

Diss. ETH No. 19277

The importance of multi-modality imaging for the assessment of combined bone and vascular tissue engineering

A dissertation submitted to

ETH ZÜRICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Benjamin W. Thimm

M.Sc. Biomedicine, Johannes Gutenberg-University Mainz

born September 25, 1980

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ralph Müller, examiner

Prof. Dr. C. James Kirkpatrick, co-examiner

2010

Summary

The advent of biomaterials in the field of orthopedics has increased the therapeutic possibilities for many bone-related diseases tremendously. With approximately 1.5 million bone grafting procedures every year, requiring nearly 2.5 billion US Dollars within the United States, the need for bone biomaterials is greater than ever to meet the high demand for grafting material. Grafting material is still mainly obtained from own body transplantations. The search for the ideal bone biomaterial is ongoing and the properties of bone biomaterials are still being optimized. Tissue engineering deals with the reconstruction of tissues and organs often incorporating biomaterial scaffolds as placeholder. Tissue engineering promises to improve and possibly cure many different tissue and organ diseases. Besides bone regeneration by plain biomaterial or tissue-engineered construct application, the difficult process of vascularization within biomaterial substitutes is equally important to guarantee implant success through oxygen and nutrient supply. *In vitro* and *in vivo* imaging of bone and vascularization is playing an increasingly important role in the evaluation of tissue-engineered bone and vascularization, qualitatively as well as quantitatively. Imaging can be applied as a quality control tool for pre- and post-implantation of tissue-engineered constructs. To increase the know-how in the bone and vessel imaging field, the present doctoral thesis focuses on (i) the development of an imaging method for tissue-engineered, bone-like tissue on scaffolds *in vitro*, important for the quality control of tissue-engineered bone constructs, (ii) a new imaging method for the spatial localization of endothelial cells on scaffolds, aiming at 3D imaging of vascularization *in vitro*, and (iii) a combined approach to evaluate a novel bone biomaterial on its bone formation capability, vascularization and biocompatibility *in vitro* and *in vivo*.

Several imaging methods, such as optical microscopy, radiation-based and sound-based methods, are now utilized to resolve research objects down to the micrometer level. Micro-computed tomography (μ CT) represents one of the latest methods, being increasingly used in the monitoring of bone development and tissue engineer-

ing. μ CT imaging was deployed in the first part of this thesis to monitor bone-like tissue formation on silk fibroin scaffolds under modified, mineralization-promoting tissue culture conditions. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were seeded onto silk fibroin scaffolds and cultivated for 42 days in static bioreactors with an initial cell proliferation phase hypothesizing the optimization of extracellular matrix mineralization. Furthermore, tissue-engineered, bone-like tissue on tricalcium phosphate (TCP) scaffolds *in vitro* was imaged to find correlations with histological slices of the same scaffolds. HMSCs were seeded onto TCP scaffolds and cultivated for 42 days in flow perfusion bioreactors aiming for extracellular matrix mineralization. Scaffolds were individually monitored at different time points by μ CT imaging during cell culture showing bone-like tissue distribution on and within TCP scaffolds over time. Embedment of tissue-engineered constructs in polymethylmetacrylate (PMMA) with subsequent sectioning and histological staining confirmed bone-like mineralized tissue within scaffold pores. Analogies were found for histologic sections correlating well with μ CT images. Next to mineralized tissue correlations, based on analogous histological and μ CT images, the determination of thresholds for mineralized bone-like tissue and TCP scaffolds was attempted. μ CT was very precise in the depiction of scaffold pores, however it was limited in the imaging of scaffold mineralization in 3D scaffold space.

In the second part of this thesis, a novel cell labeling method was developed and applied to localize endothelial cells, responsible for vascularization of tissues, on 3D scaffolds. Vascularization plays a significant part in tissue engineering by ensuring oxygen and nutrition supply, however, vessel formation *in vitro* is difficult to achieve and it is even more difficult to prove their functionality. This labeling system was based on a biotin-streptavidin antibody labeling system involving iron oxide particles in the micrometer range which could be imaged by synchrotron radiation-based micro-computed tomography (SR CT) in the nano resolution range only. The integrated iron oxide served as a contrast agent for high-resolution SR CT imaging. Iron oxide labeling has been successfully achieved with particles located preferentially close to the cell centers on 2D and probably on 3D surfaces. The labeling of cells thus indirectly suggested the location in 3D space. Computational image processing was successfully applied to segment the polyurethane (PU) scaffolds from the iron oxide particles.

Biomaterial biocompatibility plays a significant role in the success of graft inte-

gration in the living organism. According to the Food and Drug Administration (FDA), only biocompatible materials may be implanted *in vivo*. Non-biocompatible biomaterials provoke strong inflammatory processes and finally lead to implant rejection. Due to this fact, the last part of this thesis deals with the applicability of a novel TCP-hydroxyapatite-silica-collagen-based bone graft examined on its biocompatibility, bone formation- and vascularization potential as well as its degradation by *in vitro* and *in vivo* experiments. Human primary endothelial cells and osteoblasts were cultured *in vitro* for 10 days on scaffolds and were subsequently examined for cell growth, morphology, gene and protein expression profiles. Based on the results, the novel biomaterial allowed a non-inflammatory cell response and promoted cell growth. Plain scaffolds implanted subcutaneously into Wistar rats for 30 days were subsequently examined by histological evaluation on their inflammation, vascularization, integration and degradation. The biomaterial was well tolerated and integrated by the host without an exacerbated inflammatory response. Vasculogenesis started early by an influx of vessel-rich connective tissue with continuous vascularization within the implantation bed. Scaffold degradation was progressive during the first month after implantation, with osteoclast-like macrophages being present and promoting scaffold degradation from an early stage. The results revealed that this novel biomaterial demonstrated ideal characteristics as a bone graft substitute and may well be applied in future clinical trials.

In this thesis, a μ CT monitoring method was established to follow extracellular matrix mineralization on silk polymer scaffolds on the basis of an adjusted / optimized cell culture methodology. In addition, a bone image segmentation method was developed based on the analogy of histological and μ CT images of tissue-engineered TCP scaffolds. The μ CT imaging method allowed new insights into bone-like tissue formation and distribution within TCP scaffolds which could be of significant use as a cheap and fast quality control imaging method for *in vitro* cultured, tissue-engineered constructs in future. Another novel imaging method was developed to localize single endothelial cells and detect endothelial cell distribution within 3D space by SR CT technology. This method might play a significant role for example in the imaging of vessel distribution in tissue-engineered constructs *in vitro* or in the field of cancer cell research and diagnostics which could localize single cancer cells *in vitro* and possibly *in vivo*. Furthermore, the *in vitro* and *in vivo* quality of a novel biomaterial was assessed which could be used for therapeutic application in

clinics due to its beneficial scaffold tolerance and degradation behavior.

This work may add to constructive knowledge in the fields of tissue engineering and basic cell research in connection with biomaterials. The new imaging options may benefit patients and basic research in the evaluation of tissue-engineered constructs and novel bone biomaterials.

Zusammenfassung

Mit dem Aufkommen von Biomaterialien im Bereich der Orthopädie wurden Therapiemöglichkeiten von Knochenerkrankungen extrem verbessert. Mit circa 1.5 Millionen Knochentransplantationen, mit jährlichen Kosten von circa 2.5 Milliarden US Dollar in den USA, ist der Bedarf an Knochenersatzstoffen heutzutage grösser denn je, um die hohe Nachfrage an körpereigenem Transplantationsmaterial zu decken. Transplantationsmaterial wird hierfür immer noch hauptsächlich von körpereigenen Quellen bezogen. Die Suche nach idealen Knochenbiomaterialien als Ersatzstoffe ist ein weiterhin laufender Prozess. Die Beschaffenheiten von Biomaterialien werden zunehmend aufs Bessere hin fortentwickelt. *Tissue Engineering* beschäftigt sich mit der Gewebe- und Organrekonstruktion, bei der Biomaterial Scaffolds (dreidimensionale (3D), poröse Stützgerüste) letztlich als Platzhalter in der defekten Gewebe- und Organstruktur zum Einsatz kommen. Der heutigen Forschung zufolge verspricht *Tissue Engineering* Hoffnung bei der Therapieverbesserung und möglichen Heilung vieler verschiedener Gewebe- und Organkrankheiten. Neben der Knochenregeneration anhand von unbesiedelten Biomaterialien oder tissue-engineerten Konstrukten, stellt der schwierige Prozess der Vaskularisierung innerhalb der Scaffolds einen ebenso wichtigen Teil dar, der den Implantationserfolg durch Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sicherstellen soll. Die *in vitro* und *in vivo* Bildgebung von Knochen und Vaskularisierung spielt eine zunehmend wichtige Rolle in der qualitativen als auch quantitativen Auswertung von tissue-engineertem Knochen und des Blutgefässsystems. Die Bildgebung kann als Werkzeug für die Qualitätskontrolle von pre- und post-implantiertem, tissue-engineerten Konstrukten angewendet werden. Um Know-how der Knochen- und Gefässbildung beizusteuern, fokussiert diese Doktorarbeit auf (i) die Entwicklung einer Bildgebungsmethode für die Qualitätskontrolle von *in vitro* tissue-engineertem, knochenähnlichem Gewebe auf Tricalciumphosphat (TCP) Scaffolds, (ii) eine neue *in vitro* Bildgebungsmethode für die räumliche Ortsbestimmung von Zellen auf 3D Scaffolds zur 3D Bildgebung von Vaskularisierung, und (iii) ein kombinierter Ansatz zur Bewertung

eines neuartigen Knochenersatzstoffes auf seine Knochenbildungskapazität, Vaskularisierung und Biokompatibilität *in vitro* und *in vivo*.

Einige Bildgebungsmethoden wie die optische Mikroskopie, sowie Strahlen- und Schall-basierte Methoden, werden heutzutage dafür benutzt, um Forschungsobjekte bis zum Mikrometer Level aufzulösen. Die Mikro-Computertomographie (μ CT) stellt eine der neuesten Methoden dar, die zunehmend zum Monitoring von Knochenentwicklung und des *Tissue Engineerings* eingesetzt wird. μ CT wurde im ersten Teil dieser Arbeit zum Monitoring von knochenähnlicher Gewebekultur auf Seiden Fibroin Scaffolds unter veränderten, mineralisierungsfördernden Gewebekultur Bedingungen angewendet. Humane, mesenchymale Stammzellen (hMSCs) wurden hierfür auf Seiden Fibroin Scaffolds gesät und über 42 Tage hinweg in statischen Bioreaktoren kultiviert. Eine Zellproliferationsphase zu Beginn der Zellkultur auf den Scaffolds nahm dabei eine Optimierung der extrazellulären Matrix Mineralisierung an. Des Weiteren wurde tissue-engineertes, knochenähnliches Gewebe auf Tricalcium Phosphat (TCP) Scaffolds *in vitro* bildlich dargestellt, um Korrelationen mit histologischen Schnitten derselben Scaffolds zu finden. hMSCs wurden auf TCP Scaffolds über 42 Tage hinweg in Durchflussbioreaktoren auf ihre Scaffold-mineralisierung hin kultiviert. Die Scaffolds wurden individuell an unterschiedlichen Zeitpunkten mit μ CT Monitoring gemessen, mit der die knochenähnliche Verteilung auf und in den TCP Scaffolds zeitaufgelöst verfolgt werden konnte. Die Einbettung tissue-engineerter Scaffolds in Polymethylmetacrylat (PMMA) mit anschliessender Schnittdarstellung und histologischer Färbung, liess mineralisiertes Gewebe erkennen, die sich in den μ CT Bildern bestätigten. Gestützt auf analoge Histologie- und μ CT Bilder konnte ein Schwellwert für mineralisiertes Knochengewebe getrennt vom TCP Scaffold bestimmt und segmentiert werden. μ CT zeigte in der Darstellung von Scaffoldporen eine hohe Präzision, die jedoch in der Bildgebung von Scaffoldmineralisation im 3D Scaffold zu einem gewissen Grad limitiert war.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine neue Zellmarkierungsmethode entwickelt und angewendet, um Endothelzellen, die für die Vaskularisierung von Gewebe zuständig sind, auf 3D Polyurethan (PU) Scaffolds zu lokalisieren. Vaskularisierung spielt eine signifikante Rolle im *Tissue Engineering*, um die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr zu gewährleisten. Blutgefäßbildung ist jedoch *in vitro* nur schwer zu erreichen, die noch schwieriger auf ihre Funktionalität zu überprüfen ist. Dieses Markierungssystem wurde auf einem Biotin-Streptavidin-Eisenoxid Partikel

Markierungssystem ausgelegt, das bildlich nur auf Synchrotronstrahlung-basierender Computertomographie (SR CT) im Nanometerbereich aufgelöst werden konnte. Die Eisenoxid Partikel dienten dabei als Kontrastmittel für die hochaufgelöste SR CT Bildgebung. Die Eisenoxid Markierung wurde erfolgreich angewendet, wobei die Partikel vorwiegend zellkernnah adhärirten, in 2D sowie wahrscheinlich auch in 3D. Die Markierung der Zellen zeigte auf diese Weise indirekt die Lokalisierung der Zellen im 3D Raum an. Computer-gestützte Bildbearbeitung wurde daraufhin angewendet, um PU Scaffolds von den Eisenoxid Partikeln zu segmentieren.

Die Biokompatibilität von Biomaterialien spielt eine äusserst wichtige Rolle beim Erfolg der Implantatintegration im lebenden Organismus. Gemäss der US Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln (FDA) dürfen nur biokompatible Materialien *in vivo* implantiert werden. Nicht-biokompatible Biomaterialien verursachen starke Entzündungsprozesse und führen letztendlich zur Abstossung des Implantats. Aufgrund dieser Tatsache, untersucht der letzte Teil dieser Arbeit anhand von *in vitro* und *in vivo* Experimenten die Biokompatibilität, die Knochenbildung, das Knochenvascularisierungspotential als auch die Degradation eines neuartigen TCP-Hydroxyapatit-Siliziumdioxid-Kollagen-basierten Knochenersatzstoffes. Humane, primäre Endothelzellen und Osteoblasten wurden über 10 Tage hinweg auf Scaffolds kultiviert und folglich auf Zellwachstum, Zellmorphologie und auf ihr Gen- und Protein-Expressionsprofil hin untersucht. Das neuartige Biomaterial führte, wie die Ergebnisse zeigen, zu einer normalen Zellantwort und unterstützte das Zellwachstum. Unbesiedelte Scaffolds, die in Wistar Ratten subkutan implantiert wurden und über 30 Tage hinweg *in vivo* belassen worden sind, wurden auf ihr Entzündungs-, Vascularisierungs-, Integrations- und Degradationspotential durch histologische Untersuchung hin überprüft. Das Biomaterial wurde vom Wirt ohne übermässige Entzündungsantwort gut toleriert und integriert. Die Blutgefässbildung setzte kurz nach der Scaffold Implantierung mit dem Einstrom gefässreichen Bindegewebes ein, welches sich im gesamten Implantatbett fortsetzte. Die Präsenz osteoklasten-ähnlicher Makrophagen innerhalb des ersten Monats nach der Implantation veranlasste eine progressive Degradation des Scaffolds ab einer frühen Phase. Die Ergebnisse zeigten, dass dieses neuartige Biomaterial ideale Eigenschaften als Knochenersatzmaterial besitzt und zukünftig in klinischen Versuchen zum Einsatz kommen kann.

In dieser Arbeit wurde eine μ CT Monitoring Methode entwickelt, die auf der Basis

eines angepassten / optimierten Zellkulturmethode die extrazelluläre Matrix Mineralisation auf Seiden Fibroin Scaffolds verfolgen konnte. Zusätzlich wurde eine auf Analogie von Histologie- zu μ CT-Bildern basierte Knochen Segmentierungsmethode entwickelt, um tissue-engineerte TCP Scaffolds darzustellen. Die μ CT Bildgebungsmethode erlaubte neue Einblicke in die knochenähnliche Gewebsbildung und deren Verteilung innerhalb der TCP Scaffolds. Dies könnte für schnelle und günstige Qualitätskontrollen für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen der Scaffolds von zukünftige Nutzen sein. Zusätzlich wurde eine neue Bildgebungsmethode entwickelt, um einzelne Zellen und deren Zellverteilung im dreidimensionalen Raum durch SR CT Technologie zu lokalisieren. Die Methode könnte in Zukunft zum Beispiel eine bedeutende Rolle in der *in vitro* Bildgebung der Gefäßverteilung in tissue-engineerten Konstrukten oder im Bereich der Krebszellforschung bzw. -diagnostik spielen, sowohl *in vitro* als eventuell auch *in vivo*. Des Weiteren wurde die *in vitro* und *in vivo* Qualität eines neuartigen Biomaterials untersucht, welches durch seine positive Scaffold Toleranz und Abbaueigenschaften eine mögliche therapeutische Anwendung im klinischen Bereich erfahren könnte.

Die in dieser Arbeit dargestellten Möglichkeiten sollen den wissenschaftlichen Bereichen *Tissue Engineering* und Biomaterial-verbundene Zellforschung in der Weise von Nutzen sein, dass sie die Anwendung verbesserter Biomaterial-Ersatzstoffe aufzeigt, neue Bildgebungsmöglichkeiten beschreibt und letztendlich dem Wohle des Patienten dient.