

# Engineering micro for repairing macro

Citation for published version (APA):

Galvan Chacon, V. P. (2022). *Engineering micro for repairing macro: a materials-driven quest for bone regeneration*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20220531vg>

## Document status and date:

Published: 01/01/2022

## DOI:

[10.26481/dis.20220531vg](https://doi.org/10.26481/dis.20220531vg)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

Currently, due to the ageing population, a growing number of bone repair surgeries is performed each year. The gold standard treatment of bone defects is still the use of a patient's own bone harvested from elsewhere in the body (autologous tissue). This treatment, although successful, is also associated with donor morbidity, and the availability of bone tissue is limited. Bone obtained from other sources, like deceased humans (allograft) or animals (xenograft) carries the risks of immune reaction and disease transmission. Calcium phosphate (CaP)-based biomaterials are excellent synthetic alternatives for natural bone in treating bone defects, as they do not trigger immune reactions, their synthesis is easy and inexpensive, and they are available off-the-shelf due to their long term stability. CaPs have been used in the clinic in the field of orthopaedics, and dental and craniomaxillofacial applications for a long time, proving to have excellent osteointegration and the ability to trigger *de novo* bone formation, but their performance is still generally considered inferior to that of autologous bone. The bioactivity of CaPs, in terms of their ability to regenerate bone, is highly dependent on their material properties, such as the exact chemical composition, structural and mechanical properties. These properties are intertwined, meaning that a change of one property, e.g. the chemical composition, can cause a change in the structural properties, in turn affecting the mechanical properties. The development of more efficient CaP-based bone graft substitutes lies in understanding the effect of individual material properties and their combinations on the bone regeneration capabilities.

In this thesis, the challenge of understanding the property-function relationships of CaP bone graft substitutes is approached by developing methods to decouple the roles of individual material properties in the material's effect on cells and tissues. This knowledge is then used to develop new, more efficient biomaterials. With these aims in mind, a combination of techniques from the fields of materials science, microfabrication, microfluidics, organ-on-a-chip and bioinformatics was employed. **Chapter 2** presents an overview of the material properties influencing the bioactivity of CaP bone graft substitutes, and the strategies developed in the past decades to gain deeper insights into the property-function relationships of CaPs. The chapter emphasizes the need for a more comprehensive and unified use of material characterization techniques in studying biomaterials such as CaPs. It also shows two limitations of the existing strategies to deconvolute individual properties: the limited number of material properties that can be isolated at a time, and the risk of overlooking synergistic effects between them.

**Chapter 3** focuses on understanding the relative contribution of the chemical composition and microstructural properties of an osteoinductive CaP ceramic on the

osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells (hMSCs). For this, surface microstructure replicas of the CaP ceramic were created in a polymer without, or containing the inorganic components of the ceramic. The results suggest that the strongest positive effect on the osteogenic differentiation of hMSCs is achieved with the microstructured polymer in the presence of calcium.

**Chapter 4** uses bioinformatics tools to identify correlations between material properties of six CaP ceramics and the results of a transcriptomic analysis of MG-63 osteosarcoma cells cultured on them. To this end, first a highly comprehensive material characterization was performed to create a large dataset of numerical material parameters describing both the chemistry and microstructure of the ceramics, which was used as input for the correlation analysis. By using this approach, we could overcome the limitations in the number of properties being decoupled at a time as well as the loss of information about synergistic effects described in Chapter 2. The correlation analysis identified a large number of correlations between material properties and gene expression, most of which were supported by the literature. Besides, a Spearman analysis was performed on the material properties dataset to identify correlations between chemical and structural parameters, confirming that the properties of CaPs are largely intertwined.

**Chapter 5** described the use of a droplet-microfluidics platform to produce CaP with controlled properties. The individual water-in-oil droplets served as microreactors to produce microparticles with controlled composition, particle size and porosity. The bioactivity of the different microparticles was evaluated by studying attachment, proliferation, metabolic activity and osteogenic differentiation of hMSCs cultured on them. The cells were able to attach, were metabolically active and exhibited osteogenic differentiation, although their proliferation was limited.

**Chapter 6** describes the application of microfabrication and surface modification techniques to create a biomimetic on-chip model of trabecular bone. Starting from a set of phase-contrast nanocomputed tomography scans of natural trabecular bone, a design file was created and optimized for printing using two-photon polymerization lithography. The bone models were printed in a polymeric material, which was then chemically modified to introduce a thin bone mineral-like CaP layer. The trabecular bone replicas were finally integrated into a microfluidic chip to study hMSCs viability, and collagen and extracellular matrix production. The results showed that the platform enabled the long-term culture of hMSCs, sustaining cell viability and the production of abundant extracellular matrix, containing collagen type-I.

In conclusion, the research presented in this thesis demonstrates that developing and using (combinations of) tools from the fields of materials science, microtechnology, microfluidics and bioinformatics allows to gain further insights into the mechanisms governing CaP bioactivity in a bone regeneration context.

## Samenvatting

### Engineering micro voor het repareren van macro: een materiaal-gedreven zoektocht naar botregeneratie

Door de vergrijzing van de bevolking wordt momenteel elk jaar een groeiend aantal botherstellende operaties uitgevoerd. De gouden standaardbehandeling van botdefecten is nog steeds het gebruik van het eigen bot van de patiënt dat elders uit het lichaam wordt gehaald (autograft). Deze behandeling is weliswaar succesvol, maar gaat ook gepaard met morbiditeit bij de donor, en de beschikbaarheid van botweefsel is beperkt. Bot verkregen uit andere bronnen, zoals overleden mensen (allograft) of dieren (xenograft) brengt het risico van immunoreacties en ziekteoverdracht met zich mee. Biomaterialen op basis van calciumfosfaat (CaF) zijn uitstekende synthetische alternatieven voor natuurlijk bot bij de behandeling van botdefecten, aangezien zij geen immunoreacties veroorzaken, hun synthese gemakkelijk en goedkoop is, en zij door hun stabiliteit op lange termijn off-the-shelf beschikbaar zijn. CaF's worden al geruime tijd in de kliniek gebruikt op het gebied van orthopedie, tandheelkunde en hoofd- en kaakchirurgie, waarbij is gebleken dat zij een uitstekende osteo-integratie hebben en in staat zijn om *de novo* botvorming op gang te brengen, maar hun prestaties worden over het algemeen nog steeds als inferieur beschouwd aan die van autoloog bot. De bioactiviteit van CaF's, in de zin van hun vermogen om bot te regenereren, is in hoge mate afhankelijk van hun materiaaleigenschappen, zoals de exacte chemische samenstelling en hun structurele en mechanische eigenschappen. Deze eigenschappen zijn met elkaar verweven, wat betekent dat een verandering van één eigenschap, bv. de chemische samenstelling, een verandering kan veroorzaken in de structurele eigenschappen, die op zijn beurt de mechanische eigenschappen beïnvloedt. De basis voor ontwikkeling van efficiëntere, op CaF gebaseerde, substituten voor bottransplantaten ligt in het begrijpen van het effect van individuele materiaaleigenschappen en hun combinaties op het vermogen tot botregeneratie.

In dit proefschrift wordt de uitdaging van het begrijpen van de eigenschap-functie relatie van CaF substituten voor bottransplantaten benaderd door methoden te ontwikkelen om de rol van individuele materiaaleigenschappen in het effect van het materiaal op cellen en weefsels te ontkoppelen. Deze kennis wordt vervolgens gebruikt om nieuwe, efficiëntere biomaterialen te ontwikkelen. Met deze doelstellingen voor ogen is gebruik gemaakt van een combinatie van technieken uit de materiaalkunde, microfabricage, microfluidica, organ-on-a-chip en bio-informatica.

**Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de materiaaleigenschappen die de bioactiviteit van CaF substituten voor bottransplantaten beïnvloeden, en van de strategieën die in de afgelopen decennia zijn ontwikkeld om meer inzicht te krijgen in de eigenschap-functie relaties van CaFs. Het hoofdstuk benadrukt de behoefte aan een meer omvattend en uniform gebruik van materiaalkarakterisatietechnieken bij het bestuderen van biomaterialen zoals CaFs. Het toont ook twee beperkingen van de bestaande strategieën om individuele eigenschappen te deconvolueren: het beperkte aantal materiaaleigenschappen dat per keer kan worden geïsoleerd, en het risico van het over het hoofd zien van synergetische effecten tussen deze eigenschappen.

**Hoofdstuk 3** richt zich op het begrijpen van de relatieve bijdrage van de chemische samenstelling en microstructurele eigenschappen van een osteo-inductieve CaF keramiek op de osteogene differentiatie van humane mesenchymale stromale cellen (hMSCs). Hiertoe werden oppervlakte-microstructuurreplica's van de CaF-keramiek gemaakt in een polymeer zonder, of met de

anorganische componenten van de keramiek. De resultaten suggereren dat het sterkste positieve effect op de osteogene differentiatie van hMSCs wordt bereikt met het microgestructureerde polymeer in de aanwezigheid van calcium.

**Hoofdstuk 4** gebruikt bio-informatica om correlaties te identificeren tussen materiaaleigenschappen van zes CaF keramieken en de resultaten van een transcriptoom analyse van MG-63 osteosarcom cellen die daarop gekweekt zijn. Daartoe werd eerst een zeer uitgebreide materiaalkarakterisering uitgevoerd om een grote dataset van numerieke materiaalparameters te creëren die zowel de chemie als de microstructuur van de keramieken beschrijven, en die als input voor de correlatieanalyse werden gebruikt. Door gebruik te maken van deze aanpak konden we de beperkingen in het aantal eigenschappen dat per keer kan worden ontkoppeld, alsmede het verlies van informatie over synergetische effecten, zoals beschreven in hoofdstuk 2, overwinnen. De correlatie-analyse identificeerde een groot aantal correlaties tussen materiaaleigenschappen en genexpressie, waarvan de meeste werden ondersteund door de literatuur. Bovendien werd een Spearman analyse uitgevoerd op de dataset van materiaaleigenschappen om correlaties tussen chemische en structurele parameters te identificeren, hetgeen bevestigt dat de eigenschappen van CaFs grotendeels met elkaar verweven zijn.

**Hoofdstuk 5** beschrijft het gebruik van een druppel-microfluidisch platform om CaF met gecontroleerde eigenschappen te produceren. De individuele water-in-olie druppels dienden als microreactoren om micropartikels te produceren met gecontroleerde samenstelling, deeltjesgrootte en porositeit. De bioactiviteit van de verschillende micropartikels werd geëvalueerd door het bestuderen van de aanhechting, proliferatie, metabolische activiteit en osteogene differentiatie van hMSCs die erop gekweekt werden. De cellen waren in staat zich te hechten, waren metabolisch actief en vertoonden osteogene differentiatie, hoewel hun proliferatie beperkt was.

**Hoofdstuk 6** beschrijft de toepassing van microfabricage en oppervlaktemodificatie technieken om een biomimetisch on-chip model van trabeculair bot te maken. Uitgaande van een set van fase-contrast nanocomputed tomography scans van natuurlijk trabeculair bot, werd een ontwerpbestand gemaakt en geoptimaliseerd voor het driedimensionaal printen met behulp van twee-foton polymerisatie lithografie. De botmodellen werden geprint in een polymeer materiaal, dat vervolgens chemisch gemodificeerd werd om een dunne botmineraalachtige CaF-laag aan te brengen. De trabeculaire botreplica's werden uiteindelijk geïntegreerd in een microfluidische chip om de levensvatbaarheid van hMSC's en de productie van collageen en extracellulaire matrix te bestuderen. De resultaten toonden aan dat het platform de lange-termijn kweek van hMSCs mogelijk maakte, met behoud van de levensvatbaarheid van de cellen en de productie van overvloedige extracellulaire matrix, die collageen type-I bevat.

Concluderend toont het onderzoek in dit proefschrift aan dat het ontwikkelen en gebruiken van (combinaties van) gereedschappen uit de materiaalkunde, microtechnologie, microfluidica en bio-informatica het mogelijk maakt om meer inzicht te krijgen in de mechanismen die de bioactiviteit van CaF bepalen in een botregeneratie context.