

Biopolymer scaffolds with controlled architecture for biomedical applications

Doctoral Thesis

Author(s):

Sommer, Marianne Regula

Publication date:

2016

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010811264>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH NO. 23848

**BIOPOLYMER SCAFFOLDS WITH CONTROLLED ARCHITECTURE
FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

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

presented by

MARIANNE REGULA SOMMER

MSc ETH Materials Science

born on 21.01.1987

citizen of Zurich

accepted on the recommendation of

Prof. André R. Studart

Prof. Sandra Hofmann

Dr. Katharina Maniura

Prof. Esther Amstad

2016

Summary

The role that several geometrical parameters of biomaterials play in the response of cells or biological tissues in contact with it has been widely investigated, but the identification of clear design principles remains a major challenge. This is partially due to limitations in current manufacturing techniques, as they do not offer sufficient control over relevant architectural features. To be able to exploit biomaterial architecture to alter cell behavior, a more systematic understanding of the effect of such features is necessary. This requires the development of new biomaterial fabrication methods enabling the design of structures at length scales from the nanometric level up to its overall macroscopic shape. Moreover, biomaterial geometry is known to affect the release of a bioactive compound incorporated at a specific position within it. Here, different methods are proposed to obtain biomaterials with controlled architecture based on the use of monodisperse pore templating material on the one hand and 3D printing on the other hand.

First, silk fibroin inverse opal scaffolds featuring monodisperse and regular porosity are developed and the influence of their structure on human mesenchymal stem cell response and bone tissue formation is investigated. Monodisperse polycaprolactone particles are produced by microfluidics and used as pore templating material. Such scaffolds are then compared to salt-leached scaffolds prepared from salt crystal templates exhibiting more faceted pores in an *in vitro* study. Morphologically, the scaffolds differ in a number of parameters, such as the pore diameter distribution, the pore shape or curvature and the overall porosity. Other parameters like silk fibroin conformation, elastic modulus and surface roughness are similar. While comparable cell numbers and alkaline phosphatase activity, a measure of osteogenic differentiation, are observed, mineralization is significantly increased on the inverse opal as compared to the salt-leached scaffolds. Hence, scaffold geometry likely affects extracellular matrix deposition and mineralization in bone tissue engineering scaffolds.

The effect of pore wall nanotopography on human mesenchymal stem cells is assessed next by culturing them on silk fibroin inverse opal scaffolds with and without nanometric topographical features on their pore walls. The smooth-walled inverse opal scaffolds are identical to those described above. Latex nanoparticles of various sizes are electrostatically adsorbed onto the pore templating polycaprolactone particles prior to infiltration with silk fibroin solution generating different nanotopographical features. For the cell study, latex nanoparticles of 500 nm in diameter are used leaving imprints of approximately half their diameter. Initial attachment as determined by DNA content after 24 hours in culture as well as the total cell number at later time points did not significantly differ between the smooth and rough scaffolds. To evaluate early osteogenic differentiation, alkaline phosphatase activity is measured. Surprisingly, it is

significantly higher on smooth scaffolds implying that the presented type of nanotopography might have a delaying effect on osteogenic differentiation. Finally, the expression of osteopontin and osteocalcin, two osteogenic genes, is quantified. These results show only minimal changes in gene expression with nanotopography. Thus, no positive effect of nanostructured pore walls on bone tissue formation is observed.

To take the control over architecture a step further, we present a method allowing producing silk fibroin biomaterials, in which not only the mesostructure and nanotopography but also the macroscopic organization is separately tunable. Such hierarchical structures are abundant in nature and can be found in the extracellular matrix of various tissues. 3D printing is employed to create complex macroscopic shapes. In order to print silk fibroin solution, the rheology of the ink is modified by including low amounts of Konjac gum. As a sacrificial pore templating material either polydisperse beeswax particles or monodisperse polycaprolactone particles are used, usually resulting in closed porosity after template removal. If desired, an ultrasonication treatment can break the pore walls to create open porosity. To be able to precisely control the biomaterial's mesostructure, droplets of polycaprolactone solution are emulsified in an aqueous continuous phase in a microfluidic device leading to solid particles after slow solvent evaporation. Through choice of device geometry and flow velocities of the two fluids, the droplet diameter can be tailored over a wide range and keeps its very narrow size distribution even upon solvent evaporation. Further, using polycaprolactone as sacrificial material enables modification of the microparticles with charged latex nanoparticles, which offers the possibility to adjust the pore wall nanotopography.

In a final example, 3D printing of an ink based on an emulsion stabilized by chitosan-modified silica is shown to lead to hierarchically porous biomaterials, in which a hydrophobic compound can be deliberately placed at a certain defined location. Such an approach might be useful to be able to program the release profile of bioactive molecules. To achieve the viscoelastic properties necessary for 3D printing by direct ink writing, it is crucial to concentrate the emulsion beyond its jamming limit to create a percolating network of interacting droplets. A highly stable emulsion is required to withstand the high forces acting on the droplets during centrifugation. A high silica concentration resulting in the formation of a strong and stiff network in the presence of oppositely charged chitosan molecules is key to reach the required stability. It is then demonstrated that by multimaterial printing a dye can be positioned as exemplary cargo in the center of the printed structure.

Zusammenfassung

Welche Rolle verschiedene geometrische Parameter von Biomaterialien bei der Reaktion der Zellen oder biologischen Geweben, die damit in Kontakt kommen, spielen, wurde umfangreich untersucht, aber das Festlegen von klaren Gestaltungsleitsätzen stellt immer noch eine grosse Herausforderung dar. Dies ist teilweise durch Beschränkungen in gängigen Herstellverfahren, die nur ungenügende Kontrolle über relevante architektonische Merkmale bieten, begründet. Um die Architektur von Biomaterialien dafür nützen zu können, das Zellverhalten zu verändern, müssen die Effekte von solchen Merkmalen systematischer untersucht und verstanden werden. Dies wiederum erfordert die Entwicklung von neuen Herstellverfahren für Biomaterialien, die es erlauben die Struktur auf allen Längenskalen vom Nanometer Bereich bis hin zur gesamten makroskopischen Form zu gestalten. Des Weiteren ist bekannt, dass die Geometrie von Biomaterialien die Freisetzung von bioaktiven Stoffen beeinflusst, die an einer bestimmten Stelle darin eingebaut wurden. In dieser Arbeit werden verschiedene Methoden vorgestellt, um Biomaterialien mit kontrollierter Architektur zu erzeugen. Diese basieren auf monodispersen Porenvorlagen auf der einen und dem 3D Druck auf der anderen Seite.

Als erstes werden Scaffolds mit inverser Opalstruktur aus Seidenfibroin entwickelt, welche monodisperse und geordnete Porosität aufweisen, und damit der Einfluss der Porenform auf die Reaktion von humanen mesenchymalen Stammzellen und Knochengewebebildung erforscht. Monodisperse Polycaprolacton Partikel werden mithilfe der Mikrofluidik produziert und werden als Porenvorlagen verwendet. Solche Scaffolds vergleichen wir dann in einer in vitro Studie mit salt-leached Scaffolds, die mittels Salzkristallen als porenformendes Material angefertigt werden und daher facettiertere Poren haben. Die Scaffolds unterscheiden sich morphologisch in einer Anzahl von Faktoren, zum Beispiel der Porengrössenverteilung, der Porenform oder -krümmung und der Gesamtporosität. Andere Parameter wie die Seidenfibroinkonformation, der elastischen Modul und die Oberflächenrauigkeit sind ähnlich. Während sich eine vergleichbare Zellanzahl und Alkaline Phosphatase Aktivität, ein Mass für osteogene Differenzierung, beobachten lässt, ist die Mineralisierung signifikant höher mit inverser Opalstruktur als auf den salt-leached Scaffolds. Dies deutet stark darauf hin, dass die Scaffold Geometrie die Ablagerung von extrazellulärer Matrix und deren Mineralisierung in Knochen Tissue Engineering Scaffolds beeinflusst.

Den Effekt, den Porenwände mit Nanotopographie auf humane mesenchymale Stammzellen haben, wird untersucht, indem diese auf Seidenfibroin Scaffolds mit inverser Opalstruktur mit oder ohne Topographie an den Porenwänden kultiviert werden. Die Scaffolds mit inverser Opalstruktur mit glatten Porenwänden sind identisch zu den oben Beschriebenen. Latex Nanopartikel verschiedener Grössen

können elektrostatisch auf die Oberfläche der porenformenden Polycaprolacton Partikel adsorbiert werden, bevor diese mit Seidenfibroin infiltriert werden und erzeugen dort unterschiedliche Nanotopographien. Für die Zellstudie werden Latexnanopartikel mit einem Durchmesser von 500 Nanometer verwendet, die Abdrücke von etwa der Hälfte dieses Durchmessers hinterlassen. In der anfänglichen Zellanhaftung, die mittels DNS Gehalt nach 24 Stunden in Kultur gemessen wurde, sowie den Gesamtzellzahlen zu späteren Zeitpunkten kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Um die frühe Phase der osteogenen Differenzierung zu beurteilen, wird die Alkaline Phosphatase Aktivität bestimmt. Überraschenderweise ist diese signifikant höher in den Scaffolds mit glatten Porenwänden, was darauf hinweist, dass die vorgestellte Art von Nanotopographie einen verzögernden Effekt auf die osteogene Differenzierung hat. Schliesslich wird die Expression von Osteopontin und Osteocalcin, zwei osteogenen Genen, quantifiziert. Die Resultate zeigen, dass die Nanotopographie nur minimale Änderungen in der Genexpression zur Folge hat.

Um noch kontrolliertere Architekturen zu erhalten, stellen wir eine weitere Methode vor, die das Produzieren von Seidenfibroin Biomaterialien erlaubt, bei denen nicht nur die Mesostruktur und die Nanotopographie sondern auch die makroskopische Organisation separat einstellbar sind. Solche hierarchischen Strukturen kommen in der Natur oft vor und können beispielsweise in der extrazellulären Matrix von diversen Geweben gefunden werden. Das 3D Drucken wird benutzt, um komplexe makroskopische Formen generieren zu können. Um eine Seidenfibroinlösung drucken zu können, modifizieren wir die Tintenrheologie, indem kleine Mengen Konjac Gummi beigegeben werden. Zusätzlich werden als porenformendes Material entweder polydisperse Bienenwachs Partikel oder monodisperse Polycaprolacton Partikel eingesetzt, was gewöhnlicherweise nach Entfernen der Porenvorlagen zu geschlossener Porosität führt. Falls erwünscht, kann eine Ultraschallbehandlung durchgeführt werden, um die Porenwände zu durchbrechen und offene Porosität zu kreieren. Um die Mesostruktur des Biomaterials noch genauer kontrollieren zu können, werden in einer mikrofluidischen Apparatur Tröpfchen von Polycaprolactonlösung in einer wässrigen kontinuierlichen Phase emulgiert. Nach langsamem Verdampfen des Lösungsmittels führt dies zu festen Partikeln. Durch die Wahl der Apparaturgeometrie und den Flussgeschwindigkeiten der zwei Flüssigkeiten darin kann der Durchmesser der erhaltenen Tröpfchen über einen grossen Bereich angepasst werden. Die sehr schmale Grössenverteilung bleibt selbst nach dem Verdampfen des Lösungsmittels erhalten. Ausserdem können, wenn Polycaprolacton als Porenvorlagenmaterial gewählt wird, die so fabrizierten Mikropartikel mit geladenen Latex Nanopartikeln beschichtet werden, was die Möglichkeit bietet, die Nanotopographie der Porenwand anzupassen.

Als letztes Beispiel wird gezeigt, dass hierarchisch poröse Biomaterialien, in denen ein hydrophober Stoff vorsätzlich an einer bestimmten Stelle platziert werden kann, mittels 3D Drucken einer Tinte entstehen, die aus einer Emulsion besteht, welche von mit Chitosan modifizierten Siliziumoxidpartikel stabilisiert wird. Dieser Ansatz könnte dabei helfen, das Freisetzungsprofil von bioaktiven Molekülen aus einem Biomaterial zu programmieren. Um die viskoelastischen Eigenschaften, die für das 3D Drucken via direct ink writing notwendig sind, zu erreichen, muss die Emulsion über die Jamming-Grenze hinaus konzentriert werden. So entsteht ein perkolierendes Netzwerk von wechselwirkenden Tröpfchen. Eine höchst stabile Emulsion ist vonnöten, um den hohen Kräften, die während des Zentrifugierens wirken, standhalten zu können. Um dies zu erreichen, ist eine hohe Siliziumoxidkonzentration entscheidend, denn sie führt in Anwesenheit von entgegengesetzt geladenen Chitosan Molekülen zur Bildung eines starken und steifen Netzwerkes. Schliesslich wird demonstriert, dass mithilfe des Multimaterial-Druckens ein Farbstoff als Modell-Fracht in der Mitte der gedruckten Struktur positioniert werden kann.