

Fantastic prints and where to find them

Citation for published version (APA):

Calore, A. R. (2023). *Fantastic prints and where to find them: processing routes for 3D scaffolds in Tissue Engineering*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20231102ac>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20231102ac](https://doi.org/10.26481/dis.20231102ac)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

APPENDIX

SUMMARY

Currently, clinical treatments for the repair of critical-size bone defects are mainly based on autografts. These strategies are generally inefficient due to restricted availability, lack of structural properties, and even donor site morbidity. Recently, the field of tissue engineering has been investigating for innovative solutions to be applied in orthopedics to regenerate bone tissue. Among various research areas, the pursuit of a manufacturing method able to provide patient-personalized implants resulted in the rise of Melt-extrusion additive manufacturing (ME-AM). This class of implant fabrication techniques allows to produce scaffolds with custom morphologies, biodegradable, highly porous and with tailorable mechanics, able to provide the necessary environment and support to cells in the process of new bone formation. However, despite the promising characteristics, implant fabrication is still far from being an optimal process. In fact, the manufacturing procedure itself is usually carried out in a somewhat random manner, being the result of trial-and-error loops where the interaction between material properties and processing equipment is not considered from a fluid-dynamics-perspective. Furthermore, these scaffolds are fabricated with synthetic polymers, which lack those chemical and topographical cues typical of biological materials that promote and support tissue regeneration. At last, improper planning of the manufacturing process may result in uncontrolled development of scaffolds properties, such as surface stiffness and roughness, which are known to influence cell behavior and tissue regeneration. **Chapter 1** of this thesis presents a deep analysis of the current limitations in ME-AM for bone regeneration and reviews the several strategies elaborated over the last years to obtain more optimal implants, highlighting the directions for further research. Strategies such as the development of fluid-dynamics models to optimize manufacturing and post-fabrication physical and chemical treatments to augment biomimicry and bioactivity are reviewed. In the search for optimal manufacturing of scaffolds able to boost bone regeneration, the aim of this thesis is to further contribute to the field by developing a deeper knowledge of the ME-AM process to then integrate it into material- and fabrication-driven approaches to optimize the manufacturing and the performances of scaffolds for bone tissue regeneration.

To start with, **Chapter 2** provides a solution to the recurrent issue of the choice of proper scaffold manufacturing parameters. In **Chapter 2**, a mathematical model was developed to estimate in advance the morphological and mechanical properties of scaffolds manufactured via ME-AM, to assist in screening new materials, shifting to new equipment or optimizing the current production in terms of performance in a biological environment. This model was derived by considering the interaction between the thermal and rheological properties of the material with the manufacturing device and the surrounding environment. First, the possibility of extruding the material in object, depending on the features of a specific device, was evaluated, allowing to assess in advance the compatibility of the couple material/device. Subsequently, the model quantified the flow rate out of the printer, which, together with the cooling kinetics, influences the possibility of crossing the gap over a pore (bridging). The modelling of the thermal behavior also allowed to describe the shape retention of the filament cross-section upon deposition and over cooling, which determines the actual scaffold layer height and the final morphological accuracy. Eventually, the mechanical behavior of the welding points between layers was estimated as a function of the extrusion temperature and environmental conditions, highlighting the interdependence among the difference phenomena. The goal of the model was to allow a user to evaluate in advance the morphological and mechanical properties of scaffold manufactured

with a specific set of processing parameters, so that to possibly adjust the fabrication phase towards more accurate implants.

Once a model to support the manufacturing of scaffolds with the intended requirements had been established, in **Chapter 3** the bioactivity issue was tackled together with the widening of the suitable materials for ME-AM. In fact, high molecular weight (M_w) polymers, although favorable materials because of their enhanced mechanical properties, are often not processable because of their associated high melt viscosity. In **Chapter 3**, scaffolds were fabricated upon the blending of a common biocompatible thermoplastic polymer of high M_w , poly(D,L-lactic acid) (PDLLA), with an additive with known bioactive effects, vitamin D3 (VD3). The inclusion of VD3 led to a decrease in melt viscosity and, consequently, in the power requirement for fabrication. This enabled the processing of such polymer grade without risking molecular degradation, a potential consequence of the usual approach based on the increase of the manufacturing temperature. As demonstrated by differentiation studies with mesenchymal stromal cells (hMSCs), the blending with VD3 allowed also to overcome the inherent bioinertness of synthetic polymers, thus avoiding post-processing treatments. In particular, results indicated that VD3 supported osteogenic differentiation more than the osteogenic culture medium, suggesting that the blending of such additive with synthetic polymers is an elegant strategy to increase the versatility of ME-AM and promote bone tissue regeneration.

After widening the palette of processable materials while overcoming their inherent bioinertness at the same time, in **Chapter 4** another limitation of scaffold manufacturing by ME was tackled. Despite bone being a rather complex tissue from the morphological point of view, with rough surfaces and pores of a size spanning hundredths of microns, ME-AM scaffolds usually present relatively smooth surfaces and bulky filaments. In fact, porosity is present only in the voids originating from the deposition pattern, resulting in a limited biomimicry. In **Chapter 4**, scaffolds presenting surface topography and intra-filament microporosity accessible from the outside were fabricated. Sodium citrate (SOCIT) and poly(vinyl alcohol) (PVA) were chosen as additives to the main poly(L-lactide) (PLLA) matrix to originate different scales of porosity, with a rather straightforward workflow. Upon the application of heat during manufacturing, SOCIT decomposes originating voids within the polymer filaments. PVA, thoroughly mixed with PLLA by extrusion with a screw-based printer, phase-separated into water-soluble domains. Subsequent incubation in water resulted into surface roughness and interconnection of the pores from SOCIT decomposition, which were additionally opened to the outside. These microporous scaffolds did not show any decrease in elastic modulus but instead higher strain at maximum load, resulting in a more biological-alike ductile behavior. Biological tests showed greater hMSCs adhesion after 24 h of culture, with a more spread and random cellular morphology, and enhanced metabolic and osteogenic activity after 7 days.

In **Chapter 5**, we explored how proper planning of the manufacturing process allows to control the development of scaffold features such surface stiffness and surface roughness. Semi-crystalline polymers are grades with superior mechanics but are particularly sensitive to thermal stresses. Currently, limited investigation and planning are carried out on the outcomes of the chosen printing strategy and, as a result, different crystal sizes and densities can be achieved. This influences surface stiffness and roughness, intertwined properties that, in turn, can affect cell activity. In **Chapter 5**, we designed a strategy to innovatively study the effect of crystallinity on, separately, the stiffness and roughness of the surface of polymer films, by applying thermal stresses typical of ME-AM. *In vitro* tests were carried out in order to evaluate how different thermal histories, usually unaccounted for, might affect cell fate. In osteogenic environment, hMSCs showed to be more responsive to surface roughness than to surface stiffness. Overall crystal size distribution resulted to influence cellular behavior more than the average roughness. These findings suggest that awareness and proper planning of the thermal

history applied to semi-crystalline polymers during ME-AM are necessary in order to avoid potential unwanted effects on cell fate.

All the aforementioned results are discussed and placed into the state of the art context, in **Chapter 6**, while providing future perspectives. To finalize, a reflection on the scientific and societal impact of the research carried out in this thesis is presented in **Chapter 7**.

SAMENVATTING

Momenteel zijn klinische behandelingen voor het herstel van botdefecten van kritische grootte voornamelijk gebaseerd op autotransplantaten. Deze strategieën zijn over het algemeen inefficiënt vanwege de beperkte beschikbaarheid, het gebrek aan structurele eigenschappen en zelfs de morbiditeit op de donorlocatie. Onlangs heeft het gebied van weefselmanipulatie onderzoek gedaan naar innovatieve oplossingen die in de orthopedie kunnen worden toegepast om botweefsel te regenereren. Op verschillende onderzoeksgebieden resulteerde het streven naar een productiemethode die patiënt-gepersonaliseerde implantaten kon leveren in de opkomst van Melt-extrusie additive manufacturing (ME-AM). Deze klasse van implantaatfabricagetechnieken maakt het mogelijk om steigers te produceren met op maat gemaakte morfologieën, biologisch afbreekbaar, zeer poreus en met op maat gemaakte mechanica, die in staat zijn om de noodzakelijke omgeving en ondersteuning te bieden aan cellen in het proces van nieuwe botvorming. Ondanks de veelbelovende eigenschappen is de vervaardiging van implantaten echter nog steeds verre van een optimaal proces. In feite wordt het fabricageproces zelf meestal op een enigszins willekeurige manier uitgevoerd, omdat het resultaat is van vallen en opstaan, waarbij de interactie tussen materiaaleigenschappen en verwerkingsapparatuur niet vanuit een vloeistofdynamica-perspectief wordt bekeken. Bovendien zijn deze steigers vervaardigd met synthetische polymeren, die de chemische en topografische kenmerken missen die typisch zijn voor biologische materialen en die weefselregeneratie bevorderen en ondersteunen. Uiteindelijk kan een onjuiste planning van het productieproces resulteren in een ongecontroleerde ontwikkeling van eigenschappen van steigers, zoals oppervlaktestijfheid en ruwheid, waarvan bekend is dat ze het celgedrag en de weefselregeneratie beïnvloeden. **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift presenteert een diepgaande analyse van de huidige beperkingen van ME-AM voor botregeneratie en bespreekt de verschillende strategieën die de afgelopen jaren zijn ontwikkeld om optimalere implantaten te verkrijgen, waarmee de richting voor verder onderzoek wordt benadrukt. Strategieën zoals de ontwikkeling van vloeistofdynamica-modellen om de productie te optimaliseren en fysische en chemische behandelingen na de fabricage om biomimicry en bioactiviteit te vergroten, worden besproken. In de zoektocht naar een optimale productie van steigers die botregeneratie kunnen stimuleren, is het doel van dit proefschrift om verder bij te dragen aan het veld door een diepere kennis van het ME-AM-proces te ontwikkelen om het vervolgens te integreren in materiaal- en fabricagegedreven benaderingen van botregeneratie. het optimaliseren van de productie en de prestaties van steigers voor de regeneratie van botweefsel.

Om te beginnen biedt **Hoofdstuk 2** een oplossing voor het terugkerende probleem van de keuze van de juiste parameters voor de productie van steigers. In **Hoofdstuk 2** werd een wiskundig model ontwikkeld om vooraf de morfologische en mechanische eigenschappen te schatten van steigers vervaardigd via ME-AM, om te helpen bij het screenen van nieuwe materialen, het overstappen op nieuwe apparatuur of het optimaliseren van de huidige productie in termen van prestaties in een biologische omgeving. Dit model is afgeleid door rekening te houden met de interactie tussen de thermische en reologische eigenschappen van het materiaal met het productieapparaat en de omgeving. Eerst werd de mogelijkheid om het materiaal in het object te extruderen, afhankelijk van de kenmerken van een specifiek apparaat, geëvalueerd, waardoor vooraf de compatibiliteit van het

koppelmateriaal/apparaat kon worden beoordeeld. Vervolgens kwantificeerde het model de stroomsnelheid uit de printer, die, samen met de koelkinetiek, de mogelijkheid beïnvloedt om de opening over een porie te overschrijden (brugvorming). De modellering van het thermische gedrag maakte het ook mogelijk om het vormbehoud van de filamentdwarsdoorsnede bij afzetting en overkoeling te beschrijven, wat de werkelijke hoogte van de steigerlaag en de uiteindelijke morfologische nauwkeurigheid bepaalt. Uiteindelijk werd het mechanische gedrag van de laspunten tussen de lagen geschat als een functie van de extrusietemperatuur en de omgevingsomstandigheden, wat de onderlinge afhankelijkheid tussen de verschillende verschijnselen benadrukte. Het doel van het model was om een gebruiker in staat te stellen vooraf de morfologische en mechanische eigenschappen te evalueren van een steiger die met een specifieke reeks verwerkingsparameters is vervaardigd, zodat de fabricagefase mogelijk kan worden aangepast in de richting van nauwkeurigere implantaten.

Nadat een model ter ondersteuning van de productie van steigers met de beoogde eisen was opgesteld, werd in **hoofdstuk 3** het probleem van de bioactiviteit aangepakt, samen met de verruiming van de geschikte materialen voor ME-AM. In feite zijn polymeren met hoog molecuulgewicht (M_w), hoewel gunstige materialen vanwege hun verbeterde mechanische eigenschappen, vaak niet verwerkbaar vanwege de daarmee gepaard gaande hoge smeltviscositeit. In **Hoofdstuk 3** werden scaffolds vervaardigd door het mengen van een gangbaar biocompatibel thermoplastisch polymeer met een hoog M_w poly (D,L-melkzuur) (PDLLA), met een additief met bekende bioactieve effecten, vitamine D3 (VD3). De opname van VD3 leidde tot een afname van de smeltviscositeit en bijgevolg van het benodigde vermogen voor de fabricage. Dit maakte de verwerking van een dergelijke polymeer kwaliteit mogelijk zonder het risico van moleculaire degradatie, een mogelijk gevolg van de gebruikelijke aanpak gebaseerd op de verhoging van de productietemperatuur. Zoals aangetoond door differentiatiestudies met mesenchymale stromale cellen (hMSC's), maakte het mengen met VD3 het ook mogelijk om de inherente bio-inerteid van synthetische polymeren te overwinnen, waardoor nabewerkingsbehandelingen werden vermeden. De resultaten gaven in het bijzonder aan dat VD3 osteogene differentiatie meer ondersteunde dan het osteogene kweekmedium , wat suggereert dat het mengen van een dergelijk additief met synthetische polymeren een elegante strategie is om de veelzijdigheid van ME-AM te vergroten en de regeneratie van botweefsel te bevorderen.

tegelijkertijd hun inherente bio-inerteid te overwinnen , werd in **Hoofdstuk 4** een andere beperking van de productie van steigers door ME aangepakt. Ondanks dat bot vanuit morfologisch oogpunt een nogal complex weefsel is, met ruwe oppervlakken en poriën met een grootte van honderdsten van microns, vertonen ME-AM-scaffolds doorgaans relatief gladde oppervlakken en omvangrijke filamenten. In feite is porositeit alleen aanwezig in de holtes die voortkomen uit het afzettingspatroon, wat resulteert in een beperkte biomimicry. In **Hoofdstuk 4** werden steigers vervaardigd die oppervlaktetopografie en intra-filament microporositeit vertonen die van buitenaf toegankelijk zijn. Natriumcitraat (SOCIT) en poly(vinylalcohol) (PVA) werden gekozen als additieven aan de belangrijkste poly(L-lactide) (PLLA)-matrix om verschillende porositeitsschalen te creëren, met een vrij eenvoudige workflow. Bij toepassing van warmte tijdens de productie ontleedt SOCIT de oorspronkelijke holtes in de polymeerfilamenten. PVA, grondig gemengd met PLLA door extrusie met een op schroeven gebaseerde printer, fasegescheiden in wateroplosbare domeinen. Daaropvolgende incubatie in water resulteerde in oppervlakteruwheid en onderlinge verbinding van de poriën door SOCIT-afbraak, die bovendien naar buiten werden geopend. Deze microporeuze steigers vertoonden geen enkele afname van de elastische modulus, maar in plaats daarvan een hogere spanning bij maximale belasting, resulterend in een meer biologisch-achtig ductiel gedrag. Biologische tests toonden een grotere adhesie van hMSC's aan na 24 uur kweken, met een meer gespreide en willekeurige cellulaire morfologie, en verbeterde metabolische en osteogene activiteit na 7 dagen.

In **Hoofdstuk 5** hebben we onderzocht hoe een goede planning van het productieproces het mogelijk maakt om de ontwikkeling van steigerkenmerken, zoals oppervlaktestijfheid en oppervlakteruwheid, te beheersen. Semikristallijne polymeren zijn kwaliteiten met superieure mechanica, maar zijn bijzonder gevoelig voor thermische spanningen. Momenteel wordt er beperkt onderzoek en planning uitgevoerd naar de resultaten van de gekozen printstrategie en als gevolg daarvan kunnen verschillende kristalgroottes en -dichtheden worden bereikt. Dit beïnvloedt de stijfheid en ruwheid van het oppervlak, verweven eigenschappen die op hun beurt de celactiviteit kunnen beïnvloeden. In **Hoofdstuk 5** hebben we een strategie ontworpen om op innovatieve wijze het effect van kristalliniteit op, afzonderlijk, de stijfheid en ruwheid van het oppervlak van polymeerfilms te bestuderen, door thermische spanningen toe te passen die typisch zijn voor ME-AM. Er werden *in vitro* tests uitgevoerd om te evalueren hoe verschillende thermische geschiedenissen, die gewoonlijk niet worden vermeld, het lot van de cellen zouden kunnen beïnvloeden. In een osteogene omgeving bleken hMSC's beter te reageren op oppervlakteruwheid dan op oppervlaktestijfheid. De algehele kristalgrootteverdeling had tot gevolg dat het cellulaire gedrag meer werd beïnvloed dan de gemiddelde ruwheid. Deze bevindingen suggereren dat bewustzijn en een goede planning van de thermische geschiedenis toegepast op semi-kristallijne polymeren tijdens ME-AM noodzakelijk zijn om mogelijke ongewenste effecten op het lot van de cellen te voorkomen.

Alle bovengenoemde resultaten worden in **hoofdstuk 6 besproken en in de** state-of-the-art context geplaatst, terwijl ze toekomstperspectieven bieden. Ter afsluiting wordt in **Hoofdstuk 7** een reflectie gepresenteerd op de wetenschappelijke en maatschappelijke impact van het onderzoek dat in dit proefschrift wordt uitgevoerd.