

DISS. ETH NO. 22998

Perfusion bioreactors for bone tissue engineering - A combined experimental and computational approach

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Jolanda Rita Vetsch

MSc, ETH Zurich, Switzerland

born on 27th April, 1987

citizen of Grabs SG, Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ralph Müller, examiner
Prof. Dr. Sandra Hofmann, co-examiner

2015

Summary

Conventional bone replacement strategies exhibit various disadvantages like limited supply, post-operative complications or donor site morbidity. The replacement of large bone defects due to trauma or congenital diseases is still a major issue. Bone tissue engineering (BTE) tries to overcome these drawbacks aiming at growing functional cell-matrix constructs by the combination of scaffold materials, cells and environmental cues, like growth factors or mechanical loading.

To generate functional cell-matrix constructs *in-vitro* various bioreactor designs have been proposed. Bioreactors are defined devices that house tissue-engineered constructs under controlled conditions providing a high degree of reproducibility. Different dynamic bioreactor designs have been proposed for BTE applications. Compression and perfusion bioreactors are the most frequently used designs in BTE. They have been shown to enhance *in-vitro* osteogenesis in BTE cultures by the application of mechanical forces.

In-vivo, mechanical loading plays an important role in healthy bone as well as during fracture healing. Bone is constantly remodelled adapting its histological structure to changes in long-term mechanical loading. In healthy bone, osteocytes are the mechanosensitive cells orchestrating bone remodelling based on the intensity of the mechanical signal. Osteocytes are sitting within the lacuno-canalicular network that is filled with interstitial fluid. Due to bone matrix deformations the interstitial fluid flow exerts shear stresses (SS) sensed by the osteocytes. During fracture healing cells within the repair tissue are exposed to SS as well. Cellular responses have been shown to be influenced by the loading regime present within regeneration constructs. Precursor cells like human mesenchymal stem cells (hMSCs) play an important role in fracture healing and have been shown to be a highly suitable cell source for clinical applications, because they can be easily harvested with minimal donor site morbidity and exhibit a high proliferation potential *in-vitro*. The mechanosensitivity of hMSCs has been proven in different studies showing osteogenic differentiation of hMSCs when subjected to perfusion-induced SS. Compared to other bioreactor designs perfusion bioreactors are thought to resemble the *in-vivo* loading of bone the closest.

Perfusion bioreactors have been shown to positively influence various cell types in BTE cultures, but some studies reported contradictory results leading to the assumption that numerous influencing parameters of BTE cultures are still not completely understood. The implementation of micro-computed tomography (μ CT) is able to add high value to BTE cultures. Quantitative three-dimensional (3-D) evaluation of tissue morphology or scaffold geometry can be performed without destroying the sample leaving it intact for prolonged cell culture. The combination of computational simulations with μ CT is a powerful tool to calculate various aspects of cell cultures like tissue growth or mechanical environment. Computational simulations are able to help drawing causal relations between influencing parameters and experimental outcomes, ultimately leading to a better understanding of biological processes in BTE cultures.

This thesis aimed at establishing a perfusion bioreactor system with optimized culture conditions for BTE applications. The thesis was divided into three aims: (i) the development of a perfusion bioreactor design for monitoring 3-D mineralized tissue formation using μ CT. (ii) the optimization of culture conditions for BTE cultures using hMSCs on silk fibroin (SF) scaffolds, and (iii) the application of the perfusion bioreactor system developed using the optimized culture conditions to investigate the influence of curvature on mineralized tissue formation. In a first step, the design of our in-house designed perfusion bioreactor was improved using computational fluid dynamics. It was shown that the original bioreactor design led to inhomogeneous and non-uniform velocity fields within the bioreactor and the scaffold especially at higher flow rates. Three different approaches were able to prevent the formation of inhomogeneous velocity fields: (i) increasing the height of the bioreactor, (ii) increasing the diameter of the inlet and outlet, and (iii) the insertion of flow conditioners. Increasing the height of the bioreactor was not feasible due to size limitations given by the μ CT machine and the application of flow conditioners led to massive air inclusions inside the bioreactor that could not be eliminated once present. Therefore, the original design of the perfusion bioreactor was adapted by increasing the diameter of the inlet and outlet to 5mm which led to homogeneous velocity fields in the bioreactor as well as in the scaffold.

Next, culture conditions, namely culture medium supplementation with fetal bovine serum (FBS) and the mechanical loading regime were optimized for the perfusion bioreactor design developed. It was shown that different FBS types induced spontaneous mineralization on acellular SF scaffolds. The mineralization on cell-seeded SF scaffolds was shown to be cell-mediated only. Additionally, it was shown that the mechanical loading regime applied influenced the cellular behaviour

of hMSCs cultured on SF scaffolds. A lower flow rate led to proliferation of hMSCs whereas a higher flow rate led to differentiation and subsequent mineralized tissue formation by hMSCs. Based on these results suitable control group conditions and a mechanical loading regime inducing mineralized tissue formation have been determined for future *in-vitro* experiments.

Finally, the perfusion bioreactor system developed using the optimized culture conditions was successfully applied to investigate the influence of curvature on 3-D mineralized tissue formation by hMSCs in SF scaffolds. SF scaffolds with different channels of different curvatures have been produced. The influence of curvature on 3-D mineralized tissue formation was investigated under static and loaded conditions. It could be shown that the mineralized tissue formation was dependent on curvature and was additionally enhanced by mechanical loading. Interestingly, the morphology of the mineralized tissue formed was highly dependent on the mechanical loading condition applied. Static samples exhibited cortical-like mineralized tissue structure, whereas loaded samples exhibited trabecular-like mineralized tissue structure. The results of the study presented suggest that the 3-D *in-vitro* model is not only able to show the effects of curvature on mineralized tissue formation, but could be used in future experiments as a model for circular critical size defects in cortical or trabecular bone.

In conclusion, a perfusion bioreactor system has been established by adapting the original perfusion bioreactor design leading to a homogeneous mechanical environment within the bioreactor and the scaffold. The knowledge gained from optimizing culture conditions was combined with the adapted bioreactor design to study the influence of curvature on 3-D mineralized tissue formation. The perfusion bioreactor system developed is believed to serve as a framework providing a defined mechanical environment and defined culture conditions to investigate and understand causal relations between different influencing parameters and experimental outcomes in BTE applications. Ultimately, the increased understanding could be used to guide the development and increase the quality of novel strategies for bone replacement.

Zusammenfassung

Gängige Strategien für den Knochenersatz weisen verschiedene Nachteile wie limitierte Versorgung, post-operative Komplikationen oder Morbidität im Spenderbereich auf. Der Ersatz von grossen Knochendefekten, verursacht durch Traumata oder Erbkrankheiten, ist bis heute ein bedeutendes Problem. Die Züchtung von Knochengewebe im Labor (Knochen Tissue-Engineering, KTE) versucht diese Nachteile zu überwinden. Das Ziel des KTEs ist funktionelle Zell-Matrix Konstrukte, durch Kombination von verschiedenen Trägermaterialien (Scaffolds), Zellen und Umweltfaktoren, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren oder mechanische Belastung, herzustellen.

Verschiedene Bioreaktormodelle sind für die *in-vitro* Züchtung von funktionellen Zell-Matrix Konstrukten vorgeschlagen worden. Bioreaktoren sind definierte Geräte, die eine Kultivierung von gezüchtetem Gewebe unter kontrollierten Bedingungen ermöglichen und einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit aufweisen. Für das KTE wurden verschiedene dynamische Bioreaktormodelle entwickelt. Die am häufigsten verwendeten Modelle sind Kompressions- und Durchflussbioreaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass diese die *in-vitro* Knochenbildung durch Anwendung von mechanischen Kräften fördern.

Mechanische Belastung spielt in gesunden Knochen sowie auch während der Frakturheilung eine wichtige Rolle. Gesunde Knochen werden ununterbrochen remodelliert um ihre Struktur an dauerhafte Veränderungen der mechanischen Beanspruchungen anzupassen. Osteozyten sind mechanosensorische Zellen, welche die Knochenremodellierung basierend auf der von ihnen gespürten Intensität der mechanischen Signale regulieren. Osteozyten liegen eingebettet im lakunokanalikulären Netzwerk des Knochens, dessen Zwischenräume mit Flüssigkeit gefüllt sind. Deformationen der Knochenmatrix führen zu einem Flüssigkeitsfluss, der Scherkräfte generiert, die von den Osteozyten gespürt werden. Auch während der Frakturheilung sind die Zellen im Reparaturgewebe Scherkräften ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass mechanische Belastung von Konstrukten für den Knochenersatz die zelluläre Antwort beeinflussen kann. Vorläuferzellen wie zum Beispiel humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) spielen eine wichtige Rolle während

der Frakturheilung. hMSCs sind für klinische Anwendungen sehr gut geeignet, da sie einfach gewonnen werden können und ein hohes Potential für die *in-vitro* Vermehrung aufweisen. hMSCs sind wie Osteozyten mechanosensorische Zellen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass hMSCs, die mit Scherkräften mechanisch belastet wurden, in Richtung der osteogenen Zellfamilie differenzieren. Im Vergleich zu anderen Bioreaktorsystemen ist der Durchflussbioreaktor das Modell, welches die mechanische Belastung von Knochen *in-vivo* am ähnlichsten wiedergibt.

Die Anwendung von Durchflussbioreaktoren für das KTE hat verschiedene Zelltypen positiv beeinflusst. Es wurden aber auch widersprüchliche Resultate beobachtet, was zu der Annahme führt, dass die Einflussfaktoren von Kulturen für das KTE noch nicht klar verstanden werden. Die Implementierung von Mikro-Computertomographie (μ CT) ist von hohem Wert für das KTE. Mithilfe von μ CT kann die dreidimensionale (3-D) Gewebemorphologie oder die Geometrie von Scaffolds quantitativ bestimmt werden ohne das Sample zu zerstören, um es für längere Zellkulturen weiter zu verwenden. Die Kombination von μ CT und computergestützten Simulationsverfahren ist ein leistungsfähiges Instrument um verschiedene Aspekte von Zellkulturen, wie das Gewebewachstum oder die mechanische Umgebung, zu berechnen. Computergestützte Simulationsverfahren helfen kausale Beziehungen zwischen Einflussfaktoren und experimentellen Ergebnissen zu verstehen. Dies kann letztendlich zu einem verbesserten Verständnis von biologischen Prozessen in Kulturen für das KTE führen.

Diese Doktorarbeit hatte das Ziel ein Durchflussbioreaktor-System mit optimierten Kultivierungsbedingungen für das KTE zu etablieren. Die Arbeit wurde in drei verschiedene Ziele gegliedert: (i) Die Entwicklung der Konstruktion eines Durchflussbioreaktors für die Verfolgung des 3-D Wachstums von mineralisiertem Gewebe mithilfe von μ CT, (ii) die Optimierung von Kultivierungsbedingungen für das KTE durch hMSCs auf Seidenfibroin (SF) Scaffolds, und (iii) die Anwendung des Durchflussbioreaktor-Systems mit den optimierten Kultivierungsbedingungen um den Einfluss von Krümmung auf das 3-D Wachstum von mineralisiertem Gewebe zu untersuchen.

In einem ersten Schritt wurde die Konstruktion unseres selbst-entwickelten Durchflussbioreaktors mithilfe von computergestützter Strömungsdynamik verbessert. Die ursprüngliche Konstruktion führte zu inhomogenen und ungleichmässigen Flussgeschwindigkeitsfeldern im Bioreaktor und im Scaffold vor allem bei höheren Flussraten. Drei verschiedene Ansätze konnten die Bildung von inhomogenen Flussgeschwindigkeitsfeldern verhindern: (i) Eine Erhöhung des Bioreaktors, (ii) eine Vergrößerung des Durchmessers des Ein- und Auslasses und (iii) das Einsetzen

von Strömungsgleichrichtern. Die Erhöhung des Bioreaktors war nicht realisierbar, da die maximale Höhe durch die μ CT-Maschine begrenzt ist. Das Einsetzen von Strömungsgleichrichtern führte zu massiven Lufteinschlüssen im Bioreaktor, die nicht mehr eliminiert werden konnten. Der Durchmesser des Ein- und Auslasses der ursprünglichen Konstruktion des Durchflussbioreaktors wurde schlussendlich auf 5mm vergrössert, was zu homogenen Flussgeschwindigkeitsfeldern im Bioreaktor und im Scaffold führte.

Als nächstes wurden die Kultivierungsbedingungen, genauer gesagt die Ergänzung des Kulturmediums mit fötalem bovines Serum (FBS) und der mechanische Belastungsmodus, optimiert. Verschiedene Typen von FBS führten zu spontaner Mineralisierung in azellulären SF Scaffolds. Es konnte gezeigt werden, dass die Mineralisierung, die auf zellulären SF Scaffolds beobachtet wurde, zellvermittelt gebildet wurde. Der mechanische Belastungsmodus hat das zelluläre Verhalten von hMSCs auf SF Scaffolds direkt beeinflusst. Tiefere Flussraten führten zur Vermehrung der hMSCs, wohingegen höhere Flussraten zur Differenzierung und anschliessender Bildung von mineralisiertem Gewebe durch die hMSCs führten. Basierend auf diesen Resultaten wurden geeignete Konditionen für Kontrollgruppen und einen mechanischen Belastungsmodus, der die Bildung von mineralisiertem Gewebe induziert, für zukünftige *in-vitro* Experimente festgelegt.

Das entwickelte Durchflussbioreaktor-System wurde schliesslich erfolgreich für die Untersuchung des Einflusses von Krümmung auf das 3-D Wachstum von mineralisiertem Gewebe durch hMSCs auf SF Scaffolds angewandt. SF Scaffolds wurden mit verschiedenen Kanälen, die verschiedene Krümmungen repräsentieren, produziert. Der Einfluss der Krümmung wurde unter statischen und belasteten Konditionen untersucht. Das Wachstum des mineralisierten Gewebes war abhängig von der Krümmung und wurde durch die Anwendung von mechanischer Belastung zusätzlich beeinflusst. Die Morphologie des mineralisierten Gewebes war interessanterweise sehr stark von der mechanischen Belastung abhängig. Unter statischen Bedingungen zeigte das mineralisierte Gewebe eine kortikale Struktur, während unter belastenden Bedingungen eine trabekuläre Struktur beobachtet wurde. Die Resultate dieser Studie weisen darauf hin, dass das 3-D *in-vitro* Modell nicht nur die Effekte von Krümmung auf das Wachstum von mineralisiertem Gewebe aufzeigen kann, sondern in zukünftigen Studien auch als Modell für zirkuläre Knochendefekte kritischer Grösse in kortikalem oder trabekulärem Knochen angewendet werden kann.

Abschliessend kann festgestellt werden, dass durch die Anpassung der ursprünglichen Konstruktion des Durchflussbioreaktors ein Durchflussbioreaktor-System mit homogener mechanischer Umgebung im Bioreaktor und im Scaffold

entwickelt wurde. Das während der Optimierung der Kultivierungsbedingungen erworbene Wissen wurde mit der angepassten Konstruktion des Durchflussbioreaktors kombiniert um den Einfluss von Krümmung auf das 3-D Wachstum von mineralisiertem Gewebe zu untersuchen. Das entwickelte Durchflussbioreaktor-System soll in Zukunft als Framework dienen, das eine definierte mechanische Umgebung und definierte Kultivierungsbedingungen unterstützt, um kausale Zusammenhänge zwischen Einflussfaktoren und experimentellen Ergebnissen von Kulturen für das KTE zu verstehen. Das verbesserte Verständnis könnte schlussendlich für die Entwicklung und die Verbesserung der Qualität von neuartigen Strategien für den Knochenersatz angewendet werden.