

**Biodegradable Fluidic Microsystems for Cell Cultures and Tissue Engineering**

**Biodegradeerbare microfluidische systemen voor celculturen en weefselregeneratie**

**Diana-Elena Mogosanu**

Promotoren: prof. dr. ir. J. Vanfleteren, prof. dr. P. Dubruel

Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van

Doctor in de ingenieurswetenschappen: biomedische ingenieurstechnieken

Vakgroep Elektronica en Informatiesystemen

Voorzitter: prof. dr. ir. R. Van de Walle

Faculteit Ingenieurswetenschappen en Architectuur

Vakgroep Organische en Macromoleculaire Chemie

Voorzitter: prof. dr. J. Martins

Faculteit Wetenschappen

Academiejaar 2016 - 2017



**UNIVERSITEIT  
GENT**

## Summary

In the last two decades, a multidisciplinary approach on the delivery of cells to the body has advanced. On the one hand, the science of polymers focuses on the development of biocompatible materials for cell culturing and tissue engineering applications, while on the other hand (micro-)engineering has an important part in providing a specific topography that directs the cells and provides a more similar architecture to that of tissues. Soft and flexible elastomers have gained more and more interest, especially due to their biodegradability and tunable mechanical properties that can mimic the natural tissue. Herein, we report the design of novel poly(polyol sebacate) elastomers synthesized from monomers found within the human metabolism. The thermoset properties of these polymers as well as their optical transparency make them ideal materials for microsystems technology. Therefore, microfluidic devices were developed out of these polymers in order to facilitate the design of a tissue-engineered organ. A porous membrane was inserted in the microfluidic device to enable co-culture and distribution of nutrients to the cells. Furthermore, the reported polymers and microfluidic structure can serve a multitude of applications, from tissue engineering to point-of-care diagnostics or compound screening.

The field of tissue engineering, pioneered by Robert Langer and his co-workers, combines the principles and methods of engineering and the life sciences towards the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function. The new developments on the various strategies of tissue engineering (TE) are aiming to understand the complexity of tissue remodeling and the inter-dependency of many associated variables. This clearly makes it a highly multi-disciplinary field that combines the expertise of different areas. Material scientists, engineers and biologists, in this regard form an important triad. *Materials science* focuses on the synthesis and characterization of required materials for the *engineers* to design the material in a way that it resembles the internal structure of the respective tissue or organ. Herein, the role of *biologists* becomes important who provide knowledge on how to introduce cells in these systems in order

to support their proliferation and differentiation into a specific tissue. Thus, a (bio)material is developed.

For further construction of bio(materials) as implantable tissue structures, the development of three-dimensional (3D) fluidic microsystems for cell culturing has become a necessity. Microfluidic technology offers a controlled environment, reduced reagent consumption and precision, promising an alternative for conventional biological laboratory methods. These microsystems involve the manipulation of small amounts of fluids using channels with dimensions at a micron level. Their specificity and flexibility is beyond the one of normal well plates or two-dimensional cell culturing films due to the ability to handle co-culture systems or to encompass from millions of cells to single cells, depending on a specific application.

In this context, the aim of the present work is to combine the knowledge of different fields of research in order to pave the way in the direction of 3D biodegradable fluidic microsystems for cell culturing and tissue engineering. The focus is laid on the development of biodegradable 3D microfluidic systems that can eventually sustain cell culturing and proliferation with subsequent tissue formation. Liver tissue is chosen as a model for the developed technology due to its complex structure that contains two main cell types, namely hepatocytes and endothelial cells, displaced in a three-layer architecture. The proposed research aims to overcome the shortcoming of the existing methods or technologies available worldwide, allowing the fabrication of such complex biodegradable microsystems.

The layout of the thesis is divided into different chapters that discuss specific topics towards the achievement of the final research objective. The multi-disciplinary aspect and collaboration between the different fields with varied competences is presented in Chapter 1.

The synthesis and characterization of novel poly(polyol sebacate)-derived elastomers is reported in Chapter 2. Poly(polyol sebacates) are thermoset materials and possess several characteristics such as biocompatibility, biodegradability, optical transparency etc. that makes them a good choice for developing microfluidic bioreactors. These polymers are approved by the

U.S. Food and Drug Administration (FDA) for use in tissue engineering and implant applications. Details on the synthesis and characterization of the obtained pre-polymers are discussed in this chapter. Furthermore, as synthetic biomaterials that mimic the ECM have a wide range of biomedical applications, one of the polymer films was also functionalized with gelatin via a chemical immobilization technique that has never been applied up to now for poly (polyol sebacate)s. This comes as an improvement to the already existing physio-sorption methods that lead to protein removal from the material.

Chapter 3 presents the use of the scaffolding technique of electrospinning for the development of porous structures. These scaffolds provide the three-dimensionality cells need in order to differentiate and maintain the specific phenotypic expression, as they mimic the extracellular matrix and are included in a later step of the final microsystem technology. The scaffolds developed in this chapter can stand alone as cell delivering porous membranes and can serve various applications, from soft to hard tissue engineering. Other enabling applications of these types of scaffolds such as cardiovascular tissue engineering are also mentioned.

Microfabrication technology is an interesting tool used to impart a specific topography and is presented in Chapter 4. The technology developed herein comprises of a complex 3D architecture for microfluidic environments that can be potentially used in tissue engineering applications, such as in the design of a tissue-engineered organ. As vital organs contain multiple types of cells, a porous membrane prepared by a classical scaffolding technique (i.e. electrospinning) has been integrated in the microfluidic devices. This strategy would enable not only cell (co-)culture, but also distribution of nutrients and oxygen.

In Chapter 5 the biocompatibility of the developed materials and electrospun structures is evaluated with different cell lines, demonstrating their non-cytotoxicity and potential for liver tissue engineering.

In conclusion, a perspective on the synthesized polymers and their utility in microsystem technology is presented. The presented technology possesses

the ability to relate to a variety of applications and can be easily transferred to all poly(polyol sebacates) present in literature. The unique feature of the developed microfluidic devices is the porous membrane that would impart the 3-dimensionality that cells need to grow, while the microchannels will guide the cells and align them in a specific way as to better mimic the native tissue.

## Samenvatting

In de laatste twee decennia is een multidisciplinaire aanpak van de afgifte van cellen in het lichaam opgekomen. Enerzijds is er de polymeerwetenschap die zich richt op de ontwikkeling van biocompatibele materialen voor celculturen en weefselregeneratietoepassingen. En anderzijds is er de (micro)-ingenieurswetenschap die een belangrijke rol speelt in het voorzien van een specifieke topografie. Deze topografie stuurt de cellen en biedt een structuur die gelijkaardig is aan die van weefsels. Zachte en flexibele elastomeren kregen meer en meer belangstelling, vooral door hun biodegradeerbaarheid en afstembare mechanische eigenschappen die het natuurlijk weefsel kunnen nabootsen. In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van nieuwe poly-(polyol sebacaat) elastomeren, gesynthetiseerd uit monomeren afkomstig het menselijk metabolisme, beschreven. De thermohardende eigenschappen van deze polymeren alsook hun optische transparantie maken dat ze ideale materialen zijn voor microsysteemtechnologie. Bijgevolg werden microfluidische systemen ontwikkeld uitgaande van deze polymeren, met als doel het ontwerp van een weefselgeregenereerd orgaan te vergemakkelijken. Een poreus membraan werd aangebracht in het microfluidisch systeem om co-kweken en de toelevering van voedingsstoffen aan de cellen mogelijk te maken. Bovendien kunnen de beschreven polymeren en microfluidische structuur dienen voor een brede waaier aan toepassingen, gaande van weefselregeneratie tot 'point-of-care' diagnostiek.

In het veld van weefselregeneratie, met Robert Langer en zijn medewerkers als baanbrekers, worden meerdere principes en methodes uit de ingenieurs-

en bio-wetenschappen samengebracht om biologische substituten te ontwikkelen die weefselfuncties kunnen herstellen, onderhouden of verbeteren. De nieuwe ontwikkelingen binnen weefselregeneratie zijn gericht op het beter begrijpen van de complexiteit die samengaat met de weefselreconstructie, en de onderlinge afhankelijkheid van de vele bijhorende variabelen. Dit maakt het duidelijk een multidisciplinair veld. Materiaalwetenschappers, ingenieurs en biologen vormen in dit verband een belangrijk triade. De *materiaalkunde* richt zich op de synthese en de karakterisering van de benodigde materialen, die de *ingenieurs* op zo'n manier structureren dat ze lijken op de interne structuur van het respectievelijke weefsel of orgaan. Hierin is de rol van de *biologen* niet te miskennen. Zij verschaffen de kennis om cellen in deze systemen te introduceren, en om hun proliferatie en differentiatie te ondersteunen tot een specifiek weefsel zich vormt. Aldus wordt een (bio)materiaal ontwikkeld.

Voor de constructie van (bio)materialen als implanteerbare weefselstructuren, is de ontwikkeling van driedimensionale (3D) microfluidische systemen voor celculturen een noodzaak geworden. Ze bieden een gecontroleerde omgeving waarin met meer precisie en een verminderd verbruik van reagentia gewerkt kan worden. Zo vormen ze een uitstekend alternatief voor de conventionele methoden die momenteel gebruikt worden in de biologische labo's. In deze microsystemen worden kleine hoeveelheden vloeistof gemanipuleerd via microscopisch kleine kanaaltjes. Hun specificiteit en flexibiliteit overtreft die van gebruikelijke 'well plates' of tweedimensionale films voor het kweken van cellen omdat ze de mogelijkheid bieden om diverse celtypes te co-kweken. Bovendien kunnen ze, afhankelijk van de toepassing, individuele tot miljoenen cellen bevatten.

Het doel van het huidig werk bestaat erin de kennis van de verschillende onderzoeksdisciplines te combineren om de tekortkomingen van de bestaande methoden en technologieën te verhelpen waardoor de constructie van driedimensionale, biologisch afbreekbare microfluidische systemen voor celculturen en weefselregeneratie mogelijk wordt. Deze systemen zullen dus uiteindelijk celculturen onderhouden en hun proliferatie

stimuleren tot een weefsel gevormd wordt. Leverweefsel werd gekozen als model voor de ontwikkelde technologie omwille van zijn complexe structuur. Dit weefsel bevat twee celtypes, namelijk hepatocyten en endotheelcellen, die in een drielaagse architectuur zijn georganiseerd.

Dit proefschrift bestaat uit verschillende hoofdstukken waarin de specifieke onderwerpen ter verwezenlijking van het uiteindelijke onderzoeksdoel besproken worden. Het multidisciplinair karakter en de samenwerking tussen de verschillende onderzoeksgebieden met hun respectievelijke competenties worden besproken in hoofdstuk 1. Aangezien synthetische biomaterialen, die de ECM nabootsen, een brede waaier aan biomedische toepassingen hebben, werd bovendien één van de polymeerfilms ook gefunctionaliseerd met gelatine. Hiertoe werd een chemische immobiliseringstechniek aangewend die tot nu toe nog nooit werd toegepast voor poly-(polyol sebacaat) polymeren. Dit is een verbetering ten opzichte van de reeds bestaande fysisorptie methoden die leiden tot verwijdering van proteïnen van het materiaal.

De synthese en de karakterisering van nieuwe poly-(polyol sebacaat) afgeleide elastomeren wordt beschreven in hoofdstuk 2. Poly-(polyol sebacaten) zijn thermohardende materialen en bezitten verscheidene eigenschappen zoals biocompatibiliteit, biodegradeerbaarheid, optische transparantie etc., wat hun een goede keuze maakt voor de ontwikkeling van microfluidische bioreactoren. Deze polymeren werden reeds goedgekeurd door de Amerikaanse Food and Drug Administration (FDA) voor gebruik in weefselregeneratie en implantaten. De synthese en de karakterisering van de verkregen pre-polymeren worden in detail besproken in dit hoofdstuk.

In hoofdstuk 3 wordt het gebruik van de techniek electrospinning besproken voor het ontwikkelen van poreuze draagstructuren. Deze draagstructuren bieden de driedimensionaliteit die cellen nodig hebben om hun differentiatie en specifieke phenotypische expressie te behouden. Ze worden opgenomen in een latere stap van de uiteindelijke microsysteemtechnologie. De draagstructuren ontwikkeld in dit hoofdstuk kunnen op zichzelf staan als poreuze membranen die cellen afleveren, maar kunnen ook van nut zijn voor verschillende toepassingen, gaande van zachte tot harde

weefselregeneratie. Andere mogelijke toepassingen voor dit soort draagstructuren worden ook aangehaald, zoals bvb. cardiovasculaire weefselregeneratie.

Microfabricagetechnologie is een interessant hulpmiddel dat toelaat om de materialen een specifieke topografie te geven. Dit wordt besproken in hoofdstuk 4. De hierin ontwikkelde technologie leidt tot een complexe driedimensionale architectuur voor microfluidische omgevingen. Deze kunnen dan gebruikt worden in toepassingen zoals weefselmanipulatie, bvb. bij het ontwerpen van een weefselgeregenereerd orgaan. Omdat vitale organen meerdere celtypes bevatten, werd een poreus membraan bereid volgens electrospinning en geïntegreerd in de microfluidische systemen. Deze strategie zou niet alleen de (co-)cultuur van cellen mogelijk maken maar bevordert ook de toevoer van nutriënten en zuurstof.

In hoofdstuk 5 wordt de biocompatibiliteit van de ontwikkelde materialen en structuren, bekomen via electrospinning, geëvalueerd door middel van verschillende cellijnen. Zowel hun niet-cytotoxiciteit als hun potentieel voor de constructie van leverweefsel worden gedemonstreerd.

Tot slot wordt een perspectief geboden op de gesynthetiseerde polymeren en hun toepasbaarheid in microsysteemtechnologie. De voorgestelde technologie kan aangewend worden voor verschillende toepassingen en kan makkelijk overgedragen worden op alle poly-(polyol sebacaten) die vermeld worden in de literatuur. De unieke eigenschap van de ontwikkelde microfluidische systemen is het poreuze membraan dat de driedimensionale structuur voorziet die cellen nodig hebben om te groeien, terwijl de microkanaaltjes de cellen kunnen leiden en op een specifieke manier kunnen organiseren om het natuurlijke weefsel beter na te bootsen.