

DISS. ETH NO. 25383

***Development of a biomimetic surface for
blood-contacting devices via electrospinning
technologies***

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

presented by

Lukas Weidenbacher

MSc Materials Science and Engineering, FAU Erlangen-Nürnberg

born on 19.01.1989

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Stephen J Ferguson, examiner

Dr. Giuseppino Fortunato, co-examiner

Prof. Dr. Katharina Maniura, co-examiner

Prof. Dr. René M Rossi, co-examiner

2018

Summary

2 500 000 000 – the average number of heartbeats in the lifespan of a healthy 70 year old human being. The heart is an incredible organ engineered by nature and, up to date, impossible to recreate by humans. Despite, or perhaps because of this incredible performance, the heart is susceptible to failure or disease. The consequences are in most cases fatal.

Since decades, physicians, biologists and engineers try to develop solutions to assist, repair or replace the human heart. Up to date most patients suffering from end stage heart failure have to rely on donor organs, which is a major concern due to donor organ shortage or non-eligibility of certain patients. As an alternative treatment, ventricular assist devices (VAD's) – artificial pumps that assist the heart to maintain the blood flow within the human body – were introduced as bridge to transplant and recovery or destination therapy. However, one major drawback of such devices is the relatively high risk of thrombosis within the pump, since the artificial surfaces of the VAD are in permanent contact with blood at high shear stresses, triggering blood clot formation.

The goal of this thesis was to design and develop a novel biomimetic approach, to be applied on the surface of such a VAD that enables prolonging the pump lifetime as well as reduces the risk of thrombosis. Blood vessels in the human body are composed of multiple layers of smooth muscle cells (SMC) that are embedded in an extracellular matrix. On top of this, an interconnected monolayer of endothelial cells (EC) is adhering to regulate the anti-thrombotic function of the vessel. For this approach, a biomimetic electrospun matrix interface that consists of both, SMCs and ECs, as found in native blood vessels was therefore envisioned. Three main tasks had to be addressed within the presented study, namely the development of viable cell-infiltrated porous sub-micron scaled fiber scaffolds, tailoring of the raw scaffold membrane material in terms of mechanical response and hemocompatibility, and finally analysis of the endothelial cell response to the newly designed surfaces.

To mimic the structure of a native blood vessel, a process combining conventional needle based electrospinning and cell electrospaying was investigated. Thereby,

an electrospun fibrous network, mimicking the extracellular matrix of the human body, was infiltrated with cells to rebuild the architecture of human tissue. A murine myoblast model cell line (C2C12) was used to study the influence of the spinning process on cell viability and differentiation. A microfluidic-based cell encapsulation protocol was established and adjusted to protect the cells from toxic solvents used during the spinning process, followed by controlled release of the cells. By this, the incorporation of cells into a three-dimensional fibrous network was successfully shown and the viability of the cells was maintained due to the protective effect of the capsules.

Further, the scaffold materials were assessed in terms of cyclic mechanical performance under similar loading conditions as found in VAD's and their response to blood under semi-static incubation was tested. Two different fiber materials, namely polyurethane (PU) and poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene) (PVDFhfp) were combined based on their unique mechanical performance and / or suitable hemocompatibility, respectively to obtain a blend fiber. By partially embedding the blend electrospun network into an elastic silicone material, a novel surface, potentially applicable for pulsatile membranes in VAD's was obtained based on the enhanced performance in terms of blood response. Since the aim of the final application is to maintain a confluent autologous endothelial cell layer, which acts as a barrier between the artificial surface and blood, the surface was cultivated with a confluent layer of cells and tested in a bioreactor system that allows for application of cyclic mechanical loading under flow.

The surface response to flow of endothelial cells cultured on the blend fiber network was investigated. A comparison between fibrous scaffolds without smooth muscle cells and scaffolds incorporating smooth muscle cells, mimicking the blood vessel architecture, is envisioned. By this, the influence of smooth muscle cells on the behavior of the endothelial cells can potentially be studied. A protocol was established for the smooth muscle cells, during which they were stimulated with ascorbic acid and fibronectin to produce a collagenous extracellular matrix to improve the adhesion of the endothelial cell layer.

In conclusion, this thesis presents the development, characterization and performance of a newly designed biomimetic scaffold, to be applied as a novel interface to improve the quality of ventricular assist devices. The biomimetic material was designed to resemble the hierarchically structured architecture of native blood vessels. The potential of this approach was successfully tested *in vitro*. In the future, the potential for long-term endothelialisation as well as investigation in an *in vivo* animal model to better understand the response under physiological conditions can be targeted, to further assess the applicability in a VAD.

Zusammenfassung

2 500 000 000 – die durchschnittliche Anzahl an Herzschlägen während des Lebens eines 70-jährigen Menschen. Das Herz ist ein unglaubliches, von der Natur entwickeltes Organ, welches bis heute unmöglich nachzubauen ist. Trotz, oder gerade wegen dieser unglaublichen Leistung, ist das Herz anfällig für Krankheiten oder Versagen. In den meisten Fällen sind die Konsequenzen fatal.

Seit Jahrzehnten versuchen Ärzte, Biologen und Ingenieure Lösungen zu entwickeln um das menschliche Herz zu heilen oder zu ersetzen. Bis heute müssen sich die meisten Patienten, die sich im Endstadium einer Herzerkrankung befinden, auf Spenderorgane verlassen, was zu grossen Problemen auf Grund von Mangel an Spenderorganen oder Nichteignung der Patienten, führen kann. Als alternative Behandlungsmöglichkeit wurden sogenannte "ventricular assist devices" (VAD) entwickelt – künstliche Pumpen, die das Herz dabei unterstützen den Blutfluss aufrechtzuerhalten – um die Zeit bis zur Transplantation oder Heilung zu überbrücken, oder um permanent im Patient zu bleiben. Ein grosser Nachteil dieser Geräte ist das vergleichsweise hohe Risiko von Thrombosen im Inneren der Pumpe, da sich die künstliche Oberfläche der Pumpe in permanentem Kontakt mit Blut unter hohen Scherkräften befindet, was wiederum die Bildung von Blutgerinnseln auslösen kann.

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen neuartigen biomimetischen Ansatz zu designen und zu entwickeln, um diesen auf der Oberfläche von VADs anzuwenden um deren Lebensdauer zu erhöhen, sowie das Risiko von Thrombosen zu reduzieren. Blutgefässe im menschlichen Körper sind aus mehreren Lagen von glatten Muskelzellen (SMC) die in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind aufgebaut. Auf diesen Schichten sitzt eine eng vernetzte Monolage von Endothelzellen (EC) die die anti-thrombotischen Eigenschaften regulieren. Für den biomimetischen Ansatz wurde eine elektrogessponnene Matrix, die ähnlich eines Blutgefässes, sowohl SMCs als auch ECs beinhaltet, als Grenzfläche angestrebt. Dafür mussten drei Hauptthematiken innerhalb der Studie behandelt werden, nämlich die Entwicklung von lebenden zell-infiltrierten Gerüsten aus Nanofasern, die Anpassung von den mechanischen Eigenschaften sowie der Blutverträglichkeit

des Gerüstmaterials und schlussendlich die Analyse der Endothelzellantwort auf dem neu entwickelten Gerüst.

Um die Struktur eines Blutgefäßes nachzuempfinden, wurde ein Prozess, der konventionelles Elektrosponnen mit dem elektrischen Sprühen von Zellen verbindet, untersucht. Dafür wurde ein elektrosponnenes Netzwerk, welches stark der extrazellulären Matrix im menschlichen Körper ähnelt, mit Zellen infiltriert um die Architektur von menschlichem Gewebe nachzubauen. Eine Myoblasten Zelllinie aus der Maus (C2C12) wurde verwendet, um den Einfluss des Spinnprozesses auf die Überlebensrate der Zellen und deren Potential zur Differenzierung zu studieren. Ein auf Mikrofluidik basierendes Einkapselungsprotokoll wurde entwickelt und angepasst, um die Zellen vor den toxischen Lösungsmitteln zu schützen, die während des Prozesses verwendet wurden und die darauffolgende gezielte Freisetzung der Zellen analysiert. Dadurch konnte die Einbettung von Zellen in ein dreidimensionales Fasernetzwerk erfolgreich nachgewiesen werden und das Überleben der Zellen durch die Einkapselung erfolgreich erreicht werden.

Darüber hinaus wurden die Gerüstmaterialien in Bezug auf deren zyklisches mechanisches Verhalten, unter ähnlichen Lastbedingungen wie in einem VAD, sowie deren Verhalten im Kontakt mit Blut, unter semi-statischen Bedingungen, getestet. Zwei unterschiedliche Fasermaterialien, Polyurethan (PU) sowie Poly(vinyliden fluoride-co-hexafluoropropylen) (PVDFhfp) wurden auf Grund ihrer einzigartigen mechanischen Eigenschaften, bzw. passenden Blutverträglichkeit kombiniert um eine Mischfaser zu erzeugen. Durch partielles Einbetten dieses Mischfasernetzwerkes in ein elastisches Silikonmaterial konnte eine neue Oberfläche erzeugt werden, die aufgrund ihrer verbesserten Blutantwort potentiell in einem pulsatilen VAD Anwendung finden könnte. Da das finale Ziel der Anwendung der Erhalt einer autologen konfluenten Lage aus Endothelzellen als Barriere zwischen dem Blut und der künstlichen Oberfläche ist, wurde die Oberfläche mit einer konfluenten Lage aus Zellen in einem Bioreaktorsystem getestet, welches gleichzeitig eine zyklische mechanische Belastung der Membran als auch die Anwendung von Fluss erlaubt.

Die Endothelzellantwort gegen Fluss auf den Mischfasernetzwerken wurde getestet und ein Vergleich mit biomimetischen Netzwerken welche glatte Muskelzellen beinhalten wurde angestrebt nach dem Modell von Blutgefäßen. Darüber könnte der Einfluss der glatten Muskelzellen auf das Verhalten der Endothelzellen potentiell analysiert werden. Es wurde ein Protokoll für die glatten Muskelzellen etabliert, während dessen sie mit Ascorbinsäure und Fibronectin dazu stimuliert wurden ihre eigene extrazelluläre Matrix aus Kollagen zu synthetisieren, um die Adhäsion einer Endothelzellschicht zu verbessern.

Zusammenfassend präsentiert diese Arbeit die Entwicklung, Charakterisierung und Leistung eines neuen biomimetischen Gerüsts, um es als neue Grenzfläche für ventrikuläre Assistenzsysteme anzuwenden und deren Qualität zu verbessern. Das biomimetische Material wurde designt um die hierarchisch strukturierte Architektur von Blutgefäßen nachzuempfinden. Das Potential dieses Ansatzes wurde erfolgreich *in vitro* getestet. In der Zukunft können das Langzeitverhalten der Endothelzellen sowie Untersuchungen in einem *in vivo* Tierexperiment angestrebt werden, um die Antwort unter physiologischen Bedingungen besser zu verstehen und die Anwendbarkeit in einem VAD weiter zu beurteilen.