

Dr. Svenja Hinderer

»Eine künstliche Herzklappe am Vorbild der Natur«

Der vorliegende Beitrag wurde beim Deutschen Studienpreis 2015 mit einem 1. Preis in der Sektion Natur- und Technikwissenschaften ausgezeichnet. Er beruht auf der 2014 an der Universität Stuttgart eingereichten Dissertation »Electrospinning – a suitable method to generate scaffolds for regenerative medicine applications« von Dr. Svenja Hinderer.

Eine künstliche Herzklappe am Vorbild der Natur

Dr. Svenja Hinderer

Abstract

Bisher verfügbare Herzklappenersatzsysteme sind begrenzt in ihrer Verwendungsdauer und wachsen im Kindeskörper nicht mit. Um dieses Problem zu adressieren, habe ich mich in meiner Dissertation mit den folgenden zwei zentralen Fragen beschäftigt: Wie macht es die Natur, und wie können wir diese in einem Biomaterial nachbauen? Ziel der Dissertation war es, die Komplexität der extrazellulären Matrix der Herzklappe hinsichtlich struktureller, mechanischer und biochemischer Beschaffenheit zu erfassen und ein Hybridmaterial am Vorbild der Natur zu entwickeln. Im Rahmen der Arbeit konnten entscheidende Schritte im Bereich des Herzklappenengineering, der Induktion von Elastogenese mit humanen Zellen sowie der Weiterentwicklung der Elektrosponningtechnologie im Bereich Medizintechnik gemacht werden. Diese sehr vielversprechenden Ergebnisse stellen einen wichtigen Meilenstein für die Entwicklung einer im Kindeskörper mitwachsenden Herzklappe dar.

Darstellung des Dissertationsprojekts

Einleitung und Zielsetzung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind trotz bedeutender Fortschritte in der Kardiologie und der Herzchirurgie weltweit die Todesursache Nummer 1. Häufig betroffen sind dabei die Herzklappen. Heutzutage gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, eine defekte Herzklappe zu ersetzen, was aber meist mit einer lebenslangen Medikamenteneinnahme verbunden ist. Die bisher verfügbaren Prothesen stellen jedoch, neben ihrer auf maximal 25 Jahre begrenzten Verwendungsdauer, ein weiteres Problem dar: Sie wachsen im Kindeskörper nicht mit. Um diesen Limitationen entgegenzuwirken, habe ich mich zunächst mit folgender Frage beschäftigt: Wie macht es die Natur? Wenn es möglich ist, diese nachzustellen, dann könnten ein mitwachsendes Implantat und ein Verzicht auf Medikamente nach Implantation nicht mehr nur ein Traum vieler Patienten sein.

Die sogenannten Taschenklappen bestehen aus je drei Taschen, deren Architektur ganz besonders ist. Das in etwa 200 µm dicke Gewebe ist in drei Schichten unterteilt. Die vorwiegend aus Kollagen bestehende Fibrosa und die Ventrikularis mit hauptsächlich elastischen Fasern bilden die äußeren Schichten. Getrennt sind diese zwei durch die als Gleitschicht wirkende, proteoglykanreiche Spongiosa. Dieser Aufbau verleiht diesem dünnen Gewebe seine extreme Robustheit, Elastizität und

Dauerbeständigkeit. Ziel der Dissertation war es, die mechanischen und strukturellen Eigenschaften der Herzklappe zu identifizieren und ein Trägersubstrat mittels Elektrosponning zu generieren, das diese Eigenschaften nachahmt und die Funktion einer Herzklappe übernehmen kann. Zudem soll das Material die Induktion von Elastogenese – die Bildung elastischer Fasern – mit humanen Zellen ermöglichen.

Zusammenfassung und Bedeutung für die Gesellschaft

Wird ein Kind mit einem Herzklappendefekt geboren, so muss dieser häufig direkt nach der Geburt im Zuge einer sehr aufwendigen Operation am offenen Herzen durch ein Herzklappenimplantat ersetzt werden. Leider wachsen die heutzutage eingesetzten Implantate nicht mit, und somit muss der Herzklappenersatz regelmäßig durch ein größeres Implantat ausgetauscht werden. Aber auch im ausgewachsenen Körper ist die Verwendungsdauer auf 15–25 Jahre begrenzt. Wachstum hat etwas mit Zellen zu tun, die organspezifische extrazelluläre Matrix bilden. Doch woher wissen die Zellen, welche Matrix sie produzieren müssen? Zellen reagieren über Rezeptoren mit ihrer Umgebung, wodurch ihr Verhalten gesteuert wird. Daher nehmen wir an, dass, wenn die Umgebung der Zelle gleich oder ähnlich ihrer gewohnten Umgebung ist, diese auch die für dieses Gewebe übliche extrazelluläre Matrix bildet. Schaut man sich die gegenwärtigen Herzklappenersatzsysteme an, ist schnell zu erkennen, dass diese nur wenig mit einer nativen Herzklappe gemeinsam haben. Ihre Funktion ist lediglich die eines Ventils, welches den Blutrückfluss verhindert. Die native Herzklappe ist jedoch ein sehr komplexes System, welches Mutter Natur nicht umsonst so gebaut hat. Im Rahmen der Dissertation wurde die Komplexität der Herzklappe erfasst und ein Trägersubstrat hergestellt, welches die strukturellen und mechanischen Eigenschaften der natürlichen Herzklappe nachahmt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Material in vitro allen Anforderungen entspricht und somit einen entscheidenden Schritt in Richtung einer mitwachsenden Herzklappe darstellt. Aufgrund der hervorragenden Leistung des neu entwickelten Implantats im Bioreaktor könnte dieses auch Anwendung im Hochdrucksystem des erwachsenen Menschen finden, wofür es bis heute noch kein künstliches Ersatzsystem gibt. Für die Umsetzung in ein Produkt müssen noch Studien im Tier erfolgen, was momentan in die Wege geleitet wird. Jedoch konnte ich mit meiner Arbeit einen wichtigen Grundstein für ein funktionelles Herzklappenersatzsystem legen.

Im Zuge der Herzklappenentwicklung habe ich zudem eine Methode entwickeln können, die es erlaubt, sehr empfindliche Proteine ohne Funktionsverlust mittels Elektrosponning zu verarbeiten. In der Klinik werden elektrogessponnene Materialien zum Beispiel als Wundauflage angewandt. Die Möglichkeit, sensitive Proteine funktional mit einzubringen, kann also nicht nur die Herzklappe im Wachstum unterstützen, sondern je nach Auswahl des Proteins unter anderem auch die Wundheilung unterstützen.

Ein weiteres Thema, mit dem ich mich während meiner Dissertation beschäftigt habe, ist die Bildung von elastischen Fasern. Diese Fasern verleihen dem Gewebe Elastizität und Widerstandsfähigkeit. Im jungen Alter sorgen sie für eine straffe Haut, im Alter oder durch UV-Einwirkung werden sie zerstört, und es bilden sich Falten. Blutgefäße platzen nicht, solange sie durch die elastischen Fasern gestützt werden. Auch die Herzklappe verdankt ihre Dauerbeständigkeit diesen Fasern, die vermehrt in einer Schicht der Herzklappe vorkommen. Der Prozess der Faserbildung ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt, aber eines ist bekannt: Werden die Fasern einmal zerstört, kann der Körper sie nicht wiederherstellen. Das Fehlen von elastischen Fasern ist eines der Hauptprobleme im Tissue Engineering beziehungsweise bei der Herstellung von Implantaten für den Menschen. Auch bei dieser Fragestellung habe ich mich an der Natur orientiert, in der die Zellen nicht nur die vorher erwähnte dreidimensionale Umgebung haben, sondern zusätzlich physikalische Reize erfahren. Mittels eines geeigneten Trägersubstrats und eines eigens für diesen Zweck konstruierten Bioreaktors, war es möglich, menschliche Zellen zur Bildung von elastischen Fasern anzuregen. Es konnte also ein humanbasiertes Gewebe hergestellt werden, in dem elastische Fasern reifen, was einen großen Fortschritt in der Forschung bezüglich Tissue Engineering und elastischer Faserbildung darstellt. Durch die Möglichkeit, elastische Fasern in ein tissue-engineertes Produkt mit einzubringen, können widerstandsfähigere und funktionale Implantate hergestellt werden. Das In-vitro-System, bestehend aus dem Trägersubstrat und dem Bioreaktor, kann zudem als Testsystem verwendet werden, um den Prozess der elastischen Faserbildung weiter aufzuklären. Außerdem gibt es sehr viele Erkrankungen, wie das Marfan-Syndrom oder Ähnliches, welches zu Missbildungen aufgrund nicht richtig zusammengesetzter elastischer Fasern führt. Für diese Patienten gibt es momentan keine Behandlungsmöglichkeiten. Das in dieser Arbeit hergestellte Testsystem stellt somit eine Möglichkeit dar, diese Krankheiten patientenspezifisch zu untersuchen, um eventuell in weiter Zukunft Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. Ein Elastogenese- Testsystem findet auch großen Zuspruch in der Pharma- und Kosmetikindustrie, in der es zur Testung von Medikamenten hinsichtlich der Regeneration von zerstörten elastischen Fasern beispielsweise nach Verbrennung oder durch Alterung dient. Neben dem Vorteil, dass diese Medikamente in einem humanen Modell getestet werden könnten, kann auch auf Tierversuche verzichtet werden. Erfolgreich elastische Fasern in vitro herstellen zu können, ist also sowohl hinsichtlich der Implantate als auch der Testsysteme ein sehr wichtiger Meilenstein in der Forschung, der auch großen Zuspruch findet.

Die wesentlichen Ergebnisse im Überblick

Identifikation der Herzklappencharakteristik

Um zu definieren, was genau nachgebildet werden soll, wurden zu Beginn der Arbeit die mechanischen

und strukturellen Eigenschaften der nativen Taschen bestimmt. Die Faser- und Porengrößen mittels Rasterelektronenspektroskopie, die Zugfestigkeit, Steifheit und Expansionsfähigkeit mittels uniaxialen Zugversuchen und auch die Wasserspeicherfähigkeit des Gewebes wurden ermittelt. Zur detaillierteren Analyse konnte zudem eine Methode mittels Rasterkraftmikroskopie entwickelt werden, die es erstmals erlaubt, die Steifheit in allen drei Schichten der Taschenklappe zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, dass die in der Mitte liegende Spongiosa nur halb so steif ist wie die umliegenden Schichten. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die Entwicklung eines funktionalen Herzklappenersatzes.

Auf Basis dieser detaillierten Beschreibung soll nun ein Ersatzmaterial generiert werden.

Herstellen eines geeigneten Trägersubstrats mittels Elektrospinning

Elektrospinning ist eine Methode, die es erlaubt, dreidimensionale faserförmige Trägersubstrate herzustellen. Dafür wird ein Polymer in einem Lösungsmittel gelöst und in eine Spritze überführt. Zwischen der Nadel und einer Kupferplatte, die als Elektrode und Faserkollektor agiert, wird ein hohes elektrisches Feld angelegt. Aus dem Polymertropfen, der aus der Spritze gepumpt wird, bildet sich ein hauchdünner Faden, der sich in kreisenden Bewegungen Richtung Kollektor bewegt, auf dem er sich dann als feste Faser ablegt. Diese Methode eignet sich also hervorragend, um die Faserstruktur der extrazellulären Matrix – dem Stützgerüst der Zellen im Gewebe – nachzubilden.

Doch wie können die Fasergröße und -beschaffenheit und die damit verbundenen mechanischen Eigenschaften beeinflusst werden? Es gibt sehr viele Stellschrauben, die betätigt werden können. Angefangen mit der Auswahl des Polymers und auch des Lösungsmittels bis hin zur Variation von Elektrodenabständen, Spannung, Nadelgröße und Flussrate der Polymerlösung. Das Polymer Polylaktid (PLA) ist bekannt für seine elastischen Eigenschaften und ist bereits von den Behörden als Medizinprodukt zugelassen. Zu Beginn wurde PLA versponnen und anschließend analysiert. Jedoch gibt es kaum Ähnlichkeiten zwischen dem PLA-Trägersubstrat und dem nativen Gewebe. Die Fasern und die Verformbarkeit sind viel zu groß und die Wasseraufnahmefähigkeit viel zu gering aufgrund der hohen Hydrophobie. Schritt für Schritt wurde daraufhin Poly(ethylenglykol)dimethacrylat (PEGdma), ein stark wasserbindendes Polymer, zugemischt. Nach einiger Zeit konnte so ein optimales Verhältnis von PLA und PEGdma ermittelt werden. Durch anschließendes Vernetzen der Dimethacrylatgruppen des PEGdma mit UV-Licht konnte eine Matrix generiert werden, die morphologisch stark der nativen extrazellulären Matrix ähnelt. Die Fasern haben die gleiche Größe, die Wasseraufnahmefähigkeit konnte signifikant erhöht werden, und die mechanische Beschaffenheit kommt ganz nahe an die Werte des nativen Klappengewebes.

Es konnte gezeigt werden, dass das neu generierte PEGdma-PLA-Trägersubstrat biokompatibel – also

verträglich mit dem menschlichen Organismus – sowie sterilisierbar für medizinische Anwendungen ist. In einem Bioreaktor wurden die physiologischen Drücke (120 zu 80 mmHg) des Herzens simuliert, denen das Material hervorragend standhält. Videos der Bioreaktorsimulation zeigen beeindruckend, wie das Material als Herzklappenersatz die Funktion des Öffnens und Schließens übernimmt. Ein Unterschied zu einer nativen Schweineklappe, die ebenfalls in den Reaktor eingenäht wurde, war dabei nicht zu erkennen. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass frisch isolierte Herzklappenzenellen auf dem Trägersubstrat kultiviert werden können, ohne dass diese sich phänotypisch verändern oder gar absterben. Diese Zell-Matrix-Interaktionsstudien sind sehr wichtig bezüglich der späteren Zulassung als Medizinprodukt.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass ich innerhalb der Doktorarbeit ein vielversprechendes Basismaterial als Herzklappenersatz, orientiert an den mechanischen und strukturellen Eigenschaften der nativen Herzklappe sowie unter Berücksichtigung der regulatorischen Anforderungen an ein Medizinprodukt, entwickeln konnte. Das Material lässt sich modifizieren, sodass zusätzlich bestimmte biologische Komponenten eingebracht werden können. Durch dieses „Biomimicking“ haben wir eine Basis für eine im Kindeskörper mitwachsende Herzklappe geschaffen.

Elektrospinning von Proteoglykanen

Wie bereits zuvor beschrieben, sind die Eigenschaften des neu generierten Trägersubstrats sehr ähnlich einer natürlichen Herzklappe. Abweichungen von der natürlichen Herzklappe konnten jedoch noch im E-Modul und in der Wasseraufnahmefähigkeit festgestellt werden. Das neu generierte Trägersubstrat ist steifer und kann nicht so viel Wasser binden beziehungsweise aufnehmen wie das native Klappengewebe. Im nativen Gewebe sorgen vor allem Proteoglykane für die Wasserspeicherung und somit auch für die Flexibilität. Dieser Zusammenhang konnte durch die E-Modul-Messungen in den einzelnen Schichten der Herzklappe, bei der die mittig liegende Spongiosa ein nur etwa halb so großes E-Modul aufweist, belegt werden. Bei dem neuen Herzklappenersatzmaterial handelt es sich jedoch lediglich um ein synthetisches Material ohne biologische Informationen, wie zum Beispiel Proteine oder Proteoglykane. Die anschließende Aufgabe liegt darin, einen Prozess zu entwickeln, der es ermöglicht, Proteoglykane ohne Funktionsverlust zu verspinnen, um dem neu generierten Herzklappenersatzmaterial zusätzlich eine biochemische Komponente zu verleihen.

Beim Elektrospinnen werden schädliche Lösungsmittel verwendet und hohe Spannungen (5-25 kV) angelegt, um ein faserförmiges Trägersubstrat zu erzeugen. Bisherige Studien zeigen, dass Proteine, wie zum Beispiel Kollagen, Chitosan, Tropoelastin oder auch Gelatine, zu einem natürlichen Trägersubstrat

versponnen werden können. Jedoch gibt es keine Berichte über das Verspinnen von hochfunktionellen Proteoglykanen. Diese besitzen einen Proteinkern mit mindestens einer Glycosaminoglykanseitenkette. Je nach Art des Proteinkerns und je nach Art und Anzahl der Seitenketten haben die Proteoglykane unterschiedlichen Einfluss auf das Zellverhalten. Um diese ohne Funktionsverlust zu verspinnen, wurde ihre Wasseraufnahmefähigkeit ausgenutzt. Gelöst in Wasser und versponnen aus einer Emulsion, konnte ein Hybridträgersubstrat hergestellt werden, das aus mit Proteoglykanen besetzten Polymerfasern besteht. Sowohl der Proteinkern als auch die Glycosaminoglykanseitenketten konnten nach dem Elektrosponningprozess nachgewiesen werden. Zudem konnte ich zeigen, dass schon ein sehr geringer Anteil an Proteoglykan im Trägersubstrat das E-Modul und somit die Steifigkeit herabsetzt.

Auch die biologische Aktivität konnte nachgewiesen werden. Dafür habe ich Zellen der humanen Luftröhre verwendet, die sich nicht beziehungsweise nur ganz schwer in vitro kultivieren lassen. Auf dem Trägersubstrat, in dem das Proteoglykan Decorin mit eingesponnen war, konnten diese Zellen kultiviert werden, was sowohl bei der Kontrolle ohne Decorin als auch in handelsüblichen Zellkulturflaschen nicht möglich war.

Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass ein Elektrosponnen von Proteoglykanen ohne Verlust von deren biologischer Funktion möglich ist. Diese Proteoglykan-Polymer-Hybridmaterialien sind nicht nur für Herzklappen interessant, sondern auch für viele andere Anwendungen im Bereich des Tissue Engineering oder der Regenerativen Medizin.

Induktion von Elastogenese

Elastische Fasern verleihen dem Gewebe Elastizität und machen es widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen. Diese Fasern sind vor allem in mechanisch stark beanspruchten Geweben wie zum Beispiel der Haut, in Blutgefäßen und auch in der Ventrikularis der Herzklappe zu finden. Diese Fasern werden in der Entwicklung gebildet und können nach Schädigung im menschlichen Körper nicht wiederhergestellt werden. Auch im Tissue Engineering stellt dies ein sehr großes Problem dar, denn bisher gibt es kein tissue-engineertes Implantat oder dreidimensionales Testsystem mit menschlichen Zellen, in dem elastische Fasern entstehen, was natürlich die Dauerbeständigkeit der heutigen Implantate massiv einschränkt.

Die Bildung elastischer Fasern – die sogenannte Elastogenese – ist bis heute noch nicht komplett aufgeklärt. Es ist bekannt, dass elastische Fasern hauptsächlich aus Mikrofibrillen und dem Protein Elastin bestehen. Für die Zusammensetzung dieser Fasern sind jedoch noch viele weitere Elastogenese-

assoziierte Proteine nötig.

Ziel in diesem Teil der Arbeit war es, das zuvor als Herzklappenersatz entwickelte Material (elektrogesponnenes PEGdma-PLA Trägersubstrat) um die Komponente der elastischen Faser zu erweitern. Meine Hypothese dabei war, dass menschliche Zellen in einer geeigneten dreidimensionalen Umgebung – dem geeigneten Trägersubstrat – und unter definierten physikalischen Einflüssen beginnen elastische Fasern bilden. Hierfür wurde ein Bioreaktorsystem entwickelt, das es erlaubt das Trägersubstrat, zusammen mit den Zellen, unter mechanischen Reizen zu kultivieren. Bereits nach 6-tägiger Kultur konnten beeindruckende Ergebnisse gewonnen werden. Spezifische Färbungen der einzelnen Proteine sowie molekularbiologische Analysen bestätigen sowohl die Bildung von Elastin als auch das Vorhandensein der sehr wichtigen elastogeneseassoziierten Proteine. In anschließenden ultrakulturellen Untersuchungen waren die mit Elastin bestückten Mikrofibrillen deutlich zu erkennen. Das im Bioreaktor gereifte, tissue-engineerte Gewebe zeigt die gleichen Strukturen auf wie eine native sich entwickelnde embryonale Herzklappe. Durch die Verwendung eines geeigneten Trägersubstrats und der physikalischen Stimulation im Bioreaktor konnten erstmalig elastische Fasern in einem humanen dreidimensionalen Konstrukt erzeugt werden.

Diese Ergebnisse sind nicht nur für die Entwicklung funktioneller Implantate von großer Bedeutung, sondern auch für die Erstellung humaner Testsysteme zur weiteren Erforschung der Elastogenese, sowie der damit verbundenen Erkrankungen.