

# Morphological gradients for biomedical applications

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Zink, Christian

**Publication date:**

2011

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006716420>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH No. 19925

# Morphological Gradients for Biomedical Applications

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by  
CHRISTIAN ZINK  
Dipl. Werkstoff-Ing. ETH  
born on December 07, 1978  
citizen of Fahrni (BE)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Nicholas D. Spencer, examiner  
Prof. Dr. Donald M. Brunette, co-examiner  
Prof. Dr. Ludwig J. Gauckler, co-examiner

2011

---

## Abstract

---

Gradient surfaces facilitate rapid high-throughput investigations and systematic studies in materials science, biology (e.g. protein adsorption, cell interactions) and tribology. An important surface parameter is the surface roughness on both the micrometre and nanometre scale. The aim of this thesis was two-fold: On the one hand, new methods for the fabrication of one-dimensional gradients were developed to broaden the range of roughness gradients. On the other hand, existing and new fabrication techniques for one-dimensional gradients were combined into two-dimensional gradients.

Micro-featured roughness gradients were prepared through a two-step process: Particle erosion, followed by chemical polishing. In this thesis, two different substrate materials were used to fabricate microroughness gradients:

- A sandblasted aluminium substrate was slowly withdrawn from a chemical polishing solution, containing phosphoric acid, sulphuric acid and nitric acid. The gradients were formed by the gradually decreasing polishing time along the substrate. They were centimetres in length and exhibited  $R_a$  values ranging from 1 to 6  $\mu\text{m}$ .
- Slices of a calcite single crystal were sandblasted and then slowly withdrawn from a diluted hydrochloric acid solution. The gradients fabricated this way were also in the centimetre range and had  $R_a$  values from 0.5 to 2.5  $\mu\text{m}$ .

Nano-featured gradients were based on adsorbed particles. In one approach, slowly immersing the substrate into a highly diluted particle suspension creates a particle-density gradient on the surface. In an alternative approach, exposing a substrate with a homogeneous layer of polystyrene (PS) particles to a UV light source or an

atmospheric plasma in a gradual manner, oxidises the polymer particles to different extents, and therefore creates a gradient in feature size.

In order to create two-dimensional gradients, the methods mentioned above were combined. By adding a nanoparticle density gradient to a micro-featured roughness gradient a two-dimensional microroughness vs nanofeature-density gradient was prepared. Also, gradually oxidising PS particles perpendicular to a particle density gradient led to a two-dimensional particle-size vs particle-density gradient.

All the fabricated gradients were extensively characterised by SEM, AFM and optical profilometry to ensure the quality and to determine the roughness parameters ( $R_a$ ,  $S_k$ ) along the gradient. Additionally, the microroughness gradients were analysed by applying a FFT method that allows a wavelength-dependant analysis of the surface topography.

Since cell-culture assays require a large number of substrates, a replica technique was used to create numerous copies of the master gradient. Creating a negative replica in an elastomeric material served as a mould for the subsequent casting process. For “normal” applications, a positive replica was formed from epoxy, which was subsequently Ti coated and used for cell studies. If a highly temperature-resistant roughness gradient is required, an alumina slurry was cast into the mould to form a ceramic replica of the gradient.

Finally, these gradients were used in cell-culture assays to determine cellular response to surface roughness. The one-dimensional microroughness gradients were used to study osteoclasts and their bone-resorption mechanisms. It was shown that the dynamics of the “sealing-zone” — an active component in the bone-resorption mechanism — are tightly correlated with the surface roughness. On rough surfaces, the expansion of the sealing zone is slowed down, which leads to more stable and continuous sealing zones — a requirement for bone resorption.

The two-dimensional micro-roughness vs nanofeature density gradients were used to examine the natural processes that occur after implantation of a bone-anchored implant. In the first assay, the short-term response of macrophages (responsible for wound healing and foreign-body response) was studied. A correlation between high surface roughness and inflammation could be shown. The second study was aimed to look at the influence of surface roughness on the mineralisation of osteoblasts. It was shown that high micrometre roughness, combined with an intermediate nanofeature density (30 to 40 features/ $\mu\text{m}^2$ ) leads to the highest degree

of mineralisation after 14 days. Also, it was shown that the mineralisation is well correlated with features in a size range between 10 and 50  $\mu\text{m}$ , which corresponds to the size of the resorption pits left behind by osteoclasts. And as a last result, it was shown that for  $R_a$  values higher than 3  $\mu\text{m}$ , the deposition of mineralised matrix mainly occurs in valleys and indentations, leading to a decrease in the over-all surface roughness.

---

## Zusammenfassung

---

Eine Oberfläche mit einer kontinuierlich ändernden Oberflächeneigenschaft (ein sogenannter "Oberflächengradient") ermöglicht es, systematische Studien in verschiedenen Bereichen, wie zum Beispiel Materialwissenschaften, Biologie (Protein Adsorption oder Zell Interaktionen) oder Tribologie durchzuführen. Eine wichtige Oberflächeneigenschaft ist die Rauigkeit im Mikrometer- und Nanometerbereich. Das Ziel dieser Doktorarbeit war somit, neue Methoden für die Herstellung von Rauigkeitsgradienten im Micro- und Nanometerebereich zu entwickeln, um das Angebot von Rauigkeitsgradienten zu erweitern. Ausserdem sollten die existierenden sowie auch die neuen Methoden miteinander kombiniert werden, um zweidimensional Oberflächengradienten herzustellen.

Gradienten mit Mikrometerrauigkeit wurden in einem zweistufigen Prozess angefertigt: Sandstrahlen raut die Oberfläche auf, während ein anschliessender, chemischer Polierprozess die Oberfläche allmählich wieder glättet. Zwei verschiedene Trägermaterialien wurden in dieser Arbeit verwendet, um Mikrometerrauigkeitsgradienten herzustellen:

- Ein sandgestrahltes Aluminium Plättchen wurde langsam aus einer chemischen Polierlösung, welche aus Phosphorsäure, Schwefelsäure und Salpetersäure besteht, gezogen. Durch die sukzessive Verkürzung der Polierzeit entlang des Plättchens entsteht ein etwa Zentimeter langer Rauigkeitsgradient mit  $R_a$ -Werten zwischen 1 und 6  $\mu\text{m}$ .
- Dünne Scheiben eines Kalzit-Einkristalls wurden sandgestrahlt und langsam aus einer verdünnten Salzsäurelösung gezogen. Die so hergestellten Gradienten hatten  $R_a$ -Werte zwischen 0.5 und 2.5  $\mu\text{m}$ .

Die Herstellung von Gradienten mit Rauigkeiten im Nanometerbereich basiert auf der Adsorption von Partikeln auf der Oberfläche. Einerseits führt ein langsames Eintauchen in eine stark verdünnte Partikelsuspension zu einem Gradienten der Partikeldichte. Andererseits kann eine Probe mit gleichmässiger Verteilung von Polystyrolpartikel (PS) dazu verwendet werden, um durch allmähliche Oxidation (durch UV-Licht oder ein atmosphärisches Plasma), ein Gradient der Partikelgrösse herzustellen.

Um zweidimensionale Gradienten zu erzeugen, wurden die oben erwähnten Methoden miteinander verknüpft. Ein Gradient der Partikeldichte wurde mit einem Mikrometerrauigkeitsgradienten kombiniert, um so einen zweidimensionalen Gradienten herzustellen. Oder aber, die Polystyrolpartikel wurden rechtwinklig zu einem Dichtegradienten oxidiert, um so einen zweidimensionalen Gradienten der Partikeldichte gegen  $-$ grösse anzufertigen.

Alle hergestellten Gradienten wurden ausführlich mit SEM, AFM und Profilometrie charakterisiert, um einerseits die Qualität sicherzustellen und andererseits die Rauigkeitswerte ( $R_a$  und  $S_k$ ) entlang der Gradienten zu bestimmen. Zudem wurden die Mikrometergradienten mit Hilfe einer Fourier Transformation (FFT) in verschiedene Wellenlängenbereiche unterteilt und dann die Rauigkeit  $R_a$  berechnet, was eine viel detailliertere Analyse ermöglicht.

Da Zellversuche viele Proben benötigen, wurde eine Replikationsmethode angewandt, um unzählige Kopien der Originalgradienten herzustellen. Dabei wurde erst ein negatives Replika aus einem elastischen Polymer hergestellt, welches dann als Gussform verwendet wurde. Für "normale" Anwendungen, wurde ein Epoxidharz in die Form gegossen und nach dem Aushärten mit Titan beschichtet. Für Anwendungen, welche hohe Temperaturen voraussetzen, wurde anstatt des Epoxidharzes ein Aluminiumoxid-Schlicker in die Form gegossen, um so eine keramische Kopie des Rauigkeitsgradienten herzustellen.

Schlussendlich wurden die Gradienten in Zell-Kultur-Versuchen verwendet, um die Zellantwort auf Oberflächenrauigkeit zu untersuchen. Die eindimensionalen Gradienten der Mikrometerrauigkeit wurden dazu benutzt, um Osteoklasten und deren Resorptionsverhalten zu betrachten. Es wurde gezeigt, dass die Dynamik der "sealing zone" — eine adhäsive Superstruktur und aktiver Bestandteil des Knochenresorptions-Mechanismus — eng mit der Oberflächenrauigkeit verknüpft ist. Auf rauen Oberflächen wird die Bewegung der "sealing zone" gehemmt, was zu

einer stabileren und kontinuierlicheren “sealing zone” führt, was notwendig für die Knochenresorption ist.

Die zweidimensionalen Mikrometerrauigkeits- gegen Nanopartikeldichtegradienten wurden benutzt, um die natürlichen Prozesse nach einer Implantation von einem knochen-fixierten Implantat zu untersuchen. Der erste Versuch betrachtet die Reaktion von Makrophagen, welche für die Wundheilung und die Fremdkörperreaktion verantwortlich sind. Es konnte einen Zusammenhang zwischen Entzündungsfaktoren und Oberflächenrauigkeit gezeigt werden. In einem zweiten Versuch wurde der Effekt der Rauigkeit auf die Mineralisation von Osteoblasten untersucht. Eine Kombination von hoher Mikrometerrauigkeit und einer mittleren Dichte von Nanopartikel (etwa 30 bis 40 Partikel/ $\mu\text{m}^2$ ) führt zu der höchsten Mineralisation nach 14 Tagen. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Mineralisation eng mit Strukturen der Grösse von 10 bis 50  $\mu\text{m}$  verknüpft ist — was genau der Grössenordnung der Fressspuren von Osteoklasten entspricht. Als letztes Resultat konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten für  $R_a$ -Werte grösser als 3  $\mu\text{m}$  Calciumphosphatkristallite spezifisch in Tälern und Vertiefungen der Oberfläche ablagern, was zu einer Verringerung der totalen Oberflächenrauigkeit führt.