blieb während der gesamten 15 Tage konstant bei 0,06 – 0,07 µg/l. Die absolute Ni-Konzentration im Testfluid in Kontakt mit der Probe unter dynamischer Bewegung stieg von 0,06 µg/l zu Beginn der Messung auf 0,3 µg/l nach 15 Tagen an. Die Ni-Konzentration im Blut eines gesunden Menschen liegt laut Herber bei < 0,05 – 3,8 µg/l.<sup>101</sup> Aus der Ni-Konzentration im Testfluid und der Oberfläche von 20,74 cm<sup>2</sup> in Kontakt mit dem Testfluid wurde die Ni-Immersion pro Tag errechnet. Die Ni-Immersion schwankt zwischen 0,16 ng/cm<sup>2</sup>/Tag und maximal 1,12 ng/cm<sup>2</sup>/Tag. Die Ni-Freisetzung der dynamischen Klappe kann als konstant über die 15 Tage betrachtet werden und liegt deutlich unter den Werten des DIN EN 1811 Standard für den Hautkontakt mit Ni von 30 ng/cm<sup>2</sup>/Tag (nach 7 Tagen in künstlicher, schweißähnlicher Flüssigkeit bei 30°C).<sup>102</sup> Von Gawkrödger wurde eine maximale Ni-Konzentration von 7 ng/cm<sup>2</sup>/Tag vorgeschlagen, da eine leicht höhere Konzentration bei vereinzelt hochsensiblen Patienten eine Reaktion auslösen konnte.<sup>103</sup> Dieses vorgeschlagene verringerte Limit für sehr nickelreaktive Personen liegt um 5 ng/cm<sup>2</sup>/Tag und damit deutlich höher als die gemessene Ni-Immersion der gesputterten NiTi-Dünnschicht-Klappensegel. Die von Gawkrödger et al. gemessenen Ni-Freisetzung von Edelstahl liegt bei 0,03 µg/cm<sup>2</sup>/Woche (4,3 ng/cm<sup>2</sup>/Tag) und ist damit ebenfalls höher als die Ni-Freisetzung von NiTi-Dünnschicht Segeln in Bewegung.

Zeit / Stunden	Ni-Immersion			
	Statisch		Dynamisch	
	Absolut / µg/l	Immersion / ng * cm <sup>-2</sup> * d <sup>-1</sup>	Absolut / µg/l	Immersion / ng * cm <sup>-2</sup> * d <sup>-1</sup>
1	0,06	0,96	0,06	0,06
72	0,06	0	0,13	1,12
144	0,07	0	0,14	0,16
216	0,07	0,16	0,21	1,11
288	0,07	0	0,23	0,31
360	0,07	0	0,3	1,11

*Tabelle 11: Ni-Freisetzung der statisch und der dynamisch getesteten NiTi-Klappensegel. Angegeben sind die absolut gemessenen Werte in der Flüssigkeit in µg/l und die daraus errechnete Ni-Immersion pro Tag in ng/cm<sup>2</sup>/d.*

### 4.3 NiTi-Herzklappen mit strukturierten Segeln

NiTi-Dünnschicht-Klappensegel könnten eine bessere Flexibilität und höhere Beweglichkeit haben, wenn die Segel nicht aus Vollmaterial, sondern mit einer membranartigen, dünnen Netzstruktur hergestellt werden. Die Idee dahinter ist, diese membranartigen strukturierten Segel mit biologischem Material des Patienten zu besiedeln. Die NiTi-Dünnschichten dienen damit als Gerüst für Tissue Engineering. Auf diese Weise könnten biokompatible, hoch funktionale Herzklappensegel für Transkatheter basierte Implantationen entwickelt werden. Um dies zu untersuchen, wurden mit dem vorher beschriebenen Herstellungsprozess Klappensegel angefertigt. Die Herstellung durch Magnetronspütern, Lithographie Prozess und nasschemisches Ätzverfahren erlaubt die Strukturierung der NiTi-Filme mit Mikrometer-Präzision und hohem Aspekt-Verhältnis. Vor diesem Hintergrund wurden Filme mit rautenförmigen Löchern im Mikrometerbereich untersucht. Im folgenden Abschnitt werden die mechanischen Eigenschaften verschiedener Größen von diesen Netzstrukturen beschrieben. Des Weiteren wurden Klappensegel mit rautenförmigen Strukturen charakterisiert. Um die Eignung der strukturierten NiTi-Dünnschichten für Tissue Engineering Ansatz zu untersuchen, wurden die Gerüste mit unterschiedlichen Zelltypen besiedelt. Die verwendeten Zellen waren CD133+ Vorläufer Zellen, ausgewachsene Endothelzellen sowie glatte Muskelzellen.

#### 4.3.1 Mechanische Eigenschaften strukturierter NiTi-Dünnschichten

Um die effektiven mechanischen Eigenschaften der strukturierten NiTi-Dünnschichten zu bestimmen, wurden durch Magnetronspütern, Fotolithographie und chemisches Nassätzen NiTi-Proben mit einer Schichtdicke von 10  $\mu\text{m}$  hergestellt (Abbildung 56). In der Mitte der knochenförmigen Proben befinden sich in einem rechteckigen Bereich mit einer Länge von 4,5 mm und einer Breite von 2 mm rautenförmige Löcher. Die Größen dieser Strukturen variieren zwischen 440  $\mu\text{m}^2$  bis 1310  $\mu\text{m}^2$ . Die unterschiedlichen Lochgrößen resultieren aus der Variation der langen Achse und der kurzen Achse der Rauten. Außerdem wurde die Stegbreite dieser Strukturen an die Lochgröße angepasst. Die verschiedenen Strukturgrößen werden im Folgenden mit Struktur S (Small), M (Medium) und L (Large) bezeichnet. Struktur S hat eine lange Achse  $l$  von  $45 \pm 0,2 \mu\text{m}$ , eine kurze Achse  $w$  von  $15,1 \pm 0,1$  und eine Stegbreite  $s$  von  $5,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . Struktur M hat die Maße  $l = 64,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ,  $w = 19,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$  und  $s = 7,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . Für die Struktur L wurden die Werte  $l = 84,5$

$\pm 0,2 \mu\text{m}$ ,  $w = 24,7 \pm 0,2$  und  $s = 9,2 \pm 0,2$  bestimmt. Diese Größen wurden mit Hilfe der REM-Aufnahmen der NiTi-Strukturen bestimmt und sind in der Tabelle 12 zusammengefasst. Wie in der Abbildung 56 dargestellt, wurden bei den Proben die langen Achsen der Rauten longitudinal sowie transversal zur Zugrichtung ausgerichtet. Die effektiven mechanischen Eigenschaften beider Richtungen können dementsprechend verglichen werden.

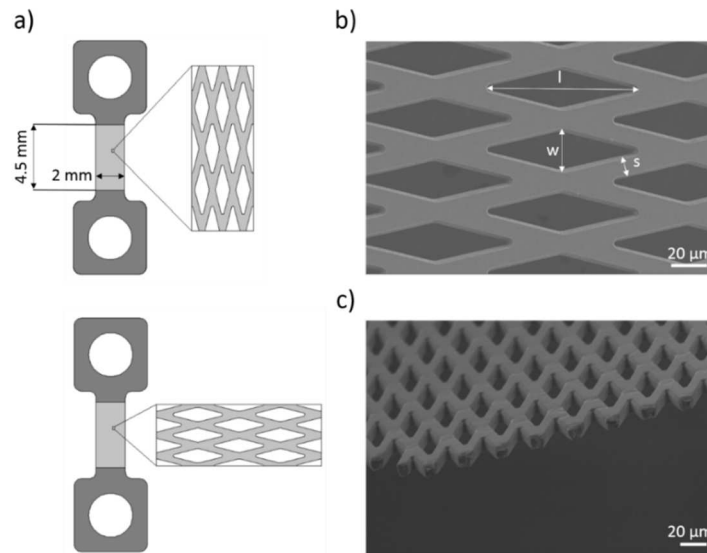


Abbildung 56: Probendesign: a) Transversal und longitudinal ausgerichtete rhombische Dogbone Probe mit einer parallelen Länge von 4,5 mm und einer Breite von 2 mm. b) Mikrograph der rhombischen Löcher in der Netzstruktur mit der langen Achse  $l$ , der kurzen Achse  $w$  und der Stegbreite  $s$ . Die charakteristischen Werte sind in der Tabelle dargestellt. c) Gebrochene Struktur der Größe  $M$ .<sup>104</sup>

	<b>S</b>	<b>M</b>	<b>L</b>
<b>Stegbreite <math>s / \mu\text{m}</math></b>	$5,3 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,2$
<b>Rhombische kurze Achse <math>w / \mu\text{m}</math></b>	$15,1 \pm 0,1$	$19,7 \pm 0,2$	$24,7 \pm 0,2$
<b>Rhombische lange Achse <math>l / \mu\text{m}</math></b>	$45,0 \pm 0,2$	$64,2 \pm 0,1$	$84,5 \pm 0,2$
<b>Rhombische Löchgröße / <math>\mu\text{m}^2</math></b>	$440 \pm 8$	$820 \pm 21$	$1309 \pm 37$

Tabelle 12: Charakteristische Größen für die verschiedenen hergestellten Netzstrukturen.<sup>104</sup>

DSC Messungen der freitragenden NiTi-Proben zeigen eine  $A_f$  Temperatur von  $26,4 \pm 0,9^\circ\text{C}$ . Dementsprechend zeigen die Proben bei einer Testtemperatur von  $37^\circ\text{C}$  und einer Dehnung von 4% superelastisches Verhalten (Abbildung 57). Longitudinal ausgerichtete Proben zeigen keine signifikanten strukturabhängigen Abweichungen in den mechanischen Eigenschaften. Der effektive Young's Modulus liegt für die Strukturen S, M und L im Bereich von  $44,3 \pm 1,6 \text{ GPa}$ . Die effektive Zugfestigkeit liegt für die Proben bei  $390 \pm 7 \text{ MPa}$  und die Bruchdehnung bei  $10,9 \pm 0,4\%$ . Die jeweils sehr geringen Abweichungen in den effektiven mechanischen Eigenschaften zeigen, dass die Werte für die unterschiedlichen Strukturen in longitudinaler Ausrichtung kaum variieren.

Anders verhält es sich bei den transversal ausgerichteten Strukturen. Der effektive Young's Modulus nimmt bei diesen Proben mit größer werdender Strukturgröße von S zu L zu. Ist der gemessene effektive Young's Modulus der Struktur S bei etwa  $10,6 \pm 0,3$  GPa, liegt er für die Struktur L nur noch bei  $3,6 \pm 0,1$  GPa. Ebenso nimmt die Zugfestigkeit von 72 MPa auf 39 MPa ab. Im Gegensatz dazu steigt die Bruchdehnung von 10,1% für die Struktur S auf 15,5% für die Struktur L. Die kleineren effektiven Spannungen der transversalen Strukturen sind durch den geringeren Materialanteil im Querschnitt der Probe zu erklären. Der niedrige Young's Modulus und die höherer Bruchdehnung der Struktur L zeigen, dass sich bei den größeren Netzen zusätzlich zu dem Material die Netzstruktur verformt. In longitudinaler Ausrichtung ist die Struktur nicht hinreichend flexibel und die Dehnung beschreibt in erster Linie eine Verformung des Materials, während in transversaler Richtung zusätzlich zu der Materialverformung die Verformung der Rauten eine Rolle spielt.

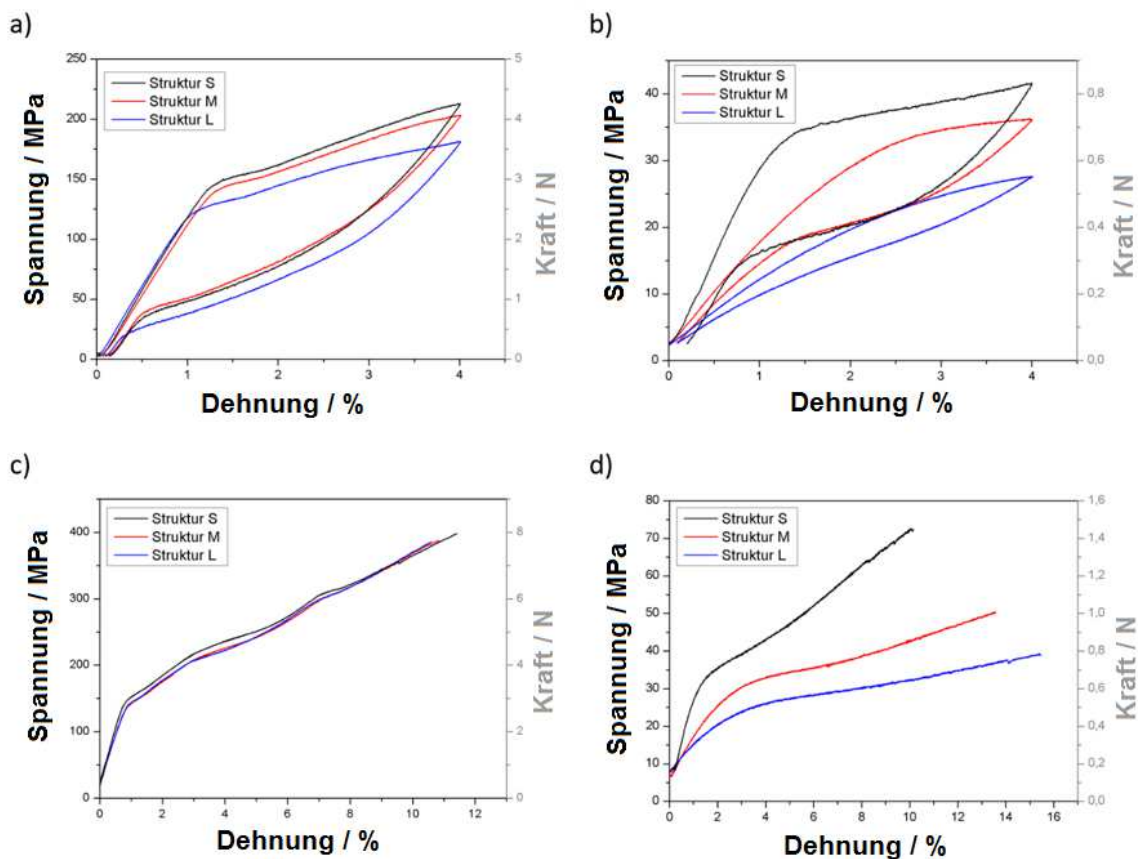


Abbildung 57: Zugtests der freitragenden und mikrostrukturierten NiTi-Dünnschichten bei einer Testtemperatur von 37°C: a) Zugkurve der longitudinal ausgerichteten Strukturen bis 4%, b) Zugkurven der transversal ausgerichteten Strukturen bis 4%. a) und b) zeigen die Superelastizität der Proben bei einer Temperatur von 37°C. c) Bruchdehnung der longitudinal ausgerichteten Strukturen, d) Bruchdehnung der transversal ausgerichteten Strukturen.<sup>104</sup>

Strukturausrichtung	Longitudinal			Transversal		
Struktur	S	M	L	S	M	L
Effektiver Young's modulus / GPa	44,5 ± 1,2	43,4 ± 1,2	44,2 ± 1,2	10,6 ± 0,3	5,5 ± 0,2	3,6 ± 0,1
Effektive Zugfestigkeit / MPa	398	386	385	72	50	39
Bruchdehnung / %	11,4	10,8	10,6	10,1	13,6	15,5

Table 13: Effective mechanical properties of the free-standing and structured NiTi thin layers in longitudinal and transversal orientation. The temperature during the experiments was 37°C. The NiTi thin layers are at the temperature in the Austenite phase.<sup>104</sup>

### 4.3.2 Systolische Druckdifferenz

Nachdem die mechanischen Eigenschaften der Netzstrukturen im vorherigen Abschnitt ermittelt wurden, sind Herzklappensegel mit der Netzstruktur L hergestellt worden. Der Prozess verläuft wie derjenige für die Vollmaterial-Herzklappensegel. Das planare 2D-Design und die Rautenstruktur der Segel sind in Abbildung 58 dargestellt. Aus den Mikroskopieaufnahmen lässt sich eine Stegbreite von 9,5 µm, eine lange Achse der Rauten von 84,9 µm und eine kurze Achse der Rauten von 24,6 µm ermitteln. Abbildung 56b zeigt die strukturierten und 3D geformten NiTi-Dünnschicht-Klappensegel nach einem Formungsprozess mit dem klappenförmigen Formwerkzeug bei einer Ofentemperatur von 830°C für 20 min und 500°C für 20 min.

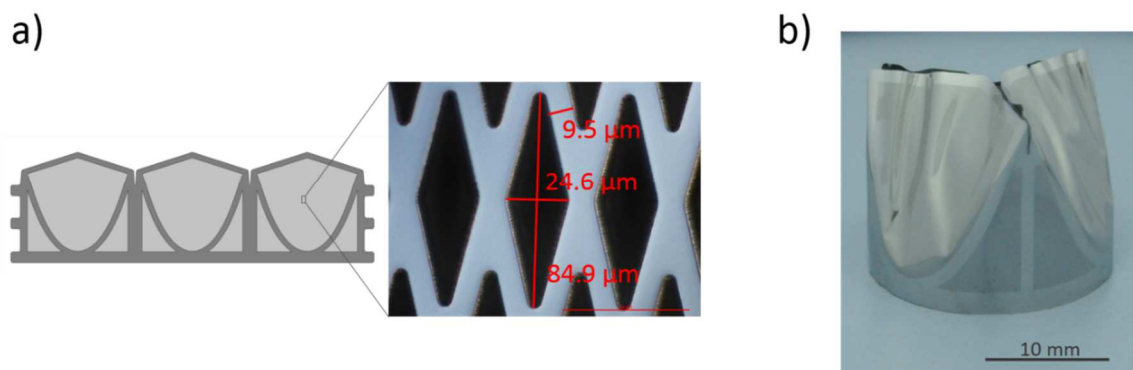


Abbildung 58: a) Planares 2D-Design der strukturierten Herzklappensegel. In hellem Grau zeigen die Bereiche mit der rautenförmigen Mikrostruktur L. Die in dunklem Grau dargestellten, aus Vollmaterial bestehenden tragenden Strukturen dienen der Stabilität. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Größen der Rauten mit einer Stegbreite von 9,5 µm. Die lange Achse ist 84,9 µm und die kurze Achse 24,6 µm lang. b) Foto der D20H14 10 µm Netz L Herzklappensegel nach dem 3D-Formungsprozess.

Um die Funktionalität der strukturierten Dünnschicht-Klappensegel zu untersuchen, wurden hier ebenfalls hydrodynamische Messungen am Klappentester durchgeführt. Jeweils drei 3D geformte Klappen in mit einer Höhe von 14 mm und 18 mm wurden für diese Arbeit getestet und ausgewertet.

In der Abbildung 59 sind drei Pumpzyklen von drei verschiedenen Klappen bei einer Herzrate von  $70 \text{ min}^{-1}$  dargestellt. In der systolischen Phase beträgt die Druckdifferenz  $> 0$  mmHg. Die Druckdifferenzen der strukturierten NiTi-Klappensegel sind deutlich geringer als die Werte für die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe. Die Druckdifferenz der Klappen nimmt zu, bis die Klappensegel geöffnet sind und die maximale Öffnung erreicht ist. Für die Carpentier-Edwards-S.A.V. wird der maximale Druckwert erreicht, der während der systolischen Phase mit ein paar kleinen Druckschwankungen konstant bleibt. Die systolische Druckdifferenz der NiTi-Klappensegel nimmt auf den maximalen Wert zu, fällt danach auf etwa 0 mmHg ab und anschließend stellt sich eine kleine Druckdifferenz ein, bis die Geschwindigkeit des Kolbens abnimmt und die Diastole beginnt.

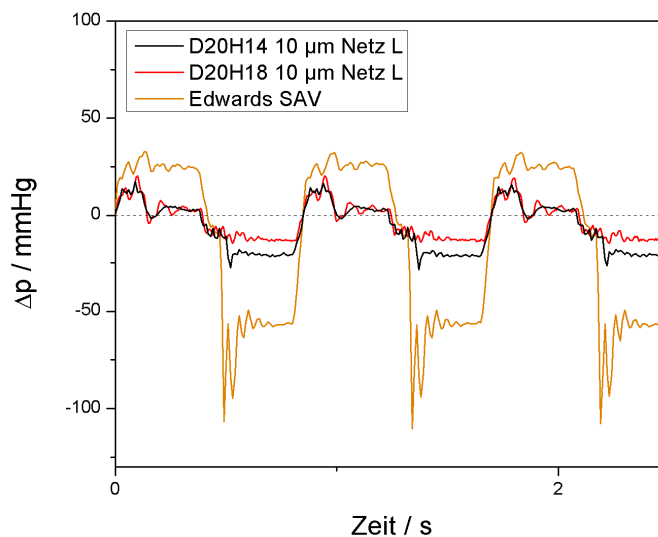


Abbildung 59: Transvalvuläre Druckdifferenzen während der hydrodynamischen Zyklus für die strukturierten Klappensegel D20H14 (schwarz), D20H18 (rot) und die Referenzklappe Carpentier-Edwards-S.A.V. Systolische Druckdifferenz für  $\Delta p > 0$  und diastolische Phase für  $\Delta p < 0$ . Die Druckdifferenzen während der Systole sind deutlich kleiner für die NiTi-Klappensegel. In der diastolischen Phase halten die Klappensegel nur eine kleine Druckdifferenz aufrecht.

Die Abbildung 60 zeigt die mittleren systolischen transvalvulären Druckdifferenzen der unterschiedlichen Klappen in Abhängigkeit von der Herzrate. Die mittleren systolischen Druckdifferenzen der strukturierten NiTi-Klappensegel liegen deutlich unter den mittleren Druckdifferenzen der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe. Dies deutet auf eine hohe Flexibilität und Beweglichkeit der Segel hin. Die D20H14  $10 \mu\text{m}$  Netz L erreichen dabei im Mittel die kleinsten Druckdifferenzen ( $2,2 \pm 0,3 \text{ mmHg} - 4,6 \pm 0,5 \text{ mmHg}$ ). Die Werte für die D20H18  $10 \mu\text{m}$  Netz L liegen minimal darüber ( $2,2 \pm 0,03 \text{ mmHg} - 5,5 \pm 0,1 \text{ mmHg}$ ).

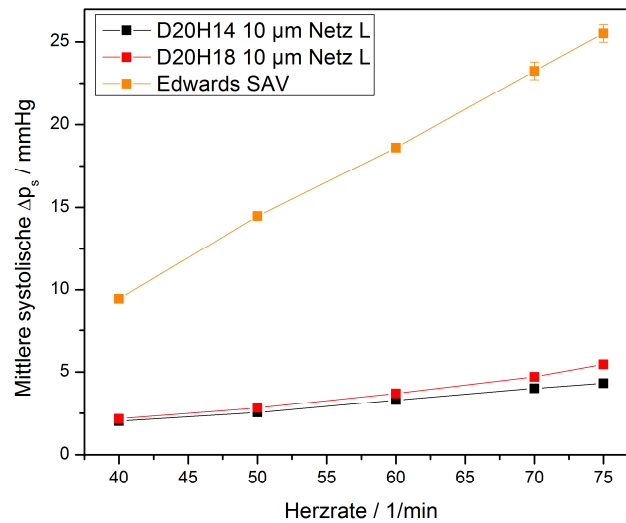


Abbildung 60: Mittlere transvalvuläre Druckdifferenzen während der Systole. Die D20H14 10  $\mu\text{m}$  Netz L weist die geringste Druckdifferenz auf (schwarz). Die Druckdifferenzen der D20H18 10  $\mu\text{m}$  Netz L liegen minimal darüber (rot). Im Vergleich zu der Referenzklappe Carpentier-Edwards-S.A.V. sind die Druckdifferenzen der Klappe sehr gering und steigen mit steigender Herzrate nur minimal an.

### 4.3.3 Öffnungsfläche und Performance Index

Aus den Videosequenzen der Klappentests wurde die relative maximale Öffnungsfläche (PI) der Klappen ermittelt. Da die systolischen Druckdifferenzen der strukturierten NiTi-Klappensegel weit unterhalb der Werte der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe liegen, ist die zu erwartende EÖF der NiTi-Segel größer. Die gemessenen Werte der relativen Öffnungsfläche der strukturierten Segel in Abhängigkeit von der Herzrate sind in Abbildung 61 dargestellt. Die strukturierten Klappensegel erreichen sehr große Öffnungsflächen im Vergleich zu der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe. Der PI der D20H14 10  $\mu\text{m}$  Netz L Klappensegel liegt bei  $62,8 \pm 6,3 \%$  bei einer Herzrate von  $40 \text{ min}^{-1}$  und steigt mit steigender Herzrate auf  $75,7 \pm 3,3 \%$  für  $75 \text{ min}^{-1}$  an. Die PI für die strukturierten D20H18 Klappensegel liegen bei  $66,5 \pm 2,7 \%$  (Herzrate:  $40 \text{ min}^{-1}$ ) und steigen auf den maximalen Wert von  $76,8 \pm 3 \%$  (Herzrate:  $75 \text{ min}^{-1}$ ) an. Damit sind die PI Werte mindestens um einen Faktor 2 größer als die PI der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe (32 – 33 %). Hier wird auch wieder deutlich, dass die Öffnungsflächen der strukturierten NiTi-Klappensegel mit zunehmender Herzrate von  $40 - 75 \text{ min}^{-1}$  im Schnitt um etwa 10 % zunehmen, wohingegen die Öffnungsfläche der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe über die gesamte Herzrate konstant bleibt.

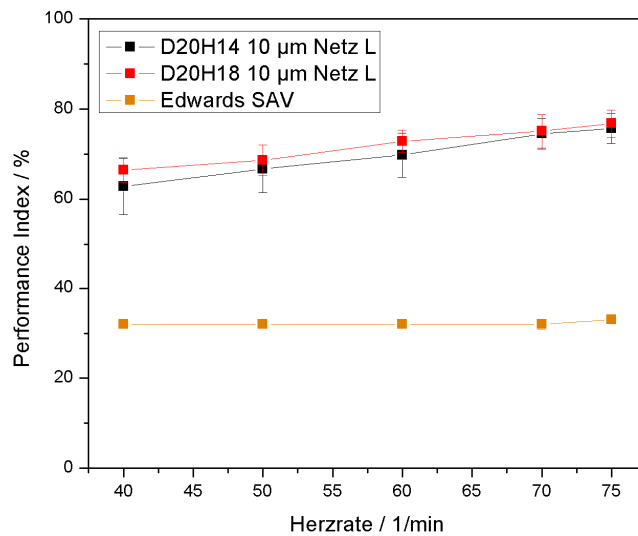


Abbildung 61: Performance Index der Klappensegel D20H14 und D20H18 mit der Netzstruktur L. Die Öffnungsflächen sind im Vergleich mit der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe deutlich größer. D20H18 erreicht die größten Öffnungsflächen, bezieht man die Abweichungen mit ein, liegen die Öffnungsflächen der D20H14 Klappen in gleichauf.

Herzrate	40 min <sup>-1</sup>	50 min <sup>-1</sup>	60 min <sup>-1</sup>	70 min <sup>-1</sup>	75 min <sup>-1</sup>
Modell					
D20H14 Netz L					
D20H18 Netz L					
Edwards SAV					

Abbildung 62: Maximal Öffnungsfläche in Abhängigkeit von der Herzrate der D20H14 und D20H18 Netz L, verglichen mit der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe.

In der Abbildung 62 sind die maximalen Öffnungsflächen in Abhängigkeit von der Herzrate dargestellt. Schon bei einer Herzrate von 40 min<sup>-1</sup> und einem damit verbundenen geringen Öffnungsdruck, öffnen alle drei Klappensegel der strukturierten NiTi-Klappen. Dies ist vergleichbar mit der Carpentier-Edwards-S.A.V., die auch unter geringem Druck schon ihre maximale Öffnungsfläche erreicht. Bei den strukturierten Klappenmodellen ist hingegen noch eine Vergrößerung der Öffnungsfläche mit steigender Herzrate von etwa 10



% zu verzeichnen. Im physiologischen Modell ermöglicht diese große Öffnungsfläche einen hohen kardialen Fluidausstoß, verbunden mit einer kleinen Herzarbeit.

Die Abbildung 63 zeigt Öffnungssequenzen der unterschiedlichen Klappensegel bei einer Herzrate von  $70 \text{ min}^{-1}$ . Diese Herzrate entspricht in etwa den normalen physiologischen Bedingungen. Die D20H14  $10 \mu\text{m}$  Netz L Klappensegel sind während der Diastole komplett geschlossen. Zu Beginn der Systole öffnen die drei Klappensegel gleichmäßig, d.h. alle drei Segel beginnen sofort mit einer gleichförmigen öffnenden Bewegung. Die drei Klappensegel öffnen nahezu komplett und es ergibt sich eine große maximale Öffnungsfläche. Während der Schließphase schließen die drei Segel gleichzeitig und die Klappensegel schließen komplett zueinander ab. Die Klappensegel zeigen eine gute Komplianz.

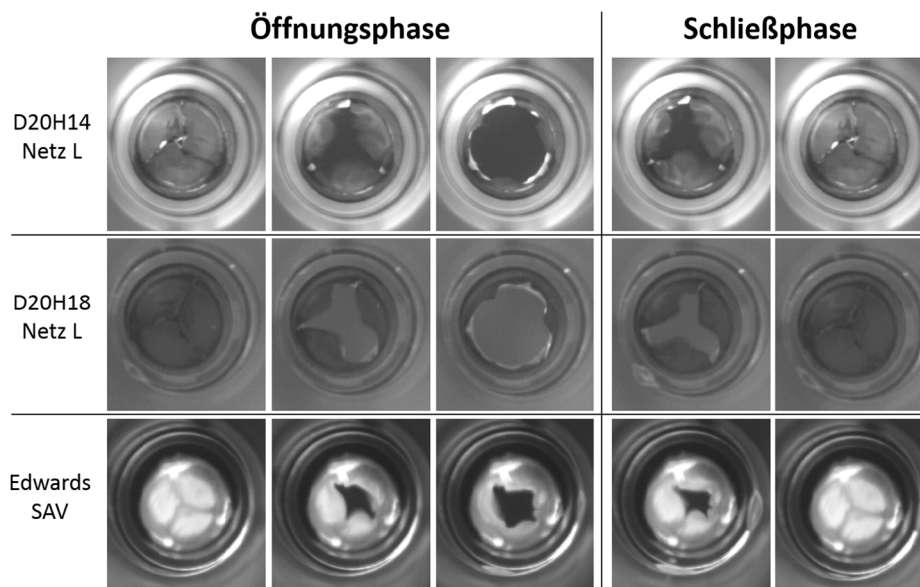


Abbildung 63: Öffnungssequenz der Klappensegel mit strukturierten Segeln bei einer Herzrate von  $70 \text{ min}^{-1}$ . Die Klappensegel schließen vollständig. Sie öffnen gleichmäßig und erreichen eine viel größere Öffnungsfläche im Vergleich mit der Carpentier-Edwards-S.A.V. und im Vergleich mit den Vollmaterial-Segeln. Die drei strukturierten NiTi-Klappensegel öffnen nahezu komplett. Während der Schließphase schließen die drei NiTi-Klappensegel synchron und zeigen eine hinreichende Komplianz.

Ein sehr ähnliches Verhalten zeigen die D20H18 Klappensegel. Während der Diastole sind die Segel komplett geschlossen. Zu Anfang der Systole öffnen die drei Klappensegel gleichzeitig, führen aber keine gleichmäßige Bewegung durch. Anstatt einfach aufzuklappen, öffnen die Segel mit einer wellenartigen Bewegung. Wenn die maximale Öffnungsfläche erreicht ist, sind alle drei Segel nahezu komplett zu einem gleichen Grad gleichmäßig geöffnet. Während der Schließphase schließen die Klappensegel gleichzeitig.

#### 4.3.4 Diastolische Druckdifferenz

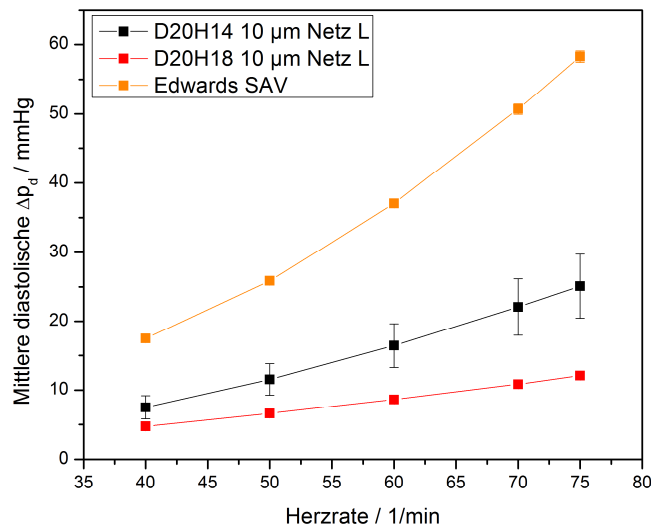


Abbildung 64: Mittlere diastolische Druckdifferenz der Klappen. Aufgrund der durchlässigen Netzstruktur erreichen die Klappen wie zu erwarten keine hohen Druckdifferenzen. Hier liegen die Druckdifferenzen weit unter den Werten der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe. Die D20H18 10 μm Netz L haben die geringsten Druckdifferenzen. Die diastolischen Druckdifferenzen der D20H14 10 μm Netz L liegen um etwas höher und weisen eine starke Abweichung unter den getesteten Klappensegeln auf.

Die rautenförmigen und wasserdurchlässigen Löcher in den mikrostrukturierten Segeln sorgen für eine kleine diastolische Druckdifferenz über die Klappen im Vergleich mit der Carpentier-Edwards-S.A.V. oder den Vollmaterial-NiTi-Segeln. Die in Abbildung 59 dargestellten kardialen Zyklen bei einer Herzrate von  $70 \text{ min}^{-1}$  zeigen, dass während der Diastole nur eine geringe transvalvuläre Druckdifferenz aufrecht gehalten wird. In Abbildung 64 sind die mittleren diastolischen transvalvulären Druckdifferenzen in Abhängigkeit von der Herzrate aufgetragen. Für alle Klappen steigen sie mit steigender Herzrate an. Die geringste diastolische Druckdifferenz wurde für die D20H18 Netz L Klappensegel gemessen. Der minimale Wert liegt bei einer Herzrate von  $40 \text{ min}^{-1}$  bei  $4,7 \pm 0,2 \text{ mmHg}$  und steigt mit größer werdender Herzrate auf  $12,1 \pm 0,2 \text{ mmHg}$  an. Die Druckdifferenzen der D20H14 Netz L Klappensegel liegen höher, erreichen jedoch ebenfalls nur Werte von  $7,0 \pm 1,7 \text{ mmHg} - 22,2 \pm 6,9 \text{ mmHg}$ . Verglichen mit der Carpentier-Edwards S.A.V. erhalten die strukturierten Klappen jedoch nur eine geringe Druckdifferenz während der Diastole aufrecht. Die transvalvulären diastolischen Druckdifferenzen der biologischen Klappe sind im Vergleich mit den strukturierten NiTi Segeln um einen Faktor 2 bis 2,6 größer. Die geringe Druckdifferenz der strukturierten

NiTi-Klappensegel beruht auf der Durchlässigkeit der Segel. Wasser fließt durch die Mikrolöcher der Klappensegel und dadurch ist das valvuläre Rückflussvolumen sehr hoch. Als Folge verringert sich die transvalvuläre diastolische Druckdifferenz.

In der Tabelle 14 sind zum Vergleich die charakteristischen Werte der strukturierten NiTi-Klappensegel D20H14 und D20H18 gemittelt über die Herzrate von  $40 \text{ min}^{-1}$  bis  $75 \text{ min}^{-1}$  zusammengefasst. Alle strukturierten Segel weisen über die gesamte Herzrate sehr geringe systolische Druckdifferenzen auf. Die Abweichungen sind auch hier sehr gering im Vergleich zur Carpentier-Edwards-S.A.V. Damit einhergehend sind die relativen maximalen Öffnungsflächen der strukturierten Segel sehr groß. Bei der gemittelten Öffnungsfläche sind die Abweichungen der NiTi-Segel größer, da die NiTi-Klappensegel mit steigender Herzrate eine größere Öffnungsfläche haben (Zuwachs von  $40 \text{ min}^{-1}$  bis  $75 \text{ min}^{-1}$  im Durchschnitt um 10 %). Die gemessenen EÖF sind etwa um den Faktor 3 größer als die von der ISO 5840 verlangten  $0,7 \text{ cm}^2$  minimalen Öffnungsfläche.

Modell	$\Delta p_s / \text{mmHg}$	$\Delta p_d / \text{mmHg}$	PI / %	EÖF / $\text{cm}^2$
<b>D20H14 10 <math>\mu\text{m}</math> NetzL #1</b>	$3,3 \pm 0,9$	$18,5 \pm 7,5$	$66,2 \pm 5,5$	$2,1 \pm 0,2$
<b>D20H14 10 <math>\mu\text{m}</math> NetzL #2</b>	$3,0 \pm 1,0$	$18,2 \pm 8,5$	$76,0 \pm 3,7$	$2,4 \pm 0,1$
<b>D20H14 10 <math>\mu\text{m}</math> NetzL #3</b>	$3,4 \pm 1,0$	$12,9 \pm 5,8$	$70,4 \pm 5,1$	$2,2 \pm 0,2$
<b>D20H18 10 <math>\mu\text{m}</math> NetzL #1</b>	$3,7 \pm 1,3$	$8,7 \pm 3,0$	$68,6 \pm 4,0$	$2,2 \pm 0,1$
<b>D20H18 10 <math>\mu\text{m}</math> NetzL #2</b>	$3,8 \pm 1,4$	$8,4 \pm 3,0$	$74,5 \pm 4,0$	$2,3 \pm 0,1$
<b>D20H18 10 <math>\mu\text{m}</math> NetzL #3</b>	$3,8 \pm 1,3$	$8,6 \pm 3,1$	$72,8 \pm 5,0$	$2,3 \pm 0,2$
<b>Edwards SAV</b>	$18,3 \pm 6,5$	$37,9 \pm 16,9$	$32,2 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,1$

*Tabelle 14: Vergleich der strukturierten NiTi-Klappensegel. Die Werte geben jeweils die gemittelten Werte und die Abweichung über eine Herzrate von  $40 - 75 \text{ min}^{-1}$ .  $\Delta p_s$  und  $\Delta p_d$  beschreiben die systolischen sowie diastolischen Druckdifferenzen, PI den Performance Index, EÖF die daraus resultierende effektive Öffnungsfläche. Die strukturierten NiTi-Klappensegel weisen eine sehr geringe mittlere systolische Druckdifferenz auf. Damit einher geht eine sehr große Öffnungsfläche verglichen mit der Carpentier-Edwards S.A.V. Die laut ISO 5840 vorausgesetzten EÖF von  $0,7 \text{ cm}^2$  für Klappen mit  $19 \text{ mm}$  Durchmesser bei einem Herzminutenvolumen von  $5 \text{ l/min}$  werden deutlich übertroffen. Die diastolische Druckdifferenz ist sehr gering, da durch die Löcher in den Klappensegeln während der Diastole Fluid zurückströmt. Die aus diesem hohen Rückflussvolumen resultierende valvuläre Undichtigkeit führt zu den geringen transvalvulären Druckdifferenzen.*

Verglichen mit den Vollmaterial D20H14  $10 \mu\text{m}$  Klappensegeln, haben die strukturierten Klappensegel eine etwas geringere systolische transvalvuläre Druckdifferenz. Über die Herzrate gemittelt sind die Abweichungen der strukturierten Segel etwas höher (Abweichungen von  $0,93 \text{ mmHg} - 1,13 \text{ mmHg}$ , bei den Vollmaterial-Segeln  $0,47 \text{ mmHg} - 0,95 \text{ mmHg}$ ). Der über die Herzrate gemittelte PI der strukturierten Klappensegel ist um  $10 - 20 \%$  größer als der PI der Vollmaterial-Segel ( $66,2 - 76 \%$  strukturiert und  $49,6 -$

53,5 % Vollmaterial). Bei den Vollmaterial Klappen öffnen nicht alle Segel. Es gibt immer mindestens eines der drei Segel, das nur eine kleine Öffnungsbewegung zeigt. Die drei strukturierten Segel hingegen öffnen schon bei kleinen Herzraten gleichmäßig und zu einem hohen Öffnungsgrad. Die Vollmaterial-Segel haben eine designabhängige, durch die Form der Segel hervorgerufene Steifigkeit. Beim Öffnen der Segel muss ein Umklappprozess stattfinden, bei dem die Klappe einen komprimierten Status durchläuft. Der für dieses Umklappen benötigte Druck ist jedoch zu gering. Die strukturierten Segel können aufgrund ihrer Beschaffenheit dieses Umklappen leichter durchlaufen und öffnen gleichförmig. Eine größere maximale Öffnungsfläche wird mit den strukturierten Segeln erreicht (EÖF: 2,01 cm<sup>2</sup> – 2,39 cm<sup>2</sup> strukturiert, 1,56 cm<sup>2</sup> – 1,68 cm<sup>2</sup> Vollmaterial). Der Nachteil der strukturierten Klappensegel ist ihre Undichtigkeit aufgrund der durchlässigen Segel. Durch das starke valvuläre Rückflussvolumen entsprechen die transvalvulären diastolischen Druckdifferenzen nur 25 % bis 50 % der Werte der biologischen Carpentier-Edwards-S.A.V. oder der Vollmaterial-Segel.

#### **4.4 Zellbesiedlungen strukturierter NiTi-Dünnschichten**

Die strukturierten Klappensegel D20H14 10 µm Netz L und D20H18 10 µm Netz L zeigen sehr gute Flexibilität. Durch die geringe systolische transvalvuläre Druckdifferenz und die damit einhergehende große Öffnungsfläche sind die Klappensegel geeignet für Herzklappensegel in Transkatheter basierten Herzklappenimplantaten. Gegen eine Eignung sprechen das hohe Rückflussvolumen und die geringe diastolische Druckdifferenz. Es wird angestrebt, die Klappen *in vitro* mit autologen Zellen des Patienten zu besiedeln. Die strukturierten NiTi-Netze dienen als stabiles Gerüst für das Zellmaterial. Die Zellen schließen die Löcher und verringern das diastolische Rückflussvolumen. Mit dieser Methode könnten biokompatible, sehr flexible und langhaltende Hybrid-Herzklappensegel entwickelt werden.

Um den Zellwachstum auf den NiTi-Dünnschicht Netzen zu untersuchen, wurden auf den rautenförmigen Netzen verschiedener Mikrostrukturgrößen CD133+-Zellen, ausgewachsenen Endothelzellen sowie glatte Muskelzellen angesiedelt. Die ersten Untersuchungen erfolgten nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, um zu überprüfen, ob die Zellen auf den Gerüsten wachsen und ob sie etwa die Löcher schließen oder entlang der Stege wachsen. Da für die Anwendung als Herzklappensegel ein gesamtes Einwachsen

der mikrostrukturierten Dünnschichten wünschenswert ist, wurden die Zellen auf einem Großteil der Proben für 7 Tage inkubiert.

#### 4.4.1 Zellbesiedlung mit CD133+ Vorläufer Zellen

##### 24 Stunden CD133+ Zelladhäsion

Die Experimente der 24 Stunden Adhäsion der CD133+ Zellen wurden von Dr. rer. nat. Qian Li und B.Sc. Katharina Siemsen am Lehrstuhl für Biokompatible Nanomaterialien am Institut für Materialwissenschaften der Universität zu Kiel durchgeführt. Für die Untersuchung der Zelladhäsion an den Netzen nach 24 Stunden wurden  $10^6$  Zellen in jede Kammer mit 11,5 ml Kulturmedium auf die Proben gegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Die Proben wurden mit DMEM gereinigt und anschließend mit Calcein AM (2 µg/ml, BD Science, Deutschland) für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach einer vorsichtigen Reinigung der Proben mit PBS konnten sie unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (BX43, Olympus, Deutschland). Um eine bessere Vergrößerung zu erreichen, wurden die Proben mit 4% Paraformaldehyd (PFA, Sigma Aldrich) bei Raumtemperatur für 25 min fixiert, anschließend zweifach mit PBS gereinigt und in einen Probenhalter mit Vectashield (Vector Laboratories, Deutschland) gelegt.

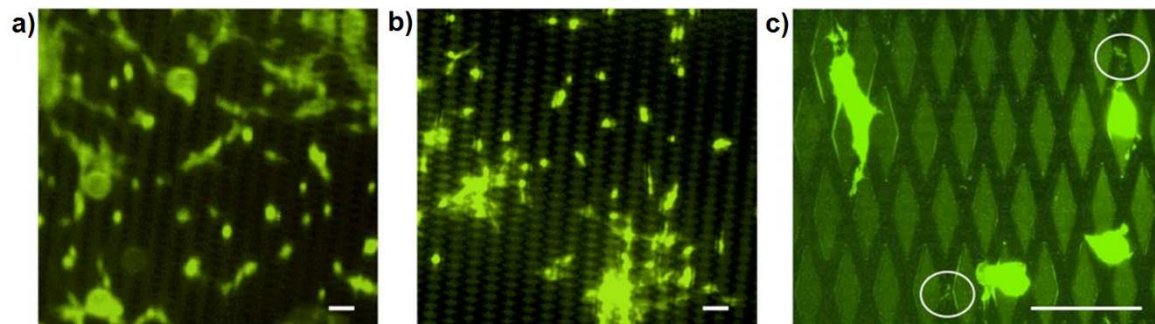


Abbildung 65: CD133+ Zellen mit Calcein AM markiert nach 24 Stunden Inkubationszeit. Lebende Zellen sind grün. a) Lebende Zellen auf der kleinen Struktur S. b) Lebende Zellen auf der großen Struktur M. c) Aufnahme mit höherer Vergrößerung von Zellen auf der Struktur L. Die Zellen wurden zusätzlich fixiert. Die Zellen können entweder auf den Stegen oder über die rautenförmigen Löcher wachsen. Nach der Fixierung bleiben einige fluoreszierende Zellrückstände auf der Struktur zurück (Kreise).<sup>104</sup>

Die Bildaufnahmen sind in der Abbildung 65 dargestellt. An der Struktur S mit der kleinen Stegbreite und den kleinen Löchern haften mehr lebende Zellen als an der Struktur L mit einer Stegbreite von 10 µm und den größeren Löchern (Abbildung 65 a und b). Mit etwas höherer Vergrößerung ist deutlich zu erkennen, dass die Zelle entlang der Stege sowie über

die rautenförmigen Löcher wachsen (Abbildung 65 c). Nach 24 Stunden war die Adhäsion der Zellen an den strukturierten NiTi-Filmen eher schwach ausgeprägt. Während der Reinigungsprozedur haben sich viele Zellen von den Strukturen gelöst, worauf auch einige Zellrückstände an den Strukturen hinweisen (Abbildung 65 c Kreise).

### 7 Tage CD133+ Zelladhäsion

Die Experimente zur Zelladhäsion von CD133+ Zellen mit einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurden von Dr. rer. nat. Jessica Haupt und M.Sc. Alexander Engel am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein am Lehrstuhl für Experimentelle Herzchirurgie und Herzklappenersatz durchgeführt.  $10^5$  CD133+ Zellen /  $\text{cm}^2$  wurden auf die freitragende NiTi-Probe gegeben. Die Proben waren ebenfalls auf dem PTFE Halter befestigt, um einen Zellkontakt mit der Petrischale während der Besiedlung zu vermeiden. Das Nährmedium in der Schale wurde alle drei Tage erneuert. Die Inkubationszeit betrug insgesamt 7 Tage bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ . Um die lebenden Zellen auf den strukturierten NiTi-Dünnschichten sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit Calcein-AM markiert. Die Standardprozedur ist bei Unger et al. beschrieben.<sup>105</sup> Nach weiteren 30 min im Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  wurde das Medium durch PBS ausgetauscht. Die präparierten Proben wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Leica TCS NT untersucht.

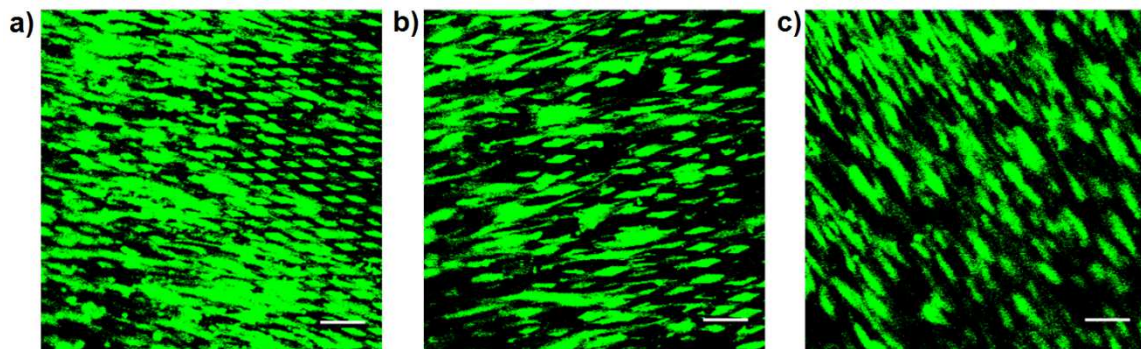


Abbildung 66: a) Vitale CD133+ Zellen auf Struktur S, b) Zellen auf Struktur M und c) Zellen auf Struktur L. Auf allen NiTi-Strukturen bildet sich nach 7 Tagen Inkubationszeit eine Lage lebender Zellen. Die Strukturen wurden von einer Seite besiedelt. Aufnahmen wurden von beiden Seiten der Probe gemacht und zeigen, dass die Zellen auf beiden Seiten aufwachsen und somit die Strukturen umschließen. Auf der Struktur S mit den kleineren Löchern sind deutlich mehr lebende Zellen zu sehen im Vergleich zu Struktur L.<sup>104</sup>

Abbildung 66 zeigt vitale Zellen auf den NiTi-Strukturen nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen. Die Zellen können auf allen drei Strukturen wachsen. Allerdings ist im Vergleich mit den Strukturen M und L bei der Struktur S eine dichtere Zelleschicht zu erkennen. Mit größer werdender Stegbreite und Lochgröße nimmt die Anzahl der Zellen ab. Obwohl die

Zellen nur von einer Seite besiedelt wurden sind im Fluoreszenzmikroskop von beiden Seiten Zellen zu sehen. Die Zellen bewachsen demnach beide Seiten der Probe und umschließen die strukturierten rautenförmigen NiTi-Dünnschichten.

Um weitere Informationen über die Zellbesiedlung zu gewinnen, wurden REM Bilder aufgenommen. Hierfür mussten die Proben erst gereinigt und getrocknet werden. Die Proben mit den Zellen wurden für 5 min in PBS gereinigt. Anschließend wurde eine Alkoholreihe mit steigender Alkoholkonzentration bis zu 99,9 % durchgeführt, um überschüssiges Wasser zu entfernen. Mit Kritisch-Punkt-Trocknung, beschrieben von Scherge et al., wurden die Proben anschließend getrocknet.<sup>106</sup> Eine gesputterte 10 nm dicke Schicht Au/Pd soll die Leitfähigkeit für eine bessere Aufnahme erhöhen. Die Bilder wurden mit einem Hitachi S-4800 aufgenommen.

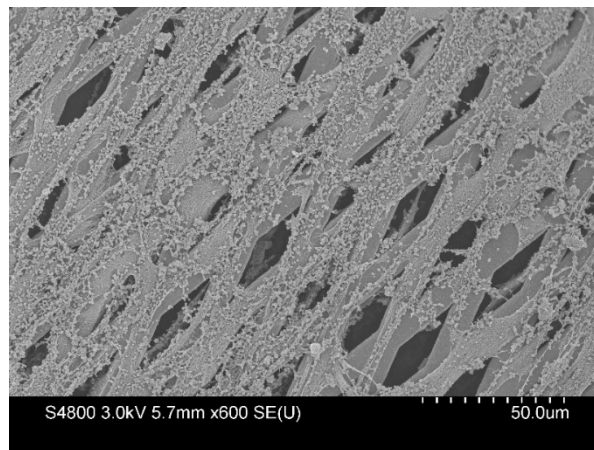


Abbildung 67: REM Aufnahme der NiTi-Struktur S nach einer Besiedlung mit CD133+ Zellen für 7 Tage. Die Fasern bedecken etwa 70 % der Oberfläche und wachsen hauptsächlich entlang der longitudinalen Richtung der Rauten.<sup>104</sup>

Abbildung 67 zeigt eine REM-Aufnahme einer NiTi-Struktur S nach einer Zellbesiedlung mit CD133+ Zellen für 7 Tage. Die Netzstruktur ist zu etwa 70 % mit Faser- und biologischem Material bedeckt. Die Fasern wachsen hauptsächlich in longitudinaler Richtung der rautenförmigen Mikrostruktur. Zusätzlich sind sie auch über die Löcher sowie durch die Löcher gewachsen und schließen so das NiTi-Dünnschicht Gerüst ein.

Insgesamt war die Zelladhäsion nach 7 Tagen stärker als die Adhäsion nach 24 Stunden. Ein konfluentes Wachstum der Zellen konnte auf der Struktur S beobachtet werden. Auf der Struktur M und der Struktur L war ein nahezu konfluentes Wachstum zu verzeichnen.



#### 4.4.2 Zellbesiedlung mit adulten Endothelzellen

Die NiTi-Netzstrukturen wurden von Dr. rer. nat. Jessica Haupt mit adulten Endothelzellen besiedelt, um eine mögliche Endothelialisierung der NiTi-Filme zu untersuchen. Dazu wurden auf die Proben  $10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> gegeben und für 7 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Zellmedium wurde alle drei Tage erneuert. Die Markierung für die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Die Proben für die Untersuchungen mit dem REM wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe 99,9% getrocknet. Bei diesen Proben wurde keine Kritisch-Punkt-Trocknung durchgeführt und auch keine leitende Au/Pd-Schicht gesputtert, da in weiteren Versuchen durch diesen Prozess Zellmaterial von der Probe entfernt wurde. Die Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen in Abbildung 68 zeigen vitale Zellen auf allen drei NiTi-Netzgrößen. Die kleineren Strukturen S und M sind etwas stärker besiedelt als die grobmaschigere Struktur L.

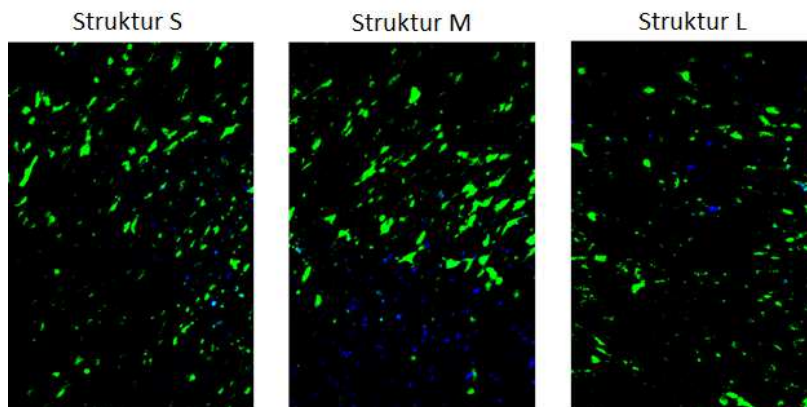


Abbildung 68: Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von strukturierten NiTi-Dünnschichten mit adulten Endothelzellen.

Die REM-Aufnahmen zeigen ebenfalls eine stärkere Bedeckung der Strukturen S und M (Abbildung 69). Bei allen drei Strukturen wachsen die Zellen auf den Stegen. Auf der Struktur S sowie der Struktur M füllen die Endothelzellen zu einem gewissen Grad die rautenförmigen Löcher. Insgesamt ist zu beobachten, dass eine Besiedelung der NiTi-Netzstrukturen mit adulten Endothelzellen nach 7 Tagen nicht zu einer stark konfluenten Zellschicht führt. Durch ein Fehlen der leitenden Au/Pd-Schicht sind die Kollagenfasern nicht mehr sichtbar.



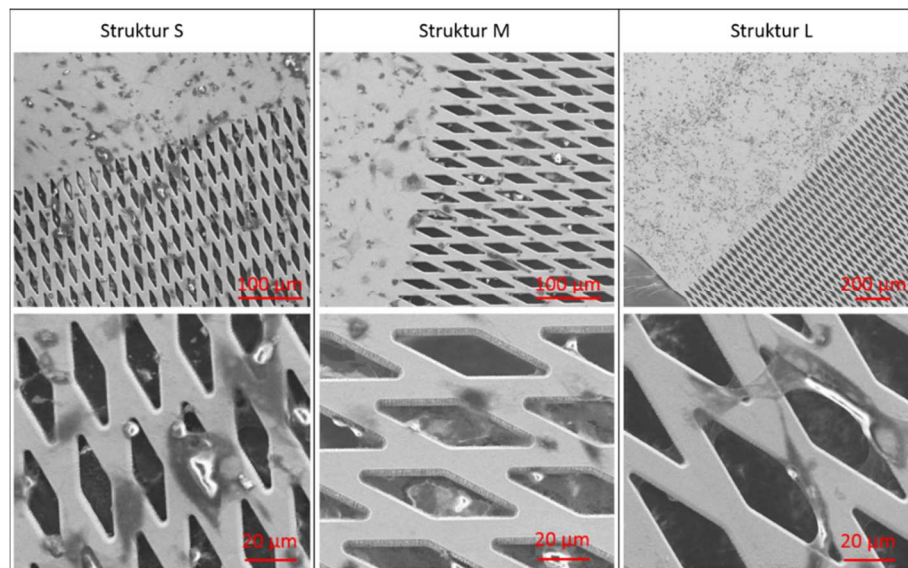


Abbildung 69: REM Aufnahme von strukturierten NiTi-Dünnschichten nach der Besiedelung mit adulten Endothelzellen. Struktur S zeigt die stärkste Bedeckung. Die Zellen wachsen auf den Stegen, füllen aber auch die Löcher aus. Mit zunehmender Strukturgröße nimmt die Bedeckung ab.

#### 4.4.3 Zellbesiedlung mit glatten Muskelzellen

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die NiTi-Netzstrukturen von Dr. rer. nat. Jessica Haupt mit glatten Muskelzellen (GMZ) mit einer Konzentration von  $10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> für 7 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Prozess zur Markierung für die Fluoreszenzmikroskopie und die Vorbereitung für die REM-Aufnahmen verliefen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

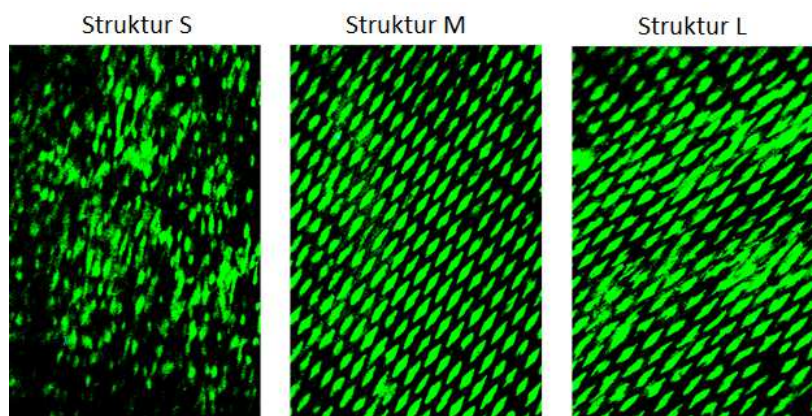


Abbildung 70: Fluoreszenzmikroskopie GMZ besiedelter NiTi-Netzstrukturen. Struktur M und L zeigen eine stärkere Bedeckung mit Zellen als Struktur S. Zudem sind die rautenförmigen Löcher der Struktur M und L nahezu vollständig mit lebenden GMZ ausgefüllt.

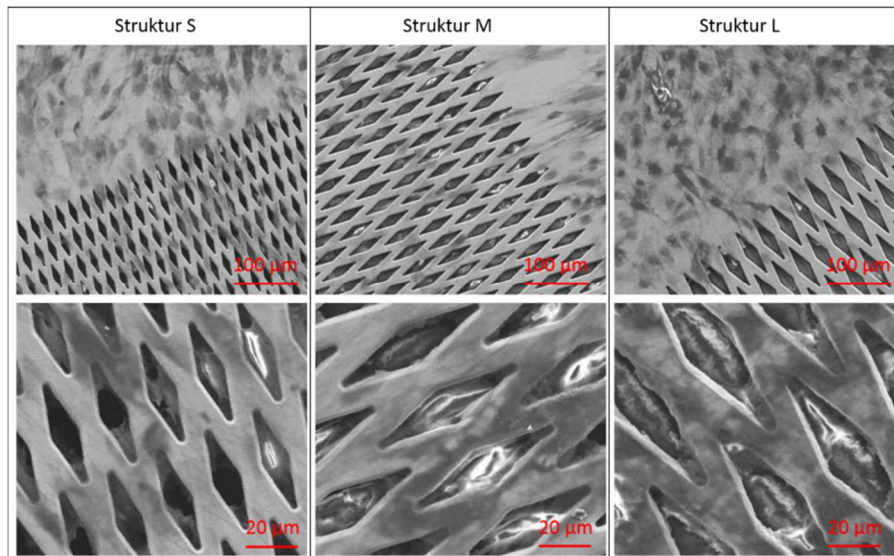


Abbildung 71: REM von besiedelten Strukturen mit GMZ. Die unterschiedlichen Strukturgrößen sind stark bewachsen. Die Zellen wachsen auf den Stegen und in den rautenförmigen Löchern.

Die Aufnahmen mit Fluoreszenzmikroskopie zeigen eine starke Bedeckung aller Strukturen mit vitalen glatten Muskelzellen (Abbildung 70). Weiterhin scheinen die rautenförmigen Löcher der Struktur M und L nahezu vollständig mit Zellen ausgefüllt zu sein. Die REM-Aufnahmen zeigen ebenfalls ein nahezu konfluentes Wachstum der Zellen auf den Strukturen M und L (Abbildung 71). Die Zellen legen sich in longitudinaler Richtung in die Rauten und auch die Stege sind annähernd vollständig mit Zellmaterial bedeckt. Die Löcher der Struktur S sind hingegen kaum geschlossen. Die Zellen wachsen hier hauptsächlich auf den Stegen. Insgesamt zeigt die Besiedelung mit glatten Muskelzellen nach 7 Tagen den höchsten Grad an Bedeckung mit Zellmaterial im Vergleich mit den Experimenten mit CD133+ und adulten Endothelzellen. Zudem scheinen durch den Reinigungsprozess keine Zellen entfernt zu werden, was auf eine stärkere Anhaftung der Zellen auf den NiTi-Strukturen deutet.

### 4.5 Zellbesiedlung strukturierter NiTi-Dünnschicht-Klappen

Um die Funktionalität der strukturierten Herzklappensegel während der Diastole zu erhöhen bzw. zu gewährleisten werden strukturierte Herzklappensegel mit GMZ besiedelt. Die Zellen und das biologische Material sollen die rautenförmigen Löcher schließen und das Rückflussvolumen durch die geschlossene Klappe minimieren. Eine dünne Monoschicht an Gewebe resultierend aus der Besiedelung der Klappenstruktur mit GMZ

führt wie in den vorherigen Experimenten dazu, dass die Löcher der Struktur geschlossen sind. Für die Tests wurden strukturierte Klappen mit dem Design D20H14 Netz L verwendet (Abbildung 58).

### Zellbesiedlung

Da in den vorausgegangenen Experimente die Adhäsion mit den glatten Muskelzellen die besten Ergebnisse zeigten, bezüglich der Konfluenz der Zellen und der Adhäsion (gute Bedeckung der NiTi-Strukturen und kaum Zellen, die während der Reinigungsprozedur fortgeschwemmt wurden) wurden für die Besiedlung der strukturierten Segel für hydrodynamische Tests glatte Muskelzellen gewählt. Die Besiedelung wurde von Dr. rer. nat. Jessica Haupt durchgeführt. Um die geformten und strukturierten NiTi-Segel mit glatten Muskelzellen zu besiedeln, wurden  $10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellsuspension auf die Segel gegeben. Anschließend wurden die Segel statisch bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 7 Tage inkubiert. Das Zellmedium wurde alle drei Tage erneuert. Anschließend wurden die Zellen auf den strukturierten Klappensegeln fixiert und in 4% Formaldehydlösung aufbewahrt. Die Abbildung 72 zeigt die REM-Bilder der strukturierten NiTi Filme. Der Vergleich lässt ein starkes konfluentes Zellwachstum nach sieben Tagen Inkubationszeit erkennen. Die NiTi-Struktur ist mit einer Monolage von Zellen und biologischen Fasern bedeckt. Die besiedelten Klappensegel wurden hydrodynamischen Tests unterzogen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

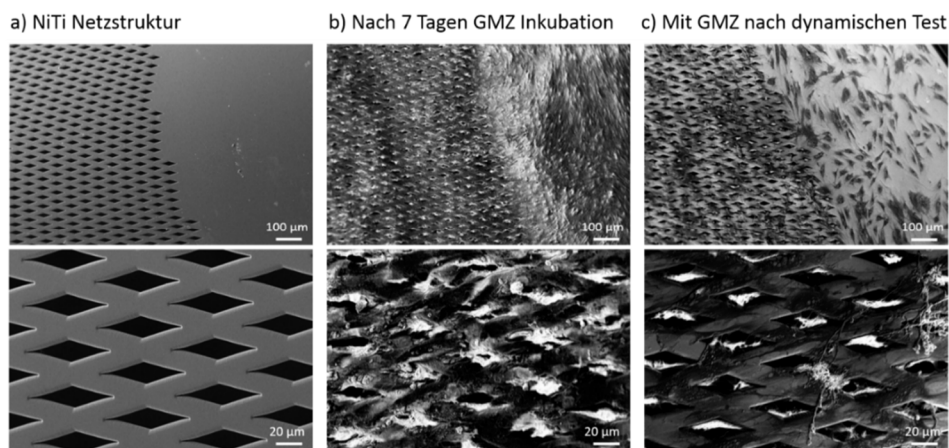


Abbildung 72: Strukturierte Herzklappensegel der Struktur L a) ohne Zellen, b) mit glatten Muskelzellen nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen, c) mit glatten Muskelzellen nach den hydrodynamischen Tests. Nach den hydrodynamischen Tests ist ein Teil des Zellmaterials und der Fasern abgespült, die Löcher sind aber noch zu einem großen Teil geschlossen.<sup>107</sup>

Nach den Tests zeigte sich deutlich weniger Zellen und Fasern auf der NiTi-Dünnschicht Struktur waren. Die REM-Bilder suggerieren jedoch, dass die Löcher nach den Tests zu einem großen Teil geschlossen waren (Abbildung 72c).

#### 4.5.1 Systolische Druckdifferenzen

Die mittleren systolischen transvalvulären Druckdifferenzen der strukturierten Herzklappensegel mit und ohne Zellen sind im Vergleich zu einer Vollmaterial-Klappe und der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenz in der Abbildung 73 dargestellt. Die NiTi-Klappensegel haben eine deutlich geringere Druckdifferenz verglichen mit der Carpentier-Edwards-S.A.V. (9,5 mmHg bei 40 min<sup>-1</sup> bis 25,5 mmHg bei 75 min<sup>-1</sup>). Die kleinsten systolischen Druckdifferenzen erreichen die strukturierten Klappensegel mit und ohne Zellen (1,7 mmHg bei 40 min<sup>-1</sup> bis 4,4 mmHg bei 75 min<sup>-1</sup>), wobei kein Unterschied zwischen der Klappe mit und der Klappe ohne Zellen zu verzeichnen ist. Die Werte der Vollmaterial-Segel liegen etwas höher als die systolischen Druckdifferenzen der strukturierten Segel (3,5 mmHg bis 4,7 mmHg).

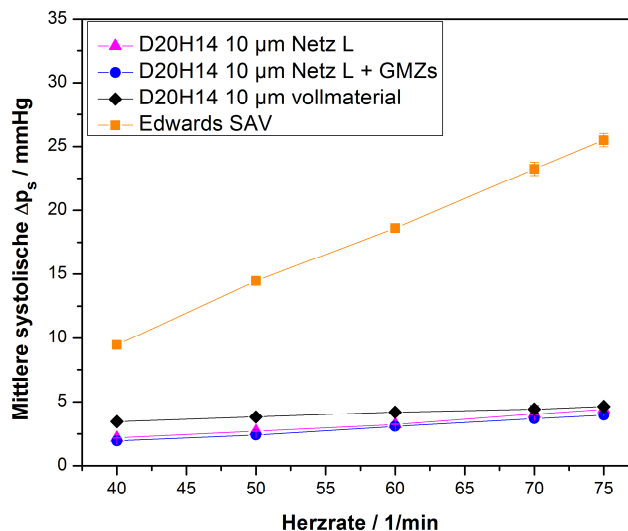


Abbildung 73: Mittlere systolische Druckdifferenzen der Herzklappensegel in Abhängigkeit der Herzrate. Die systolische Druckdifferenz ist um für alle NiTi-Klappensegel deutlich geringer, verglichen mit der Carpentier-Edwards-S.A.V. Die Druckdifferenzen bleiben bei steigender Herzrate nahezu konstant.<sup>107</sup>

#### 4.5.2 Performance Index und Öffnungsfläche

Abbildung 74 zeigt die relative Öffnungsfläche in Abhängigkeit von der Herzrate. Die größte relative Öffnungsfläche erreichen die strukturierten Herzklappensegel mit Zellen sowie ohne Zellen mit 60 % bis 73 %. Die unstrukturierten NiTi-Segel haben eine Öffnungsfläche von 40 % bis 60 %. Die Carpentier-Edwards-S.A.V.-Klappe weist nur eine Öffnungsfläche von 32 % auf. In einer weiteren Studie von Haaf et al. wurde mit einem experimentellen Aufbau die Öffnungsfläche einer humanen Aortenklappe von 56 % ermittelt. Weitere bioprothetische Klappen haben Öffnungsflächen von 42 % und 44 %.<sup>108</sup> Die Öffnungs- und Schließphase der Klappen ist in der Abbildung 75 vergleichend dargestellt. Die Sequenz zeigt die komplett geschlossenen Segel zu Beginn des Zyklus. Mit dem Start der Systole öffnen die Klappensegel gleichmäßig (b1-b4), bis sie ihre maximale Öffnungsfläche erreichen (c1-c4). Bei den strukturierten Klappensegeln mit und ohne Zellen öffnen jeweils alle drei Klappensegel gleichmäßig und erreichen eine große maximale Öffnungsfläche. Im Vergleich dazu öffnen bei den Vollmaterial-Segeln nur zwei hinreichend, während eins der Klappensegel nur eine leichte Öffnungsbewegung aufweist und nahezu im geschlossenen Zustand verharrt. Während der Schließphase, zu Beginn der Diastole (d1-d4) zeigen die strukturierten Klappensegel eine gleichmäßige Schließbewegung, bis die Klappe komplett geschlossen ist.

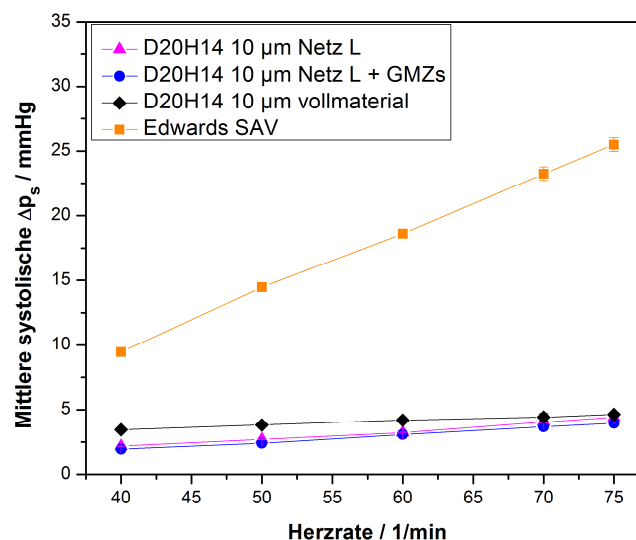


Abbildung 74: Performance Index oder relative Öffnungsfläche der Herzklappenmodelle mit strukturierten Segeln mit sowie ohne Zellen, Vollmaterial und ein Vergleich zu Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenzklappe.<sup>107</sup>

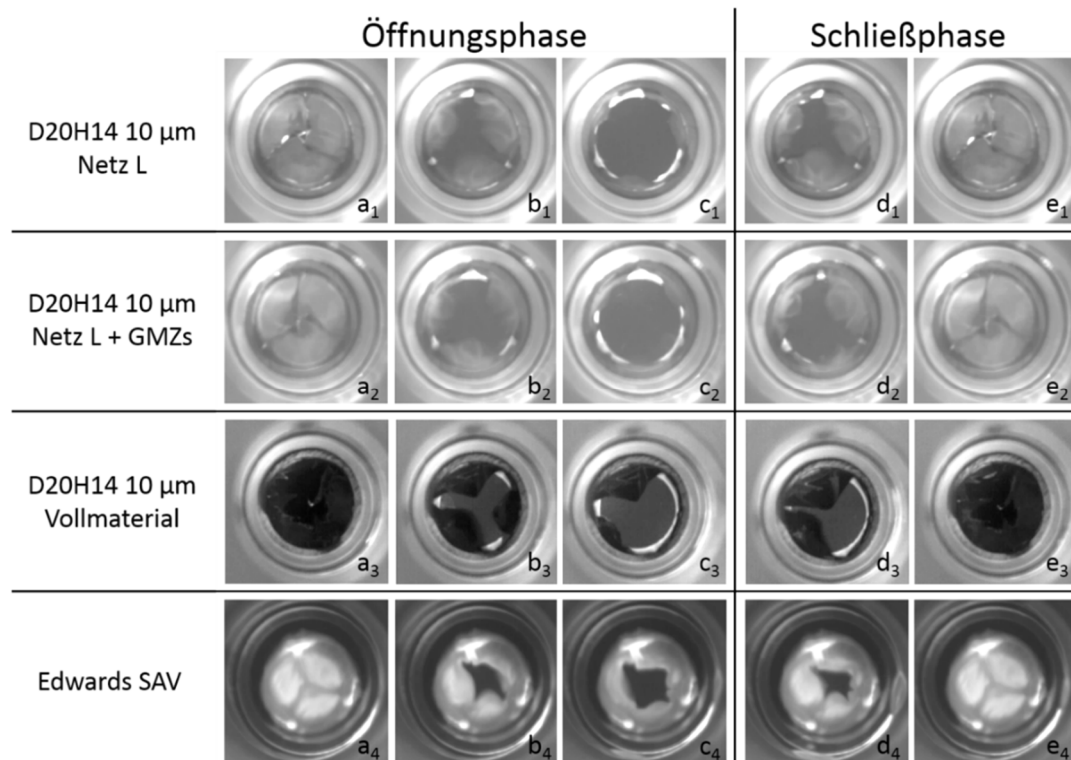


Abbildung 75: Öffnungs- und Schließphase der Herzklappensegel bei einer Herzrate von  $70 \text{ min}^{-1}$ .  $a_1$ - $a_4$  zeigt die komplett geschlossenen Klappen.  $b_1$  –  $b_4$  die gleichmäßige Öffnung der Segel zu Beginn der Systole,  $c_1$  –  $c_4$  die maximale Öffnungsfläche.  $d_1$  -  $d_4$  die Schließung der Segel zu Beginn der Diastole und  $e_1$  –  $e_4$  die komplett geschlossenen Segel.<sup>107</sup>

#### 4.5.3 Diastolische Druckdifferenzen

Die transvalvulären Druckdifferenzen während der Diastole in Abhängigkeit von der Herzrate sind in der Abbildung 76 dargestellt. Durch die Besiedelung der Klappensegel mit GMZ sind die rautenförmigen Löcher der strukturierten Klappensegel zu einem großen Teil geschlossen. Mit mittleren diastolischen Druckdifferenzen von  $14,9 \text{ mmHg}$  bei  $40 \text{ min}^{-1}$  bis  $50,8 \text{ mmHg}$  bei  $75 \text{ min}^{-1}$  liegt die diastolische Druckdifferenz deutlich höher im Vergleich mit den unbesiedelten Klappensegeln ( $9,1 \text{ mmHg}$  –  $27,4 \text{ mmHg}$ ). Mit Werten von  $17,5 \text{ mmHg}$  bis  $58,3 \text{ mmHg}$  erhalten die Vollmaterial-Segel sowie die Carpentier-Edwards-S.A.V. jedoch etwas größere diastolische Druckdifferenzen aufrecht.



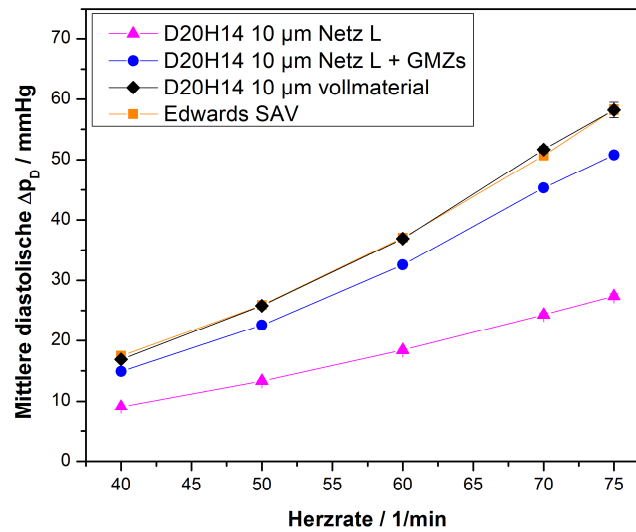


Abbildung 76: Mittlere diastolische transvalvuläre Druckdifferenzen in Abhängigkeit der Herzrate. Durch die Besiedelung der strukturierten Klappensegel kann die mittlere Druckdifferenz nahezu verdoppelt werden. Sie erreicht jedoch noch nicht die Werte der vollmaterial Segel oder der Carpentier-Edwards-S.A.V.-Referenz.<sup>107</sup>

Die REM-Aufnahmen in der Abbildung 72 zeigen nach dem Testen deutlich weniger Zellen und biologische Fasern auf der besiedelten Klappe. Die Aufnahmen suggerieren aber auch, dass die Löcher zu einem großen Teil auch nach 200 hydrodynamischen Pumpzyklen geschlossen sind. Das wird ebenso durch die Auswertung der diastolischen Druckdifferenz bestätigt.

In der Abbildung 77a sind die zeitlichen Verläufe der transvalvulären Druckdifferenzen während eines Zyklus dargestellt. Die Druckverläufe des ersten Zyklus und der Druckverlauf nach mehr als 200 Zyklen sind nahezu identisch. Die mittlere transvalvuläre diastolische Druckdifferenz nimmt auch nach mehr als 200 Zyklen nicht ab und ist immer noch um einen Faktor 2 größer als die mittlere Druckdifferenz der unbesiedelten Klappe (Abbildung 77b). Da die Druckdifferenz nach mehr als 200 Zyklen nicht abnimmt und die besiedelten NiTi-Klappensegel scheinbar immer noch die gleiche Dichtigkeit aufweisen wie zu Beginn der hydrodynamischen Tests, ist davon auszugehen, dass das schwach anhaftende Gewebe gleich zu Beginn der dynamischen Tests von der Probe abgelöst wird. Die zurückbleibenden, stärker anhaftenden Zellen sind jedoch ausreichend, um die Löcher zu einem großen Teil zu schließen. Dadurch wird eine größere Druckdifferenz während der Diastole über mehr als 200 dynamische Zyklen aufrechterhalten.

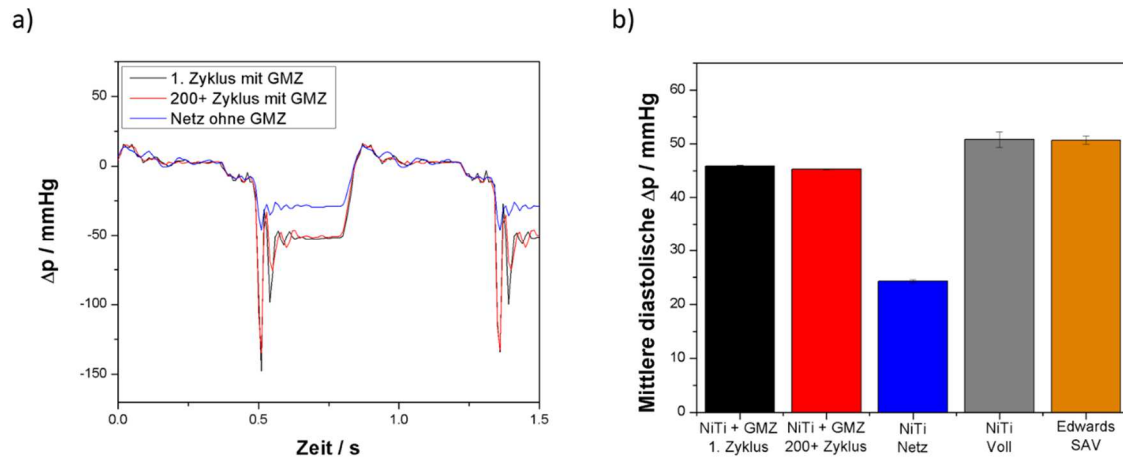


Abbildung 77: a) Transvalvuläre Druckdifferenz über die Klappen während des gesamten Zyklus mit Systole und Diastole bei einer Herzrate von  $70 \text{ min}^{-1}$ . Der zeitliche Druckverlauf des ersten Zyklus und nach mehr als 200 Öffnungs- und Schließvorgängen zeigt nur minimale Abweichungen. c) Die mittlere diastolische Druckdifferenz der besiedelten Klappe nimmt nach mehr als 200 Zyklen nicht ab und ist immer noch um den Faktor zwei größer als die Druckdifferenz einer unbesiedelten Klappe.<sup>107</sup>



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein Prozess zur Herstellung von NiTi-Dünnschicht Herzklappensegeln mittels Magnetronspalter-Abscheidung, Lithographie, nasschemischen Ätzens und eines 3D-Formprozesses beschrieben. Zugtests und DSC-Messungen zeigen, dass die NiTi-Dünnschichten unter Raumtemperatur bzw. bei 37°C Körpertemperatur superelastisch sind und somit eine für Transkatheter implantierte Prothesen erforderliche hohe Elastizität aufweisen.

Unterschiedliche Herzklappensegel aus NiTi-Dünnschicht Material wurden *in vitro* unter herzförmigen hydrodynamischen Bedingungen getestet. Eine geeignete NiTi-Film Schichtdicke von 10 – 15 µm wurde für die Herzklappensegel in ersten Versuchen ermittelt. Eine Koaptationsfläche zweier benachbarter Segel erhöht zwar leicht die Dichtigkeit und verringert das statische Rückflussvolumen, verschlechtert aber die systolischen und diastolischen Eigenschaften der Segel.

Vollmaterial-NiTi-Dünnschichtklappen mit 20 mm Durchmesser zeigten ein gutes Schließverhalten im hydrodynamischen Herzklappentester. Die Klappen mit 10 µm und 15 µm Schichtdicke schließen komplett und halten während der Diastole eine ausreichende Druckdifferenz aufrecht. Die Öffnungsflächen während der Systole sind genügend groß. Allerdings haben die Segel eine gewisse Steifigkeit, so dass kein gleichmäßiges Öffnen beobachtet wurde und in den meisten Fällen eines der drei Segel nur teilweise öffnet. Mit zunehmender Schichtdicke verringert sich die Öffnungsfläche.

Durch mikrostrukturierte NiTi-Herzklappensegel mit rautenförmigen Löchern konnte eine größere Flexibilität der Segel und damit eine viel größere Öffnungsfläche erreicht werden. Um die Dichtigkeit dieser Segel zu erhöhen, bedarf es allerdings einer Besiedelung mit biologischen Material. Ein vielversprechender Ansatz ist der Bereich des Tissue Engineering mit einem stabilen Gerüst aus NiTi-Dünnschicht und einer zusätzlichen biologischen Schicht aus Gewebe. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellbesiedelung mit CD133+ Vorläuferzellen, adulten Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach jeweils sieben Tagen zu einer guten Bedeckung der NiTi-Dünnschichtstruktur führt. Besonders die glatten Muskelzellen wachsen auf den Strukturen und in den rautenförmigen Löchern und verschließen diese. Die Dichtigkeit der Klappensegel im hydrodynamischen Experiment

konnte durch die Besiedelung mit Zellen deutlich erhöht werden und die Segel erreichen fast die Druckdifferenzen der etablierten Referenzklappe. Eine längere Besiedelung mit glatten Muskelzellen und eine zusätzliche Besiedelung mit Endothelzellen können zu sehr dünnen, stabilen und funktionellen Herzklappensegeln führen. Verglichen mit den etablierten Referenzklappen zeigten die NiTi-Segel insgesamt vergleichbare Werte bezüglich ihres Öffnungs- und Schließverhaltens.

Es lässt sich festhalten, dass von den 10 von Harken aufgestellten Kriterien für Herzklappenprothesen nach den *in vitro* Versuchen die folgenden erfüllt werden (Kapitel 2.1.3).<sup>22,23</sup> Die Klappensegel bilden einen sehr geringen Widerstand gegen den physiologischen Fluss und haben einen geringeren Öffnungsdruck als die verwendete Referenzklappe. Zudem schließen die Segel schnell und komplett, bleiben während der entsprechenden Phase geschlossen und halten eine ausreichende Druckdifferenz aufrecht. Eine Transkatheter-Herzklappenprothese mit NiTi-Dünnschichtsegeln wäre an der geeigneten Position implantierbar. Eine mögliche Störung für Patienten, z. B. durch Geräusche, konnte während der hydrodynamischen Experimente nicht festgestellt werden. Eine zufriedenstellende Heilung des Gewebes zwischen Implantat und Patienten ist zu erwarten, da NiTi-Herzklappenstents schon seit einigen Jahren erfolgreich verwendet werden. Durch etablierte Transkatheter-Verfahren sind die Prothesen einfach implantierbar und die verwendeten NiTi-Stents sorgen für eine ausreichende Fixierung.

Trotz der guten Ergebnisse in dieser Arbeit ist es bis zur Anwendung von NiTi-Dünnschicht für Herzklappenimplantate noch ein weiter Weg. Eine Verbesserung der Haltbarkeit muss für die Verwendung der NiTi-Herzklappensegel als Aortenklappenersatz erreicht werden. Hier könnte schon eine Verbesserung des Designs ausschlaggebend sein, da die gesputterten NiTi-Dünnschichtfilme eine gute Stabilität aufweisen. Die Langzeitmessungen unter geringem Druck zeigen aber, dass zumindest eine Verwendung im Bereich des Pulmonalklappenersatzes möglich ist, bei dem weitaus geringere Druckdifferenzen vorherrschen als bei der Aortenklappe.

Ein nächster zu untersuchender Punkt wäre die Verbindung von NiTi-Dünnschichtsegel und Stent. Möglichkeiten hierfür bieten das Laserschweißen oder ein Vernähen.

In weiteren Schritten müssen die *in vivo* Eigenschaften in Tierversuchen charakterisiert werden. Nach Harken entsprechen diese Punkte den Untersuchungen nach einer möglichen Embolie sowie der Schädigung von Blutzellen.

Auch wenn noch weitere Untersuchungen bis zur endgültigen Verwendung NiTi Dünnschichtherzklappensegeln ausstehen, konnte in dieser Arbeit das Potential von

gesputterten NiTi-Dünnschichten als Material für Herzklappensegel, insbesondere für den Bereich des Tissue Engineering, gezeigt werden.

## 6 Publikationen

An folgenden Publikationen war ich beteiligt. Die Ergebnisse der Veröffentlichungen sind zu einem großen Teil in diese Arbeit eingegangen:

1. Klaas Loger, Rodrigo Lima de Miranda, Alexander Engel, Martin Marczynski-Bühlow, Georg Lutter, Eckhard Quandt, Fabrication and Evaluation of Nitinol Thin Film Heart Valves, *Cardiovascular Engineering and Technology*, Volume 5, Issue 4, pp 308-316, 2014
2. Klaas Loger, Alexander Engel, Jessica Haupt, Rodrigo Lima de Miranda, Georg Lutter, Eckhard Quandt, Microstructured Nickel-Titanium Thin Film Leaflets for Hybrid Tissue Engineered Heart Valves Fabricated by Magnetron Sputter Deposition, *Cardiovascular Engineering and Technology*, Volume 7, Issue 1, pp 69-77, 2016
3. Klaas Loger, Alexander Engel, Jessica Haupt, Qian Li, Rodrigo Lima de Miranda, Eckhard Quandt, Georg Lutter, Christine Selhuber-Unkel, Cell adhesion on NiTi thin film sputter-deposited meshes, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*,59:611-6, 2016

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Nkomo, V. T.; Gardin, J. M.; Skelton, T. N.; Gottdiener, J. S.; Scott, C. G.; Enriquez-Sarano, M. Burden of Valvular Heart Diseases: A Population-Based Study. *Lancet* **2006**, *368* (9540), 1005–1011.
- (2) Ross, J.; Braunwald, E. Aortic Stenosis. *Circulation* **1968**, *38*, 61–67.
- (3) Bach, D. S.; Siao, D.; Girard, S. E.; Duvernoy, C.; McCallister, B. D.; Gualano, S. K. Evaluation of Patients with Severe Symptomatic Aortic Stenosis Who Do Not Undergo Aortic Valve Replacement: The Potential Role of Subjectively Overestimated Operative Risk. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* **2009**, *2* (6), 533–539.
- (4) Fanning, J. P.; Platts, D. G.; Walters, D. L.; Fraser, J. F. Transcatheter Aortic Valve Implantation (TAVI): Valve Design and Evolution. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *168* (3), 1822–1831.
- (5) Cribier, A. Percutaneous Transcatheter Implantation of an Aortic Valve Prosthesis for Calcific Aortic Stenosis: First Human Case Description. *Circulation* **2002**, *106* (24), 3006–3008.
- (6) Eggebrecht, H.; Mehta, R. H. Transcatheter Aortic Valve Implantation (TAVI) in Germany 2008-2014: On Its Way to Standard Therapy for Aortic Valve Stenosis in the Elderly? *EuroIntervention* **2016**, *11* (9), 1029–1033.
- (7) Kiefer, P.; Gruenwald, F.; Kempfert, J.; Aupperle, H.; Seeburger, J.; Mohr, F. W.; Walther, T. Crimping May Affect the Durability of Transcatheter Valves: An Experimental Analysis. *Ann. Thorac. Surg.* **2011**, *92* (1), 155–160.
- (8) Steffel, J.; Lüscher, T. F. *Herz-Kreislauf*; Springer-Verlag: Heidelberg, 2011.
- (9) Betz, E. *Herz Und Blutkreislauf*; Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft: Heidelberg, 1991.
- (10) Scherf, D.; Boyd, L. *Klinik Und Therapie Der Herzkrankheiten Und Der Gefäßkrankungen*; Springer Vienna, 1955.
- (11) Rüdiger, H.-H. *Das Menschliche Herz, Topographische Tafel*; mit freundlicher Genehmigung der Firma Rüdiger-Anatomie-Gesellschaft mbH, Leipziger Str. 60, 14612 Falkensee/www.berlin-anatomie.de, 1990.
- (12) Jana, S.; Tefft, B. J.; Spoon, D. B.; Simari, R. D. Scaffolds for Tissue Engineering

- of Cardiac Valves. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (7), 2877–2893.
- (13) Bellhouse, B. J. Velocity and Pressure Distributions in the Aortic Valve. *J. Fluid Mech.* **1969**, *37*, 587–600.
- (14) Yoganathan, A. P.; He, Z.; Casey Jones, S. Fluid Mechanics of Heart Valves. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2004**, *6*, 331–362.
- (15) Steiner, M. Beurteilung von Biologischen Und Mechanischen Herzklappenprothesen Anhand Zeitaufgelöster Verfahren, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, 2005.
- (16) Hufnagel, C.; Harvey, W.; Rabil, P.; McDermott, T. Surgical Correction of Aortic Insufficiency. *Surgery* **1952**, *35*, 673–683.
- (17) Bloomfield, P. Choice of Heart Valve Prosthesis. *Heart* **2002**, *87*, 583–589.
- (18) Landay, M.; Estrera, S.; Bordlee, R. Cardiac Valve Reconstruction and Replacement: A Brief Review. *RadioGraphics* **1992**, *12* (4), 659–671.
- (19) Harris, C.; Croce, B.; Cao, C. Tissue and Mechanical Heart Valves. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **2015**, *4* (4), 399.
- (20) Roudaut, R.; Serri, K.; Lafitte, S. Thrombosis of Prosthetic Heart Valves: Diagnosis and Therapeutic Considerations. *Heart* **2007**, *93*, 137–142.
- (21) Shapira, Y.; Vaturi, M.; Sagie, A. Hemolysis Associated With Prosthetic Heart Valves. *Cardiol. Rev.* **2009**, *17* (3), 121–124.
- (22) Harken, D. E.; Taylor, W. J.; Lefemine, a a; Lunzer, S.; Low, H. B.; Cohen, M. L.; Jacobey, J. a. Aortic Valve Replacement with a Caged Ball Valve. *Am. J. Cardiol.* **1962**, *9*, 292–299.
- (23) Schoen, F. J.; Levy, R. J. Tissue Heart Valves: Current Challenges and Future Research Perspectives. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *47*, 439–465.
- (24) Gott, V. L.; Alejo, D. E.; Cameron, D. E. Mechanical Heart Valves: 50 Years of Evolution. *Ann Thorac Surg* **2003**, *76*, 2230–2239.
- (25) Ratner, B. D. *Biomaterials Science*, 2nd ed.; Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E., Eds.; Elsevier: London, 2004.
- (26) Schoen, F. J.; Silver, M. D.; Gotlieb, A. I. *Cardiovascular Pathology: Pathology of Heart Valve Substitution with Mechanical and Tissue Prostheses*, 3rd ed.; Churchill Livingstone: New York, 2001.
- (27) Phillips, S. Selecting the Best Heart Valve for Your Patient: Mechanical or Tissue. *Am Hear. Hosp J* **2004**, *2* (3), 149–152.
- (28) Ross, D. Homograft Replacement of the Aortic Valve. *Lancet* **1962**, *280* (7254), 487.

- (29) Barratt-Boyes, G. G. Homograft Aortic Valve Replacement in Aortic Incompetence and Stenosis. *Thorax* **1964**, *19*, 131–150.
- (30) Starr, A.; Lefrac, E. *Cardiac Valve Prostheses*; Appleton-Century-Crofts: New York, 1979.
- (31) Vongpatanasin, W.; Hillis, D.; Lange, R. Prosthetic Heart Valves. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 407–416.
- (32) Butany, J.; Khan, N. A.; Erlich, S. A.; Al., E. Prosthetic Heart Valves, Part II: Clinical Management. *Geriatr. Aging* **2007**, *10*, 28–35.
- (33) Manji, R.; Zhu, L. F.; Nijjar, N. K.; Al., E. Gluteraldehyde-Fixed Biopros- Thetic Heart Valve Conduits Calcify and Fail from Xenograft Rejection. *Circulation* **2006**, *114*, 318–327.
- (34) Butany, J.; Soor, G.; Chakrabarti, M.; Al., E. Prosthetic Heart Valves, Part 1: Identification and Potential Complications. *Geriatr. Aging* **2006**, *10*, 691–696.
- (35) Stepan, L. L. Development and Testing of a Thin Film Nitinol Heart Valve, University of California, 2007.
- (36) Siddiqui, R. F.; Abraham, J. R.; Butany, J. Bioprosthetic Heart Valves: Modes of Failure. *Histopathology* **2009**, *55* (2), 135–144.
- (37) Milano, A.; Guglielmi, C.; De Carlo, M.; Di Gregorio, O.; Borzoni, G.; Verunelli, F.; Bortolotti, U. Valve-Related Complications in Elderly Patients with Biological and Mechanical Aortic Valves. *Ann Thorac Surg* **1998**, *66* (6), 82–87.
- (38) Iung, B.; Cachier, A.; Baron, G.; Messika-Zeitoun, D.; Delahaye, F.; Tornos, P.; Gohlke-Bärwolf, C.; Boersma, E.; Ravaud, P.; Vahanian, A. Decision-Making in Elderly Patients with Severe Aortic Stenosis: Why Are so Many Denied Surgery? *Eur. Heart J.* **2005**, *26*, 2714–2720.
- (39) Bonhoeffer, P.; Boudjemline, Y.; Qureshi, S. a; Le Bidois, J.; Iserin, L.; Acar, P.; Merckx, J.; Kachaner, J.; Sidi, D. Percutaneous Insertion of the Pulmonary Valve. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, *39* (10), 1664–1669.
- (40) Javaid Iqbal, J.; Serruys, P. Comparison of Medtronic CoreValve and Edwards Sapien XT for Transcatheter Aortic Valve Implantation. *JACC Cardiovasc. Interv.* **2014**, *7* (3), 293–295.
- (41) Mauck, R.; Burdick, J. *Biomaterials for Tissue Engineering Applications*; Springer-Verlag: Wien, 2011.
- (42) Hinderer, S.; Seifert, J.; Votteler, M.; Shen, N.; Rheinlaender, J.; Schäffer, T. E.; Schenke-Layland, K. Engineering of a Bio-Functionalized Hybrid off-the-Shelf

- Heart Valve. *Biomaterials* **2014**, 35 (7), 2130–2139.
- (43) Stepan, L. L.; Levi, D. S.; Carman, G. P. A Thin Film Nitinol Heart Valve. *J. Biomech. Eng.* **2005**, 127, 915–918.
- (44) Alavi, S. H.; Kheradvar, A. A Hybrid Tissue-Engineered Heart Valve. *Ann. Thorac. Surg.* **2015**, 99 (6), 2183–2187.
- (45) Alavi, S. H.; Liu, W. F.; Kheradvar, A. Inflammatory Response Assessment of a Hybrid Tissue-Engineered Heart Valve Leaflet. *Ann. Biomed. Eng.* **2013**, 41 (2), 316–326.
- (46) Alavi, S. H.; Sc, M.; Kheradvar, A.; Ph, D. Metal Mesh Scaffold for Tissue Engineering of Membranes. *Tissue Eng. Part C* **2012**, 18 (4), 293–301.
- (47) Levi, D. S.; Kusnezov, N.; Carman, G. P. Smart Materials Applications for Pediatric Cardiovascular Devices. *Pediatr. Res.* **2008**, 63 (5), 552–558.
- (48) Kurdjumov, G. V.; Khandros, L. G. Dokl Nauk SSSR. **1949**, 66, 211.
- (49) Miyazaki, S. *Thin Film Shape Memory Alloys*; Miyazaki, S., Fu, Y. Q., Huang, W. M., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, 2009.
- (50) Firstov, G.S., Van Humbeeck, J., Koval, Y. N. High Temperature Shape Memory Alloys Problems and Prospects. *J. Intell. Mater. Syst. Struct.* **2006**, 17, 1041–1047.
- (51) Stoeckel, D. The Shape Memory Effect - Phenomenon, Alloys and Applications. *Proc. Shape Mem. Alloy. Power Syst. EPRI* **1995**, 1–13.
- (52) Duerig, T. W.; Melton, K. N.; Stöckel, D.; Wayman, C. M. *Engineering Aspects of Shape Memory Alloys*; Butterworth-Heinemann: London, 1990.
- (53) Guenin, G. Martensitic Transformation: Phenomenology and the Origin of the Twoway Memory Effect. *Phase Transitions*, **1988**, 14, 165–175.
- (54) Shabalovskaya, S. A. Surface, Corrosion and Biocompatibility Aspects of Nitinol as an Implant Material. *Biomed. Mater. Eng.* **2002**, 12, 69–109.
- (55) Melzer, A.; Stoeckel, D. Function and Performance of Nitinol Vascular Implants. *Open Med. Devices J.* **2010**, 2 (2), 32–41.
- (56) Song, C. History and Current Situation of Shape Memory Alloys Devices for Minimally Invasive Surgery. *Open Med. Devices J.* **2010**, 2 (2), 24–31.
- (57) Schneevoigt, R.; Haase, A.; Eckardt, V. L.; Harzer, W.; Bourauel, C. Laboratory Analysis of Superelastic NiTi Compression Springs. *Med. Eng. Phys.* **1999**, 21 (2), 119–125.
- (58) Duerig, T.; Pelton, a; Stöckel, D. An Overview of Nitinol Medical Applications. *Mater. Sci. Eng. A* **1999**, 273–275, 149–160.



- (59) Trepanier, C.; Tabrizian, M.; Yahia, L.; Bilodeau, L.; Piron, D. L. Effect of Modification of Oxide Layer on NiTi Stent Corrosion Resistance. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *43* (4), 433–440.
- (60) Trépanier, C.; Leung, T.; Tabrizian, M.; Yahia, L.; Bienvenu, J.; Tanguay, J.; Piron, D.; Bilodeau, L. Preliminary Investigation of the Effects of Surface Treatments on Biological Response to Shape Memory NiTi Stents. *J Biomed Mater Res* **1999**, *48* (2), 165–171.
- (61) O'Brien, B.; Carroll, W. M.; Kelly, M. J. Passivation of Nitinol Wire for Vascular Implants - A Demonstration of the Benefits. *Biomaterials* **2002**, *23* (8), 1739–1748.
- (62) Bogdanski, D. Untersuchungen Zur Biokompatibilität Und Biofunktionalität von Implantatmaterialien Am Beispiel von Nickel-Titan-Formgedächtnislegierungen, Universitätsklinik Bochum, 2005.
- (63) Ryhänen, J.; Niemi, E.; Serlo, W.; Niemelä, E.; Sandvik, P.; Pernu, H.; Salo, T. Biocompatibility of Nickel-Titanium Shape Memory Metal and Its Corrosion Behavior in Human Cell Cultures. *J Biomed Mater Res* **1997**, *35* (4), 451–457.
- (64) Wever, D. J.; Veldhuizen, A. G.; de Vries, J.; Busscher, H. J.; Uges, D. R.; van Horn, J. R. Electrochemical and Surface Characterization of a Nickel-Titanium Alloy. *Biomaterials* **1998**, *19*, 761–769.
- (65) Jia, W.; Beatty, M. W.; Reinhardt, R. A.; Petro, T. M.; Cohen, D. M.; Maze, C. R.; Strom, E. A.; Hoffman, M. Nickel Release from Orthodontic Arch Wires and Cellular Immune Response to Various Nickel Concentrations. *J Bio-med Mater Res (Appl Biomater)* **1999**, *48*, 488–95.
- (66) Wever, D. J.; Veldhuizen, A. G.; Sanders, M. M.; Schakenraad, J. M.; Van Horn, J. R. Cytotoxic, Allergic and Genotoxic Activity of a Nickel-Titanium Alloy. *Biomaterials* **1997**, *18* (16), 1115–1120.
- (67) Habijan, T.; De Miranda, R. L.; Zamponi, C.; Quandt, E.; Greulich, C.; Schildhauer, T. a.; Köller, M. The Biocompatibility and Mechanical Properties of Cylindrical NiTi Thin Films Produced by Magnetron Sputtering. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32* (8), 2523–2528.
- (68) Wohlschlägel, M.; Lima de Miranda, R.; Schübler, A.; Quandt, E. Nitinol: Tubing versus Sputtered Film - Microcleanliness and Corrosion Behavior. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2015**, n/a-n/a.
- (69) Tepe, G.; Schmehl, J.; Wendel, H. P.; Schaffner, S.; Heller, S.; Gianotti, M.; Claussen, C. D.; Duda, S. H. Reduced Thrombogenicity of Nitinol Stents--in Vitro

- Evaluation of Different Surface Modifications and Coatings. *Biomaterials* **2006**, 27 (4), 643–650.
- (70) Thierry, B.; Merhi, Y.; Bilodeau, L.; Trépanier, C.; Tabrizian, M. Nitinol versus Stainless Steel Stents: Acute Thrombogenicity Study in an Ex Vivo Porcine Model. *Biomaterials* **2002**, 23 (14), 2997–3005.
- (71) Kealey, C. P.; Whelan, S. a.; Chun, Y. J.; Soojung, C. H.; Tulloch, a. W.; Mohanchandra, K. P.; Di Carlo, D.; Levi, D. S.; Carman, G. P.; Rigberg, D. a. In Vitro Hemocompatibility of Thin Film Nitinol in Stenotic Flow Conditions. *Biomaterials* **2010**, 31 (34), 8864–8871.
- (72) Ohring, M. *Materials Science of Thin Films*; Academic Press: London, 2002.
- (73) Wehner, G.; Anderson, G. *Handbook of Thin Film Technology*; Maissel, L., Glang, R., Eds.; McGraw-Hill: New York, 1970.
- (74) Campbell, S. A. *Fabrication Engineering at the Micro- and Nanoscale*, 4th ed.; Oxford University Press: New York, 2012.
- (75) Campbell, S. A. *The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication*; Oxford University Press, 2001.
- (76) Tarng, M. L.; Wehner, G. K. Alloy Sputtering Studies with in Situ Auger Electron Spectroscopy. *J. Appl. Phys.* **1971**, 42 (6), 2449–2452.
- (77) Chernysh, V. S.; Tuboltsev, V. S.; Kulikauskas, V. S. Angular Distributions of Ni and Ti Atoms Sputtered from a NiTi Alloy under He<sup>+</sup> and Ar<sup>+</sup> Ion Bombardment. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **1998**, 140 (3–4), 303–310.
- (78) Neshev, I.; Tzanev, S.; Minnebaev, K. F.; Chernysh, V. S. Angular Distributions NiTi Alloy Particles from. *Vacuum* **1993**, 44 (11–12), 1131–1133.
- (79) Thornton, J. A. High Rate Thick Film Growth. *Annu. Rev. Mater. Res.* **1977**, 7, 239–260.
- (80) Thornton, J. A. The Microstructure of Sputter-Deposited Coatings. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **1986**, 4 (6), 3059.
- (81) Mack, C. *Fundamental Principles of Optical Lithography: The Science of Microfabrication*; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, 2007.
- (82) Köhler, M. *Etching in Microsystem Technology*; Wiley-VHC Verlag GmbH: Weinheim, 1999.
- (83) Madou, M. *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*; CRC Press: Boca Raton, 2002.

- (84) Jaeger, R. *Introduction to Microelectronic Fabrication*; Prantice-Hall, Inc: New Jersey, 1998.
- (85) Lima de Miranda, R.; Zamponi, C.; Quandt, E. Micropatterned Freestanding Superelastic TiNi Films. *Adv. Eng. Mater.* **2013**, *15* (1–2), 66–69.
- (86) Lüllmann-Rauch, R. *Histologie*; Thieme: Stuttgart, 2006.
- (87) Flanagan, T. C.; Pandit, A. Living Artificial Heart Valve Alternatives: A Review. *Eur. Cells Mater.* **2003**, *6* (0), 28–45.
- (88) Filip, D. A.; Radu, A.; Simionescu, M. Interstitial Cells of the Heart Valves Possess Characteristics Similar to Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **1986**, *59* (3), 310–320.
- (89) Messier, R.; Bass, B.; Aly, H.; Jones, J.; Domkowski, P.; Wallace, R.; Hopkins, R. Dual Structural and Functional Phenotypes of the Porcine Aortic Valve Interstitial Population: Characteristics of the Leaflet Myofibroblast. *J Surg Res* **1994**, *57* (1), 1–21.
- (90) Lehner, G.; Fischlein, T.; Baretton, G.; Murphy, J. G.; Reichart, B. Endothelialized Biological Heart Valve Prostheses in the Non-Human Primate Model. Discussion. *Eur. J. cardio-thoracic Surg.* *11* (3), 498–504.
- (91) Frater, R.; Gong, G.; Hoffman, D.; Liao, K. Endothelial Covering of Biological Artificial Heart Valves. *Ann. Thorac. Surg.* **1992**, *53* (3), 371–372.
- (92) Boldt, J.; Lutter, G.; Pohanke, J.; Fischer, G.; Schoettler, J.; Cremer, J.; Metzner, A. Percutaneous Tissue-Engineered Pulmonary Valved Stent Implantation: Comparison of Bone Marrow-Derived CD133+/-Cells and Cells Obtained from Carotid Artery. *Tissue Eng. Part C Methods* **2013**, *19* (5), 363–374.
- (93) Meschede, D. *Gerthsen Physik*, 22nd ed.; Springer-Verlag: Heidelberg, 2004.
- (94) Haaf, P.; Steiner, M.; Attmann, T.; Pfister, G.; Cremer, J.; Lutter, G. A Novel Pulse Duplicator System: Evaluation of Different Valve Prostheses. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2009**, *57* (1), 10–17.
- (95) Malki, O. *Hydrodynamik Mechanischer Herzklappenprothesen*, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, 2001.
- (96) Loger, K.; de Miranda, R. L.; Engel, A.; Marczynski-Bühlow, M.; Lutter, G.; Quandt, E. Fabrication and Evaluation of Nitinol Thin Film Heart Valves. *Cardiovasc. Eng. Technol.* **2014**, *5* (4), 308–316.
- (97) International Standard ISO 5840. Cardiovascular Implants—Cardiac Valve Prostheses. ISO. **2005**.
- (98) Marquez, S.; Hon, R.; Yonganathan, A. Comparative Hydrodynamic Evaluation of

- Bioprosthetic Heart Valves. *J. Hear. Valve Dis.* **2001**, 10 (6), 802–811.
- (99) Carabello, B. A.; Grossman, W. *Calculation of Stenotic Valve Orifice Area. In: Grossman's Cardiac Catheterization, Angiography and Intervention*, 6th ed.; D. S. Baim, Grossman, W., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 200AD.
- (100) Mohammadi, H.; Mequanint, K. Medical Engineering & Physics Prosthetic Aortic Heart Valves : Modeling and Design. *Med. Eng. Phys.* **2011**, 33 (2), 131–147.
- (101) Herber, R. F. Review of Trace Element Concentrations in Biological Specimens according to the TRACY Protocol. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1999**, 72 (4), 279–283.
- (102) Thyssen, J. P.; Uter, W.; Menné, T.; Lidén, C. Revision of the European Standard for Control of the EU Nickel Restriction – a Probable Improvement for European Citizens. *Contact Dermatitis* **2011**, 65, 60–61.
- (103) Gawkrödger, D. J. Nickel Dermatitis: How Much Nickel Is Safe? *Contact Dermatitis* **1996**, 35 (5), 267–271.
- (104) Loger, K.; Engel, A.; Haupt, J.; Li, Q.; Lima De Miranda, R.; Quandt, E.; Lutter, G.; Selhuber-Unkel, C. Cell Adhesion on NiTi Thin Film Sputter-Deposited Meshes. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 59, 611–616.
- (105) Unger, R. E.; Peters, K.; Wolf, M.; Motta, A.; Migliaresi, C.; Kirkpatrick, C. J. Endothelialization of a Non-Woven Silk Fibroin Net for Use in Tissue Engineering: Growth and Gene Regulation of Human Endothelial Cells. *Biomaterials* **2004**, 25 (21), 5137–5146.
- (106) Scherge, M.; Gorb, S. *Biological Micro-and Nanotribology*; Springer Science & Business Media, 2001.
- (107) Loger, K.; Engel, A.; Haupt, J.; Lima De Miranda, R.; Lutter, G.; Quandt, E. Microstructured Nickel-Titanium Thin Film Leaflets for Hybrid Tissue Engineered Heart Valves Fabricated by Magnetron Sputter Deposition. *Cardiovasc. Eng. Technol.* **2016**, 7 (1), 69–77.
- (108) Bottio, T.; Caprili, L.; Casarotto, D.; Gerosa, G. Small Aortic Annulus: The Hydrodynamic Performances of 5 Commercially Available Bileaflet Mechanical Valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2004**, 128 (3), 457–462.





## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an all diejenigen aussprechen, die mich während meiner Zeit an der Technischen Fakultät unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Eckhard Quandt bedanken, der mir die Möglichkeit gab, mich mit diesem spannenden Thema intensiv auseinanderzusetzen. Zudem bedanke ich mich bei Christine Selhuber-Unkel für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und bei Rodrigo Lima de Miranda für seine wissenschaftliche Betreuung und die Leitung des Projekts.

Ein ganz besonderer Dank geht an Christoph Chluba, der mir bei vielen Messungen und Fragen immer hilfreich und freundschaftlich zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern bedanken, die zu den Ergebnissen dieses Projektes beigetragen haben; bei Christiane Zamponi, Alexander Engel, Jessica Haupt, Constantin Fühner, Georg Lutter, Qian Li, Katharina Siemsen, Berndt Neumann und Matthias Burmeister.

Und natürlich ein riesiges Dankeschön an alle Mitarbeiter und Freunde, die mich während der Zeit an der Technischen Fakultät unterstützt haben; für hilfreiche Tipps, Hilfestellung bei technischen Problemen oder einfach nur für nette Gespräche beim Kaffee oder Mittagessen. Ich bedanke mich bei Antonio Malave, Andre Piorra, Patrick Hays, Volker Röbisch, Ali Tavassolizadeh, Erdem Yazar, Till Jurgeleit, Nicole Schneidewind, Christoph Bechtold, Gislinde Schröder, Claas Thede, Hanna Lewitz, Christine Kirchhof, Dirk Meyners, David Haffner, Thomas Metzing, Iris Hölken und Viktor Schneider.

Ich möchte diese Arbeit meiner Familie, meinen Eltern, meiner Freundin Wendy und unserer Tochter Jolanda widmen. Sie haben mich immer unterstützt und auch in schweren Zeiten aufgemuntert, dieses Projekt zu einem erfolgreichen Ende zu bringen.





Hiermit erkläre ich, Klaas Loger, an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, nach Inhalt und Form eigenständig erarbeitet und verfasst worden ist. Die Dissertation ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgesellschaft entstanden. Diese Arbeit ist an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens zum Teil oder als Ganzes eingereicht oder veröffentlicht worden und ist mein erster Promotionsversuch.

Kiel, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Klaas Loger