

Ontwikkeling van poreuze biomaterialen via de Bioplotter technologie

Thomas Billiet

Promotor: prof. dr. Peter Dubruel

Begeleider: Tim Desmet

Masterproef ingediend tot het behalen van de academische graad van

Master in de ingenieurwetenschappen: biomedische ingenieurstechnieken

Vakgroep Organische chemie

Voorzitter: prof. dr. Pierre De Clercq

Faculteit Ingenieurwetenschappen

Academiejaar 2008-2009



Woord vooraf

De dankbetuiging gericht aan de begeleider overstijgt het loutere beleefdheidsaspect. Zonder zijn professionele kennis, zijn engagement om zijn kennis te delen, en het aanleren van de gebruikte technieken, zou dit werk niet tot stand zijn gekomen. Oprechte dank en waardering dus alvast voor T. Desmet voor het aanreiken van een rugzak vol wetenschappelijke *'know how'*.

Graag zou ik mijn dank ook betuigen aan V. Boterberg en dr. S. Van Vlierberghe voor het verlenen van technische bijstand, D. Schaubroeck voor SEM en profilometrie, C. Guerin voor CFM, E. Berneel voor celtesten, en T. Desmet voor XPS en AFM. Voor het aanreiken van het thesisonderwerp, het gebruik van de laboratoria en labomaterialen, en, voor de enthousiaste raadgevingen, richt ik mijn dank tot Prof. dr. P. Dubruel en emeritus Prof. dr. E. Schacht.

Tenslotte wil ik graag alle medestudenten en labomensen bedanken voor de vele discussies over thesissen, en minder serieuze zaken, tijdens de middagpauzes. Bijzondere waardering gaat *'last but not least'* uit naar H. Houbrix, voor niet universitair gerelateerde steun en ontspanning.

Opbouw van de Scriptie

Het is mijn visie dat een geïntegreerde aanpak/opbouw van een studie de lezer het meeste comfort verschaft. Vanuit deze visie wordt dan ook geopteerd voor een driedelig gestructureerde tekst waarin de afzonderlijke delen steeds uit het voorgaande deel voortvloeien. Zodoende wordt een mooi geheel gevormd waarbij de lezer niet van het ene deel naar het andere deel moet springen om het globale overzicht te kunnen behouden.

De opbouw sluit daardoor eerder aan bij deze van een wetenschappelijk artikel:

1. Deel 1: Literatuurstudie. In dit eerste deel wordt getracht om een algemeen beeld te schetsen van de huidige inzichten en probleemsituaties in de materie. Dit behelst de hoofdstukken 1-4. Vanuit dit algemeen kader wordt in hoofdstuk 5 reeds een strategie vooropgesteld met betrekking tot het experimentele deel van deze scriptie.
2. Deel 2: Materialen en Methoden. Vanuit het algemene kader uit deel 1 worden in dit deel de experimentele opstellingen in detail beschreven (hoofdstukken 6-8). Hierbij zal ook aandacht worden geschonken aan theoretische benaderingen van de proefopzetten, cfr. reactieschema's e.d.. Dit deel moet met andere woorden worden gezien als een koppeling tussen de geselecteerde strategie uit deel 1 en de bekomen resultaten uit deel 3.
3. Deel 3: Resultaten en Bespreking. Dit deel is een sluitstuk dat voortvloeit uit het tweede deel, en verwijst naar het eerste deel. Beter geformuleerd komt dit erop neer dat de resultaten voortgebracht worden door de gebruikte technieken (deel 2), en de waarnemingsgegevens op hun beurt als een '*feedback*' dienen voor de algemene theoretische visies (deel 1). De hoofdstukken 9-11 bevatten de noodzakelijke experimentele gegevens om de bespreking te kunnen volgen. Daar waar de leesbaarheid van de tekst noodloos zou worden bezwaard, er wordt hierbij vooral aan statistische uitwerkingen van gegevens gedacht, werd geopteerd om verwerkingsresultaten in appendix te plaatsen. De appendices moeten dus als een onderdeel van de *Resultaten en Bespreking* worden beschouwd.

Korte Samenvatting

Als dragermateriaal verschaffen biodegradeerbare polymeren mechanische stabiliteit op korte termijn en fungeren ze als template voor de 3D organisatie van het zich ontwikkelende weefsel in de conventionele *'tissue engineering approach'*.

Deze scriptie rapporteert het verrichte onderzoek omtrent de ontwikkeling van biologisch actieve polyesters voor processing met de Bioplotter. Dit eindwerk stelde zich tot doel: (1) synthese, eindgroepmodificatie, en karakterisatie van p(D,L-LA-co- ϵ -CL) random copolymeren; (2) het ontwikkelen van een geschikte oppervlaktemodificatie methodologie voor het verbeteren van de biocompatibiliteit, en subsequeante screening van de verschillende processtappen, en; (3) optimalisatie van de Bioplotter parameterset voor het printen van 3D PCL structuren.

Random p(D,L-LA-co- ϵ -CL) copolymeren werden volgens de *'in-house'* technologie aangemaakt en eindgroep gemodificeerd tot methacrylaat getermineerde copolymeren. De morfologie van de aangemaakte batchen werd onderzocht aan de hand van $^1\text{H-NMR}$, GPC, TGA en DSC. De opbrengst van de polymerisaties bedroeg gemiddeld 60 % met een rendement van nagenoeg 100 % voor de eindgroepmodificatie. De copolymeren bezitten ideale eigenschappen voor de productie van cel-scaffold constructies.

PCL films, vervaardigd door spincoaten werden succesvol gemodificeerd in drie stappen (plasma voorbehandeling, UV geïnduceerde graft polymerisatie met AEMA, gelatine immobilisatie via carbodiimide koppeling). De aanwezigheid van vrije amines werd kwantitatief bepaald met ninhydrine (UV-VIS) en CFM. Uit deze laatste techniek kan afgeleid worden dat het polymeroppervlak van PCL niet homogeen bedekt werd met een laag pAEMA. Verschillende *'mushroom-like'* clusters pAEMA waren zichtbaar. Visualisatie van de clusters was verder ook mogelijk via SEM, AFM en profilometrie. De resultaten bekomen met deze diverse technieken bevestigden elkaar en vullen elkaar aan. De bevochtigbaarheid en hoeveelheid vrije amines op de films kon worden gecontroleerd door alteratie van de concentratie en grafftijd. XPS staaft het succes van de graft- en immobilisatiestap, en werd gebruikt om de reinigingsprocedure te evalueren. Analyse van de films met FT-IR, SEM en CFM bevestigde de aanwezigheid van een homogene proteïnelaag na covalente immobilisatie, en SPR toonde de verhoogde adsorptie en retentie van interessante biomoleculen (cfr. laminine, fibronectine). Tenslotte demonstreerde analyse met celculturen de perspectieven van de ontwikkelde methodologie voor een efficiënte oppervlaktemodificatie van PCL-gebaseerde tissue engineered scaffolds.

PCL scaffolds werden geplot met variërende parametersets. De primaire focus richtte zich op de extrusietemperatuur en spatiëring van de struts. Er werd aangetoond dat aandacht voor beide parameters ons in staat stelt om hoog poreuze, en 100 % interconnectieve, scaffolds te produceren, waarvan de porositeit convergeert naar de theoretisch te verwachten waarde.

Inhoudsopgave

| | |
|--|------------|
| Woord vooraf | i |
| Korte Samenvatting | iii |
| Inhoudsopgave | iv |
| Lijst met gebruikte Afkortingen en Symbolen | vii |
| | |
| I LITERATUURSTUDIE | 1 |
| | |
| 1 Introductie in de Biomaterialen | 2 |
| 1.1 Metalen | 4 |
| 1.1.1 Metalen en biocompatibiliteit | 4 |
| 1.1.2 Metaal als constructiemateriaal voor biomedische toepassingen | 6 |
| 1.2 Keramieken | 6 |
| 1.2.1 Bioinerte keramieken | 7 |
| 1.2.2 Bioactieve, niet-resorbeerbare keramieken | 8 |
| 1.2.3 Bioactieve, resorbeerbare keramieken | 8 |
| 1.3 Polymeren | 8 |
| 1.3.1 Polymeren: de basis | 8 |
| 1.3.2 Polymeren als constructiemateriaal voor biomedische toepassingen | 10 |
| 1.4 Composieten | 11 |
| 1.4.1 Particulaire composieten | 12 |
| 1.4.2 Fibreuze composieten | 12 |
| 1.4.3 Poreuze composieten | 13 |
| | |
| 2 Tissue Engineering | 14 |
| 2.1 Definitie, Doel en Historiek | 14 |
| 2.2 Materialen en Methodes: algemene Principes en Bouwstenen | 16 |
| 2.2.1 Celidentificatie, -isolatie en upscaling | 18 |
| 2.2.2 Biomaterialen in tissue engineering | 20 |
| 2.2.3 Scaffolds | 21 |
| 2.2.4 Bioreactoren | 22 |
| 2.3 Weefsel Architectuur | 23 |
| 2.4 Materiaal-Cel Interacties | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3 Scaffold Ontwerp: Conventionele vs. RP Technieken | 30 |
| 3.1 Conventionele Technieken | 30 |
| 3.2 Rapid Prototyping als krachtig Alternatief | 31 |
| 3.3 3D-Biplotter | 34 |
| 3.3.1 3D-Biplotter | 35 |
| 3.3.2 Bioprinting | 37 |
| 4 Oppervlaktemodificatie | 38 |
| 4.1 Redenen voor Oppervlaktemodificatie | 38 |
| 4.2 Modificatie van Oppervlakken | 39 |
| 4.2.1 Introductie van functionele groepen op oppervlakken | 39 |
| 4.2.2 Immobilisatie van bioactieve componenten | 43 |
| 5 Vooropgestelde Strategie en Doelstelling | 45 |
| 5.1 Ontwerp van Biodegradeerbare Elastische Poly(D,L-LA-co- ϵ -CL) Copolymeren | 45 |
| 5.1.1 Synthese van PCL - PLA - PLA/PCL | 45 |
| 5.1.2 Eindgroepmodificatie van de uitgangspolymeren | 46 |
| 5.2 Selectie van een geschikte Modificatietechniek | 47 |
| 5.3 Toepassing van de 3D-Biplotter Techniek | 47 |
| II MATERIALEN EN METHODEN | 49 |
| 6 Synthese van Poly(D,L-LA-co-ϵ-CL) en Poly(D,L-LA-co-ϵ-CL) BMA | 50 |
| 6.1 Ontwerp van Biodegradeerbare Elastische Poly(D,L-LA-co- ϵ -CL) Copolymeren | 50 |
| 6.1.1 Reactiemechanisme | 51 |
| 6.2 Eindgroepmodificatie met Methacrylaten | 53 |
| 6.3 Karakterisatie van de Polymeren | 53 |
| 6.3.1 Proton - nucleaire magnetische resonantie | 53 |
| 6.3.2 Gel permeatie chromatografie | 54 |
| 6.3.3 Thermogravimetrische analyse | 54 |
| 6.3.4 Differentiële scanning calorimetrie | 55 |
| 7 Post-plasma Grafting van AEMA op PCL en aansluitende Immobilisatie van Biomolecules | 56 |
| 7.1 Vervaardigen van dunne PCL Films | 56 |
| 7.2 Voorafgaande Ar-plasmabehandeling van de PCL Films | 56 |
| 7.2.1 Ontladingsmechanisme van een DBD | 57 |
| 7.3 Plasma-post Irradiation grafting van AEMA vanaf de PCL Filmoppervlakken | 58 |
| 7.4 Covalente Immobilisatie van Gelatine B op de PCL Films | 60 |
| 7.5 Oppervlaktekarakterisatie | 61 |
| 7.5.1 Kleuringen | 61 |
| 7.5.2 DPPH metingen | 61 |
| 7.5.3 Ninhydrine assay metingen | 62 |
| 7.5.4 Statische contacthoekmetingen | 63 |
| 7.5.5 X-stralen foto-elektron spectroscopie | 64 |
| 7.5.6 Infrarood spectroscopie | 65 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 7.5.7 | Atomic force microscopy | 65 |
| 7.5.8 | Confocale fluorescentie microscopie | 65 |
| 7.5.9 | Scanning electron microscope | 66 |
| 7.5.10 | Profilometrie | 67 |
| 7.5.11 | Surface plasmon resonance | 67 |
| 7.6 | Celculturen | 69 |
| 8 | 3D-Biplotter Toepassingen | 71 |
| 8.1 | Introductie in de 3D-Biplotter Techniek | 71 |
| 8.2 | Plotten van Scaffolds | 73 |
| 8.3 | Scanning Electron Microscope | 73 |
| III | RESULTATEN EN BESPREKING | 74 |
| 9 | Evaluatie van de gesynthetiseerde Random Copolymeren | 75 |
| 9.1 | Proton - Nucleaire Magnetische Resonantie | 75 |
| 9.2 | Gel Permeatie Chromatografie | 78 |
| 9.3 | Thermogravimetrische Analyse | 79 |
| 9.4 | Differentiële Scanning Calorimetrie | 81 |
| 10 | Ontwikkeling van een geschikte Oppervlaktemodificatie | 83 |
| 10.1 | Post-plasma Grafing van AEMA op PCL Films en aansluitende Immobilisatie met GelB | 83 |
| 10.2 | Evaluatie van de Modificatie Techniek | 84 |
| 10.2.1 | Visuele controle van de modificatie techniek | 84 |
| 10.2.2 | Bepaling van het aantal (hydro)peroxiden | 85 |
| 10.2.3 | Kwantitatieve bepaling van het aantal vrije amines | 85 |
| 10.2.4 | Evolutie van de bevochtigbaarheid | 87 |
| 10.2.5 | Morfologie van de films | 90 |
| 10.2.6 | Kwalitatieve bepaling van de proteïne-affiniteit | 97 |
| 10.3 | Invloed van de Oppervlaktemodificatie op Celinteractiviteit | 99 |
| 11 | Introductie in en Optimalisatie van de 3D-Biplotter techniek | 101 |
| 11.1 | Bespreking van de ondervonden Probleemstellingen | 101 |
| 11.1.1 | Software-matige problemen | 101 |
| 11.1.2 | Hardware-matige problemen | 102 |
| 11.2 | Plotten van poreuze Scaffolds via de Biplotter Techniek | 103 |
| 11.3 | Karakterisatie van de geplotte Structuren | 107 |
| 11.3.1 | Karakterisatie van de PCL scaffolds via SEM | 107 |
| 11.3.2 | Berekening van de porositeit van de scaffolds | 111 |
| | Algemene Bespreking en Besluit | 114 |
| | Bibliografie | 117 |
| | Appendices | 125 |

Lijst met gebruikte Afkortingen en Symbolen

| | |
|-------------------|---------------------------------------|
| AAc | : acrylzuur |
| AEMA | : 2-aminoethyl methacrylaat |
| AFM | : ‘atomic force microscopy’ |
| bcc | : ‘body-centered cubic’ |
| BMSC | : ‘bone marrow stromal cells’ |
| CAD | : ‘computer aided design’ |
| CAM | : ‘computer aided manufacturing’ |
| CFM | : confocale fluorescentie microscopie |
| CL | : ϵ -caprolacton |
| CNC | : ‘computer numerical control’ |
| CPS | : ‘counts per second’ |
| CT | : ‘computed tomography’ |
| DBD | : ‘dielectric barrier discharge’ |
| DP | : polymerisatiegraad |
| DMEM | : ‘dulbecco’s modified eagle medium’ |
| DMF | : N,N-dimethylformamide |
| DNA | : deoxy ribonucleïnezuur |
| DPPH | : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl |
| DSC | : differentiële scanning calorimetrie |
| ECM | : extra cellulaire matrix |
| EDC | : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) |
| EDTA | : ‘ethylenetriamineacetic acid’ |
| ESP | : ‘electrospinning’ |
| EtOH | : ethanol |
| Et ₃ N | : triethylamine |
| fcc | : ‘face centered cubic crystal’ |
| FCS | : feotal kalf serum |
| FDA | : ‘Food and Drug Administration’ |
| FDM | : fused deposition modelling |
| FGF | : fibroblast groeifactor |
| FT–IR | : ‘fourier transform - infra red’ |
| GelB | : gelatine type B |
| GelMOD | : gemodificeerd gelatine |
| GFP | : ‘green fluorescent protein’ |

| | |
|-----------|---|
| GPC | : gel permeatie chromatografie |
| HA | : hydroxyapatiet |
| HOAc | : azijnzuur |
| HCA | : hydroxy-koolstof apatiet |
| hcp | : 'hexagonal close packed' |
| hESC | : 'human embryonic stem cell' |
| Hi-ResTGA | : hoge resolutie TGA |
| hMSC | : 'human mesenchymal stem cell' |
| H-NMR | : proton-nucleaire magnetische resonantie |
| HXD | : 1,6-hexaandiol |
| IR | : infrarood |
| KT | : kamertemperatuur |
| LA | : lactide |
| MeOH | : methanol |
| MRI | : magnetische resonantie beeldvorming |
| mRNA | : messenger ribonucleïnezuur |
| MW | : gemiddeld moleculair gewicht |
| MWCO | : moleculair gewicht 'cut-off' |
| p | : overschrijdingskans |
| pAEMA | : poly(2-aminoethyl methacrylaat) |
| PCL | : polycaprolacton |
| PCL-AEMA | : PCL film met AEMA op gegrift |
| PCL-GelB | : PCL film met covalente gelatine B immobilisatie |
| PCL-Fn | : PCL film met fysische adsorptie van fibronectine |
| P(CL-LA) | : poly(caprolacton-lactide) |
| PCLM | : fase contrast licht microscopie |
| PEG | : polyethyleen glycol |
| PEO | : polyethyleen oxide |
| PD | : polydispersiteit |
| PGA | : polyglycolide |
| PLA | : polylactide |
| PLGA | : poly(lactide-co-glycolide) |
| PMA | : 'premarket approval' |
| PMMA | : poly(methyl methacrylaat) |
| ppm | : 'parts per million' |
| PPO | : polyphenyleen oxide |
| PS | : polystyreen |
| P/S | : penicilline/steptomycine |
| PSM | : 'plasma surface modification' |
| PZT | : piëzo-elektrische transducer |
| RGD | : peptide sequentie van de aminozuren arginine-guanine-asparaginezuur |
| ROP | : ringopeningpolymerisatie |
| RP | : 'rapid prototyping' |
| RM | : 'rapid manufacturing' |
| RT | : 'rapid tooling' |
| RU | : relatieve eenheden |
| SAM | : 'self assembled monolayer' |

| | |
|----------------------------------|---|
| SCA | : 'static contact angle' |
| SCC | : 'stress corrosion cracking' |
| SEI | : 'secondary electron mode' |
| SEM | : 'scanning electron microscope' |
| SFF | : 'solid freeform fabrication' |
| SLS | : 'selective laser sintering' |
| SMC | : 'smooth muscle cell' |
| SME | : 'shape memory effect' |
| Sn(Oct) ₂ | : tin(II) bis-(2-ethylhexanoaat) |
| SPR | : surface plasmon resonance |
| STL | : 'stereolithography' |
| Sulfo-NHS | : sulfo-N-hydroxysuccinimide |
| TAIC | : trichloro acetyl isocynaat |
| TCP | : 'tricarbon phosphate' |
| TCPS | : 'tissue culture plates' |
| TGA | : thermogravimetrische analyse |
| THF | : tetrahydrofuran |
| TIR | : totale interne reflectie |
| TMS | : tetramethylsilaan |
| tpm | : toeren per minuut |
| TTAGGG/CCCTAA | : sequentie van DNA basenparen |
| UHMWPE | : 'ultra heigh molecular weight polyethylene' |
| UV | : ultra violet |
| VD | : 'volume discharge' |
| VEGF | : 'vascular endothelial growth factor' |
| WSC | : 'water soluble carbodiimide' |
| XPS | : 'X-ray photoelectron spectroscopy' |
| Zn(OAc) ₂ | : zink acetaat |
| d ₁ | : strut diameter |
| d ₂ | : interstrut afstand |
| d ₃ | : hoogte van strut in Z-richting |
| e ⁻ | : elektron |
| ε_{kl} | : 'strain' |
| C _{ijkl} | : elasticiteitsmodulus tensor |
| F | : constante van Faraday |
| f _{CL} /f _{LA} | : moleculaire procentuele samenstelling in de voeding |
| F _{CL} /F _{LA} | : berekende procentuele samenstelling |
| I _B | : 'bioactivity index' |
| l | : zijde van een kubus |
| M _i | : moleculair gewicht van molecule i |
| M _n | : 'number average molecular weight' |
| M _w | : 'weight average molecular weight' |
| N _i | : aantal moleculen i |
| n _x | : brekingsindex |
| n _{xy} | : aantal struts in een laag |
| n _z | : aantal struts in de Z-richting |
| R | : de gasconstante |

| | |
|---------------------|---|
| $t_{1/2}$ | : tijd waarbij de helft van het materiaal gedegradeerd is |
| t_{50bb} | : de in beslag genomen tijd, nodig om 50 % van het beschikbare interfaseoppervlak te bedekken |
| T | : temperatuur |
| T_g | : glastransistie temperatuur |
| $T_{g,DSC}$ | : glastransistie temperatuur bepaald via DSC |
| $T_{g,Fox}$ | : glastransistie temperatuur berekend met de Fox vergelijking |
| T_m | : smelttemperatuur |
| $t_{pullback}$ | : tijdsperiode waarmee de Auger schroef terugdraait |
| T_{vl} | : vloeitemperatuur |
| σ_{ij} | : 'stress' |
| ΔE^0 | : standaard elektrochemische potentiaal |
| θ_b | : brekingshoek |
| θ_i | : invalshoek |
| θ_k | : kritische hoek |
| θ_r | : reflectiehoek |
| .stl | : (STT) formaat van dataopslag |
| $v_{corner\ delay}$ | : de snelheid waarmee de extrusiekop afremt |
| V_{kubus} | : totaal volume van de kubus |
| V_{laag} | : volume materiaal in één laag |
| $v_{pullback}$ | : snelheid waarmee de Auger schroef in tegengestelde richting draait |
| v_s | : snelheid waarmee de Auger schroef draait |
| $V_{scaffold}$ | : totale volume materiaal in de scaffold |
| V_{strut} | : volume materiaal in één strut |
| v_{xy} | : snelheid waarmee de extrusiekop in het XY-vlak beweegt |
| W_{CL} | : gewichtsfractie aan CL |
| W_{LA} | : gewichtsfractie aan LA |
| % w/w | : gewichtsprocent |

Deel I

LITERATUURSTUDIE

Hoofdstuk 1

Introductie in de Biomaterialen

Een biomateriaal wordt gedefinieerd als elk materiaal (natuurlijk, synthetisch, of combinaties ervan) dat wordt gebruikt bij de vervaardiging van apparaten, bestemd ter vervanging van een levend systeem of om te functioneren in nauw contact met levende weefsels. Deze materialen kunnen ingedeeld worden op basis van functie of op basis van het anatomische gebruik (vb. hart, longen, het musculaire stelsel, het respiratoire stelsel, ...). In laatstgenoemd geval kan een verdergaand onderscheid worden gemaakt naargelang het anatomische niveau dat wordt beschouwd: weefsel, orgaan, of systemisch niveau. In dit werk wordt een onderverdeling gehanteerd die steunt op de classificatie van het materiaal op zich. Op deze manier kunnen algemeen 4 primaire klassen biomaterialen onderscheiden worden:

1. Metalen (zie 1.1);
2. Keramieken (zie 1.2);
3. Polymeren (zie 1.3);
4. Composieten (zie 1.4);

De komst van een aseptische chirurgische techniek, een techniek ontwikkeld door Dr. J. Lister rond 1860, maakte het gebruik van biomaterialen praktisch haalbaar. Voordien werd het succes van chirurgische ingrepen sterk gelimiteerd door infectieverschijnselen. In tabel 1.1 wordt een overzicht gegeven met betrekking tot enkele belangrijke ontwikkelingen in het domein van de implantaten. Voor polymeren in het bijzonder is WO II een mijlpaal in de evolutie tot alomtegenwoordig biomateriaal. Gevechtspiloten die oogkwetsuren opliepen door penetratie van fragmenten PMMA, afkomstig uit het vizier van hun vlieghelm, vertoonden geen nadelige chronische reacties. Het resultaat was het wijdverspreide gebruik van PMMA voor herstel van de cornea en beschadigd schedelbot. [1]

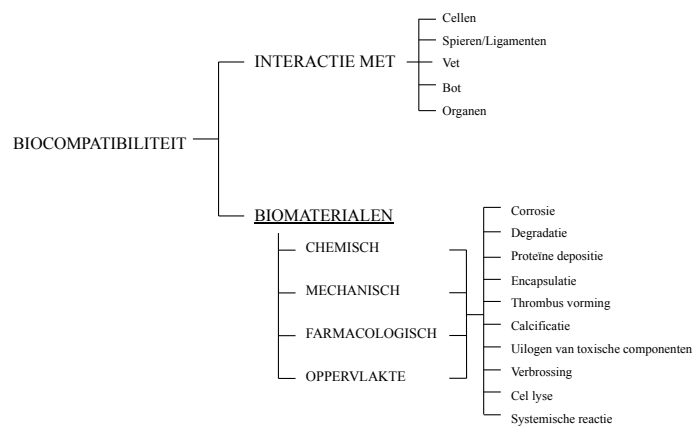
Het welslagen van een biomateriaal en zijn toepassing als implantaat berust onder andere op (i) de gezondheidstoestand van de patiënt; (ii) de competentie van de chirurg die de ingreep en monitoring van het proces uitvoert, en; (iii) de eigenschappen en biocompatibiliteit van het implantaat [1]. De biocompatibiliteit en karakteristieken van het biomateriaal zijn met andere woorden aspecten waar rekening mee dient te worden gehouden bij de productontwikkeling. Het is van het grootste belang dat de materialen waaruit implantaten worden vervaardigd geaccepteerd worden door de omliggende weefsels en het lichaam als geheel. Zo zou het onaccepteerbaar zijn dat een artificiële hartklep bloedklontering zou veroorzaken. Biocompatibiliteit wordt gedefinieerd als de mogelijkheid van een materiaal om aan een specifieke toepassing te voldoen met een geschikte 'host response' [2]. Figuur 1.1 geeft een schematische illustratie van het concept biocompatibiliteit.

Materialen die een in vivo toepassing kennen of voor ogen hebben dienen 'FDA approved' te zijn. Indien een voorgesteld materiaal equivalent is met een materiaal reeds in gebruik vóór de FDA wetgeving uit 1976, kan de FDA dit goedkeuren op basis van een 'Pre-market Approval' (PMA). Dit proces, gerechtvaardigd door ervaring met een gelijkaardig materiaal, reduceert de tijd en kosten voor goedkeuring van het voorgestelde materiaal. [1]

In volgende subsecties worden de klassen van biomaterialen bondig voorgesteld.

Tabel 1.1: Enkele mijlpalen uit de geschiedenis van implantaten [1]

| Jaar | Onderzoeker | Ontwikkeling |
|---|--|--|
| Late 18 ^{de} - 19d ^e eeuw | | Verskillende metalen devices voor het fixeren van fracturen; draden en en pinnen uit Fe, Au, Ag, en Pt |
| 1860-1870 | J. Lister | Aseptische chirurgische technieken |
| 1886 | H. Hansmann | Ni-plated stalen fractuur-plaat |
| 1893-1912 | W.A. Lane | Stalen schroeven en platen voor fractuur fixatie |
| 1909 | A. Lambotte | Brass, Al, Ag, en Cu plaat |
| 1912 | Sherman | Vanadium stalen plaat, eerste legering exclusief ontwikkeld voor medische toepassingen |
| 1924 | A.A. Zierold | Stellite [®] (CoCrMo legering), een beter materiaal dan Cu, Zn, Steel Mg, Fe, Ag, Au, en Al legering |
| 1926 | M.Z. Lange | 18-8sMo (2-4% Mo) stainless steel voor het bekomen van een grotere corrosion resistance dan 18-8 stainless steel |
| 1926 | E.W. Hey-Groves | Gebruikte carpenter's screw voor femorale nek fractuur |
| 1931 | M.N. Smith-Petersen | Ontwikkelde de eerste femorale nek fractuur fixatie nagel, origineel gemaakt van stainless steel, later werd Vitallium [®] gebruikt |
| 1936 | C.S. Venable, W.G. Stuck | Vitallium; 19 w/o Cr-9 w/o Ni stainless steel |
| 1938 | P. Wiles | Eerste 'total hip replacement' |
| 1946 | J. en R. Judet | Eerste biomechanisch ontworpen heup prothese; eerste gebruik van plastieken bij 'joint replacement' |
| 1940s | M.J. Dorzee, A. Franceschetti | Acrylaten voor vervanging van de cornea |
| 1947 | J. Cotton | Ti en Ti legeringen |
| 1952 | A.B. Voorhees, A. Jaretzta, A.H. Blackmore | Eerste bloedvat vervanging gemaakt van textiel |
| 1958 | S. Furman, G. Robinson | Eerste succesvolle directe hartstimulatie |
| 1958 | J. Charnley | Eerste gebruik van acrylic bot cement bij 'total hip replacements' |
| 1960 | A. Starr, M.L. Edwards | Hartklep |
| 1970s | W.J. Kolff | Experimentele totale hartvervanging |
| 1990s | | Implantaten die bot ingroei toelaten |
| 1990s | | Controversie over siliconen borst implantaten |
| 2000s | | Tissue Engineering |
| 2000s | | Nanoscale materialen |



Figuur 1.1: Schematische illustratie van het concept biocompatibiliteit [1]

1.1 Metalen

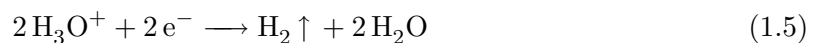
Het gebruik van metalen als implantatiemateriaal gaat terug tot de late 18^{de} begin 19^{de} eeuw, waar ze werden ingezet als hulpmiddelen voor botfracturen en de vervaardiging van draden en pinnen (zie tabel 1.1). Hedendaags is het gebruik van biometalen voornamelijk gekend vanuit de tandartsindustrie en de orthopedie (bv. bij heupvervanging). Andere gekende toepassingen zijn o.a. het vervaardigen van stents en catheters. Hun succes is terug te brengen tot de excellente elektrische en thermische geleidbaarheid, en de uitstekende mechanische eigenschappen [3].

1.1.1 Metalen en biocompatibiliteit

De vatbaarheid van metalen voor corrosie verschijnselen wordt als hun belangrijkste negatieve eigenschap vermeld. Corrosie kan beschouwd worden als de ongewenste chemische reactie van een metaal met zijn omgeving. Door corrosie worden de mechanische eigenschappen van het metaal aangetast en ontstaan corrosieproducten, dewelke vaak nefast zijn voor de biocompatibiliteit. Nefast in die zin dat het lichaam de meeste metalen slechts in zeer geringe hoeveelheden verdraagt. Het metaal ondergaat een continue degradatie tot oxides, hydroxides, of andere componenten. Corrosie grijpt plaats wanneer metaalatomen geïoniseerd worden en in oplossing gaan, of combineren met zuurstof (of andere verbindingen) in oplossing tot formatie van een verbinding die ofwel oplost, ofwel loskomt van de bulk [3]. Aan de anode (positieve elektrode) wordt het metaal geoxideerd door een verlies aan valentie-elektronen (1.1):



Lichaamsvocht is een samenstelling van water met daarin zuurstof, diverse ionen (o.a. Cl^{-} en OH^{-}) en proteïnes. Bijgevolg is dit een agressief milieu voor geïmplanteerde metalen enerzijds, anderzijds vervult het de rol van elektrolyt. Het elektrolyt sluit het elektrische netwerk tussen de anode en de cathode, met vorming van een elektrochemische cel waarin reactie 1.1 de anodische oxidatiereactie voorstelt. Aan de cathode gebeurt een kathodische reductiereactie, waarvan de belangrijkste zijn:



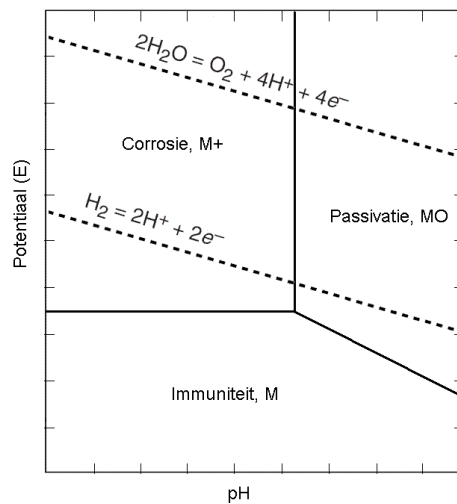
Er bestaan verscheidene mogelijkheden betreffende de corrosieomstandigheden: (1) in een vochtige omgeving kan zuurstofcorrosie optreden (1.2). Deze reactie gaat door in neutraal tot basisch milieu, waarbij het metaal gelijktijdig reageert tot oxide; (2) Indien meerdere metaalsoorten aanwezig zijn kan galvanische of bimetallische corrosie optreden. Het metaal met de laagste Nernst potentiaal gedraagt zich als anode. Bijgevolg wordt het afgeraden een combinatie van metalen te gebruiken; (3) Galvanische corrosie met slechts één metaal kan optreden als gevolg van inhomogeniteiten in het metaal (cfr. korrelgrenzen). Daarnaast bestaan nog enkele indirecte vormen van corrosie, met name ‘*stress corrosion cracking*’ (SCC), ‘*pitting*’, ‘*crevice corrosion*’, en ‘*fretting*’. Voor een uitgebreide bespreking van deze corrosie verschijnselen wordt verwezen naar [3].

Bij corrosie van sommige metalen wordt een ondoordringbaar laagje metaaloxide gevormd, waardoor het corrosieproces wordt geïnactiveerd. Dat is de verklaring voor het feit dat bv. titanium nauwelijks corrodeert, hoewel het op zichzelf zeer gevoelig is voor corrosie ($\Delta E^0 = -1,63V$)¹. Passivatie is de algemene term voor het optreden van dit proces.

Het potentiaalverschil dat wordt bekomen kan berekend worden uit de Nernst vergelijking:

$$E = E^0 + (RT/nF)\ln[M^{+n}] \quad (1.6)$$

waarin R de gasconstante is, E^0 de Standaard Elektrochemische Potentiaal, T de absolute temperatuur, F de constante van Faraday, en n het aantal mol elektronen. Op basis van vergelijking 1.6, de oplosbaarheid van de degradatieproducten, en de evenwichtsconstanten van de reactie in functie van de pH van het medium, kan een Pourbaixdiagram worden opgesteld (zie fig. 1.2). In dergelijk Pourbaixdiagram kan men drie belangrijke regio's onderscheiden: (i) een corrosieregio (metaal in oplossing $> 10^{-6}M$ bij evenwicht); (ii) een passivatieregio met vorming van een stabiele vaste verbinding: een oxide, hydroxide, hydride of zout van het metaal (evenwicht tussen metaal en zijn reactieproducten bij concentratie $< 10^{-6}M$) en; (iii) een immuniteitsregio (evenwicht tussen metaal en zijn ionen bij concentratie $< 10^{-6}M$). $10^{-6}M$ is een arbitrair gekozen concentratie voor het onderverdelen in de verschillende regionen. Door toepassen van een dergelijk diagram kan bij een gegeven pH en potentiaal worden nagegaan wat de toestand van het metaal zelf is (aan de hand van de regio waarin het zich bevindt) alsook de toestand van de omgeving (aan de hand van de stippellijnen: de stabiliteitslijnen van water). Boven de stippellijn gaat de oxidatiereactie door (naar rechts), en vice versa. [3]



Figuur 1.2: Een algemeen Pourbaixdiagram

Om een goede biocompatibiliteit van het metaal te garanderen dient het metaal zich te gedragen als een immuun (inert) of gepassiveerd materiaal. Aan de hand van de Pourbaixdiagramma van de respectievelijke metalen/legeringen, uitgaande van de pH van het weefsel², kan worden nagegaan of het metaal/legering in aanmerking komt voor gebruik als biomateriaal.

¹ ΔE^0 is de *Standaard Elektrochemische Potentiaal*

²Dit is slechts een indicatie aangezien zowel de samenstelling van lichaamsvocht, als de reactiesnelheden worden verwaarloosd in deze benadering

1.1.2 Metaal als constructiemateriaal voor biomedische toepassingen

De belangrijkste metalen die gebruikt worden voor de vervaardiging van implantaten worden hier aangehaald. Specificaties zijn terug te vinden in *The Biomedical Engineering Handbook: Metallic Biomaterials* [3].

‘Stainless Steels’. De hedendaags meest gebruikte ‘stainless steels’ zijn de ‘*austenitic*³ *stainless steels*’ type 316 en 316L. Enkele elementen zoals molybdeen (type 317), chroom en koolstof worden toegevoegd in variërende percentages teneinde de corrosieweerstand te verbeteren. Chroom zorgt voor het ontstaan van een passivatielaag. Nikkel wordt toegevoegd ter stabilisatie van de austeniet-fase. Deze materialen zijn enkel geschikt voor tijdelijk gebruik.

‘Ti Alloys’. Zowel zuiver Ti als Ti legeringen worden gefabriceerd. Net zoals bij de ‘stainless steels’ worden elementen toegevoegd voor stabilisatie van een fase⁴. Titaan vormt onder *in vivo* omstandigheden een oxidelaagje waaraan het zijn uitstekende corrosieweerstand te danken heeft. **‘TiNi Alloys’.** TiNi legeringen vertonen het zogenaamde ‘*shape memory effect*’ (SME): als het materiaal gekoeld, en plastisch vervormd wordt, kan het bij terugkeren naar de initiële temperatuur zijn oorspronkelijke vorm aannemen. Nadeel is het eventuele uitlogen van toxische Ni-ionen. Oppervlaktemodificatie kan in dit geval een oplossing bieden [4].

‘CoCr Alloys’. Hiervan worden hoofdzakelijk twee types gebruikt: CoCrMo en CoNiCrMo legeringen. Net zoals titaan legeringen zijn de CoCr legeringen passief onder *in vivo* omstandigheden.

Verder worden ook nog goud, amalgaam, tantalum en enkele minder belangrijke metalen gebruikt. Teneinde de biocompatibiliteit van bovenvermelde metalen te verbeteren worden een variëteit aan oppervlaktemodificatie-technieken uitgevoerd (bv. plasmacoaten met een polymeer [4]). Doordat metalen een sterkte hebben die in sommige gevallen vele malen de sterkte van bot overschrijdt, dient erop gelet te worden dat ‘*stress shielding*’ niet voorkomt. ‘Stress shielding’ is een verschijnsel waarmee men typisch wordt geconfronteerd bij harde weefsel vervangingen door materialen met veel grotere mechanische sterkte dan het beoogde harde weefsel (cfr. mechanische sterkte van een ‘*hip stem*’ t.o.v. deze van de femur). ‘Stress shielding’ resulteert in botatrofie, een fenomeen waarbij resorptie van bot plaatsgrijpt [5]. Optimaal dienen de mechanische eigenschappen zo dicht mogelijk aan te leunen bij deze van de natieve botstructuur [3].

1.2 Keramieken

De laatste 30-40 jaar werd een enorme vooruitgang geboekt in de ontwikkeling van medische materialen. Bij de keramische materialen is dit de ontwikkeling van zogenaamde *Biokeramieken* voor skeletaal herstel en reconstructie [6]. Keramieken worden gedefinieerd als de kunst en wetenschap van het vervaardigen en gebruiken van vaste partikels die als essentiële component bestaan uit inorganische niet-metallische componenten [7]. Omwille van hun structuur zijn keramische materialen niet-ductiel en ondergaan geen plastische vervorming. Eerder breken ze bij aanwezigheid van een barst wanneer er een kracht wordt op uitgeoefend. Dit in groot

³‘Face centered cubic crystal’ (fcc) structuur

⁴ $\alpha - Ti$: ‘hexagonal close packed (hcp) structure’ en $\beta - Ti$: ‘body-centered cubic (bcc) structure’

contrast met metalen en polymeren die wel een plastische vervorming kennen. Als gevolg van deze (negatieve) eigenschap zijn keramische materialen heel ontvankelijk voor inkervingen en breuken gesitueerd op microschaal. Zodoende vertoont een keramisch materiaal, in geval van structuurfoutjes, een lage trekweerstand in vergelijking met zijn weerstand tegen druk. Een karakteristiek die eveneens bij botstructuren wordt teruggevonden.

De aard van de chemische binding tussen de samenstellende ionen ligt aan de basis van deze negatieve eigenschap van de keramische materialen. Andere karakteristieken die tot stand komen als een gevolg van de bindingseigenschappen zijn hun hoge hardheid, hoge smelttemperaturen en een lage thermische en elektrische geleidbaarheid [7]. Net als voor andere biomaterialen dient een keramiek een goede biocompatibiliteit en niet-toxiciteit te bezitten vooraleer het dienst kan doen als biomateriaal.

Afhankelijk van de interactie tussen het biokeramische materiaal en zijn fysiologische omgeving kunnen deze in twee categoriën worden onderverdeeld: (i) *bioinerte* en; (ii) *bioactieve* keramieken. In de klasse van de bioactieve keramieken wordt verder nog een onderscheid gemaakt tussen de *resorbeerbare* en *niet-resorbeerbare* keramieken. [6, 7]

Elk van deze materialen kan geproduceerd worden onder de vorm van een poreuze of dense structuur in bulk, als granules, of in de vorm van coatings. In tabel 1.2 worden enkele biokeramieken geklasseerd. Voor specificaties wordt verwezen naar *The Biomedical Engineering Handbook: Ceramic Biomaterials* [7].

Tabel 1.2: Classificatie van enkele keramieken als biomaterialen

| Bioinert | Bioactief, resorbeerbaar | Bioactief, niet-resorbeerbaar |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| aluminiumoxide | hydroxyapatiet (HA) | dens HA |
| zirconiumoxide | whitlockiet | Bioglass |
| pyrolytisch koolstof | coralline | Ceravital |
| dens HA | TCP | dens, niet-poreus glas |
| calcium aluminaten | calcium fosfaat Plaster of Paris | |

1.2.1 Bioinerte keramieken

Best *et al.* [6] raden aan omzichtig om te springen met de term inert. Inert impliceert dat geen interactie plaatsgrijpt met de fysiologische omgeving, doch is het bekend dat elk materiaal geïntroduceerd in de fysiologische omgeving een respons zal induceren. Daarom kan geopteerd worden de term *relatief bioinert* te gebruiken. Desondanks de niet volledige inertie behouden relatief bioinerte keramieken hun materiaaleigenschappen na implantatie en vertonen een heel goede weerstand tegen corrosie. In de context van biomedische implantaten wordt de term bioinert gedefinieerd als een minimale *‘level of response’* door het weefsel, in dewelke het implantaat bedekt wordt met een niet-adherente, dunne fibreuze laag. Een typische toepassing voor dit type materialen is de ondersteuning van botstructuren.

1.2.2 Bioactieve, niet-resorbeerbare keramieken

Een andere benaming voor deze categorie is de oppervlakte-reactieve biokeramieken. Deze biokeramieken worden niet geresorbeerd, maar vertonen wel een reactie aan de interfase met de fysiologische omgeving. Met andere woorden, ze zijn semi-inert. Enkel de interfase met de fysiologische omgeving is bioactief, de bulk is inert. Deze oppervlaktereactie is vrij complex en resulteert in de vorming van een bioactieve hydroxy-koolstof apatiet (HCA) laag. HCA is equivalent met de minerale fase van bot en gaat een sterke binding aan met het omringende weefsel. [6, 7]

Teneinde de mate van bioactiviteit uit te drukken werd de ‘*bioactivity index*’ gedefinieerd:

$$I_B = 100/t_{50bb} \quad (1.7)$$

Met t_{50bb} de in beslag genomen tijd, nodig om 50 % van het beschikbare interfaseoppervlak te bedekken met gebonden HCA. Bioactieve, niet-resorbeerbare biokeramieken worden frequent toegepast voor het aanbrengen van coatings op metallische of polymerische structuren.

1.2.3 Bioactieve, resorbeerbare keramieken

Zoals rechtstreeks valt af te leiden is dit een categorie van biokeramieken die degradeert in functie van de tijd na implantatie (niet-inert). Hierbij wordt als functie van de tijd een hoeveelheid van het originele materiaal geresorbeerd door de fysiologische omgeving en gesubstitueerd door weefsel. Afhankelijk van de samenstelling worden materialen bekomen met variërende degradatiesnelheden. Bij keuze van een bioactief, resorbeerbaar biokeramiek dienen de resorptiesnelheid enerzijds, anderzijds de snelheid van weefsel regeneratie op elkaar te zijn afgestemd. Vrijwel alle resorbeerbare biokeramieken zijn variaties van calciumfosfaat structuren.

1.3 Polymeren

Polymeren zijn synthetische of natuurlijke macromoleculen opgebouwd uit een sequentie van zeer vele structuureenheden, monomeren. ‘*Macros*’, ‘*poly*’, en ‘*meros*’ zijn Griekse termen die respectievelijk “groot”, “veel”, en “deeltje” betekenen. Polymeren of macromoleculen zijn met andere woorden opgebouwd uit een groot aantal kleinere moleculen die via chemische bindingen met elkaar verbonden zijn. Een belangrijke figuur met betrekking tot het begrip macromolecule is H. Staudinger (vanaf 1920).

In wat volgt wordt even kort teruggekomen op de basis van polymeren, een overzicht welke polymeerclassen als biomateriaal kunnen worden benut en iets langer stilgestaan bij biodegradeerbare polymeren, die de basis vormen van deze masterscriptie.

1.3.1 Polymeren: de basis

De polymerisatiegraad (DP) van een polymeer is een belangrijk begrip. Dit is het gemiddelde aantal monomeereenheden per polymeerketen. Polymeren bestaan echter uit een mengsel van ketens met verschillende lengtes. Er wordt dus een distributie van ketens met verschillende moleculaire gewichten en lengtes verkregen. Deze distributie gedraagt zich Gaussiaans. Vandaar dat bij polymeren wordt gewerkt met een gemiddeld moleculair gewicht (MW). Een manier om dit gemiddeld moleculair gewicht te bepalen is op basis van het aantal (M_n) of op

basis van het gewicht (M_w) van de monomeren. De polydispersiteit (PD) wordt gedefinieerd als de verhouding van het gewicht gemiddeld moleculair gewicht tot het nummer gemiddeld moleculair gewicht.

$$MW_{\text{polymeer}} = DP \times MW_{\text{monomeer}} \quad (1.8)$$

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (1.9)$$

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \quad (1.10)$$

Praktisch gezien bestaan zowel relatieve methoden als absolute methoden ter bepaling van deze waarden. Als relatieve methode wordt meestal gebruik gemaakt van gel permeatie chromatografie (GPC) of intrinsieke viscositeit. Absolute methodes zijn osmometrie en andere colligatieve methoden en eindgroep analyse voor bepaling van M_n . ‘*Light-scattering*’ wordt gebruikt als een absolute methode ter bepaling van M_w . [8]

Het is de bedoeling finaal te kunnen beschikken over een polymeer met een zo uniform mogelijke verdeling van het moleculaire gewicht. Een reden is dat kleinere ketens functioneren als plasticizers voor grotere ketens [8]. Algemeen zal bij langer wordende ketens, het polymeer visceus worden, een groter moleculair gewicht en een kleinere mobiliteit hebben. Bijgevolg wordt het polymeer sterker en verkrijgt het een betere thermische stabiliteit.

Een indeling kan gemaakt worden op basis van: (1) herkomst - natuurlijke vs. synthetische polymeren⁵ -; (2) ketenstructuur - lineair, vertakt, vernet, of ladder -; (3) ketenopbouw - homopolymeer, statistisch copolymeer, alternerend copolymeer, blokpolymeer, entcopolymeer, terpolymeer -; (4) ketenatoom-configuratie - cis/trans, R/S, tacticiteit -; (5) thermisch gedrag - thermoplastisch, thermohardend, rubbers -, en; (6) vormgeving en/of toepassing.

Een polymeer kan een amorf, dan wel een semi-kristallijn karakter bezitten afhankelijk van de samenstelling. Dit wordt verduidelijkt aan de hand van bovenvermelde indeling: (2) Een polymeer kan bestaan uit lineaire, vertakte of gecrosslinkte ketens. Respectievelijk gaan we van semi-kristallijne (80-90) naar amorfe structuren [8]. (3) Verder kan een polymeer opgebouwd zijn uit meerdere monomeren, of kan een polymeer ge-graft worden met een ander polymeer. Zo ontstaan multicomponent polymeren, zogenaamde copolymeren, die kunnen onderverdeeld worden in random-, alternerend-, blok-, of graft-copolymeren. Multicomponent systemen promoten de vorming van amorfe structuren. (4) De structureenheden uit een polymeer kunnen zijgroepen bevatten die naargelang hun ordening kunnen onderverdeeld worden in atactische (random), isotactische (een kant van de ‘*backbone*’) en syndiotactische (alternerende kanten van de ‘*backbone*’) polymeren. De tacticiteit speelt onder meer een rol in het amorf, dan wel semi-kristallijne karakter van het polymeer. Kleine zijgroepen, iso- of syndiotacticiteit zorgen voor een mogelijk semi-kristallijn karakter [8].

Het is duidelijk dat de fysische eigenschappen van polymeren op verschillende manieren beïnvloed worden. Een belangrijke parameter daarbij zijn de zogenaamde transitietemperaturen T_g (glastransitie) en T_{vl} (vloei). Bij semi-kristallijne polymeren beschikken we over een derde transitietemperatuur T_m (smelt). Het stimuleren van kristalliniteit en grotere moleculaire gewichten verhoogt de glastransitie- en smelttemperatuur van het polymeer.

⁵Half-synthetische polymeren zijn natuurlijke polymeren die chemisch gemodificeerd werden

Naargelang het reactiemechanisme bestaan enerzijds stappolymerisaties, anderzijds kettingpolymerisaties⁶. Bij een stapsgewijze polymerisatie reageren de monomeren onderling met vorming van dimeren. Deze kunnen op hun beurt reageren met hetzij een monomeer, hetzij een dimeer, enz.. De polymersatiegraad neemt in functie van de reactietijd gestadig toe. Een kettingpolymerisatie bestaat uit een *initiatie* - *propagatie* - *terminatie* opeenvolging. De *initiatie* is de stap waarbij een of meerdere monomeren reactief worden gemaakt. De *initiator* kan een vrij radicaal, een kation, anion of stereospecifieke katalysator zijn. De *propagatie* is het verdergaan van de reactie na initiatie, waarbij het polymeer wordt opgebouwd. *Terminatie* is het stopzetten van de reactie door ofwel disproportioneering, door recombinate, ofwel door transfer. Een kettingpolymerisatie wordt meestal gekenmerkt door een zeer snelle, maar zeer kortstondige ketengroei.

Een indeling volgens reactiemechanisme, die vroeger veelal werd gebruikt, is het onderscheid tussen polycondensatie⁷ (waar bij polymerisatie afsplitsing van laagmoleculaire stoffen plaatsgrijpt) en polyadditie (geen afsplitsing). Voorwaarde voor polyadditie is de aanwezigheid van ten minste 1 onverzadiging. [8]

1.3.2 Polymeren als constructiemateriaal voor biomedische toepassingen

Polymeren vertonen enkele niet onbelangrijke voordelen ten opzichte van metalen en keramieken waaronder de verwerkbaarheid, kostprijs, secundaire processing en verscheidenheid aan materialen met verschillende mechanische en fysische eigenschappen [8]. Een enorm voordeel is de mogelijkheid om een materiaal te ontwikkelen specifiek voor een bepaalde toepassing. De goede controle van hun samenstelling en moleculair gewicht maken het immers mogelijk hun fysische en chemische eigenschappen te variëren. Net zoals bij de andere klassen biomaterialen dient een polymeer met een medische toepassing biocompatibel te zijn. Vandaar het belang van oppervlaktebehandelingen ter verbetering van de biocompatibiliteit (zie hoofdstuk 4: *Oppervlaktomodificatie*). In onderstaande tabel 1.3 wordt een overzicht gegeven van de verschillende klassen polymeren die aangewend worden als biomateriaal.

Tabel 1.3: Polymeren met biomedische toepassingen: een samenvatting

| | | |
|-------------------|------------------------------------|----------------------------|
| polyvinylchloride | polyethyleen | polypropyleen |
| acrylic polymeren | polystyreen | polyesters |
| polyamides | fluorocarbon polymeren | rubbers |
| polyurethanen | polycarbonaten, -acetal, -sulfonen | biodegradeerbare polymeren |

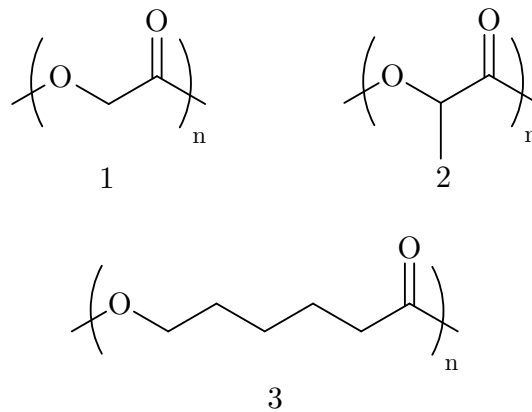
Polymethylmethacrylaat (PMMA) is een amorf (of semi-kristallijn) polymeer en wordt beschouwd als één van de meest biocompatibele polymeren met hoge transparantie en een goede weerstand tegen alkali en inorganische oplossingen [8]. Om deze redenen zou het een interessant polymeer kunnen zijn om te graften op scaffolds teneinde een betere biocompatibiliteit te bekomen.

Een andere interessante groep van polymeren voor onderzoek zijn de biodegradeerbare polymeren. Ze worden gekenmerkt door een goede biocompatibiliteit en een controleerbare

⁶Er bestaat nog een tussenvorm, nl. de "levende" polymerisaties. Deze hebben eigenschappen van zowel stap- als kettingpolymerisaties

⁷Het mechanisme waar de natuur gebruik van maakt, cfr. polysacchariden

resorptiekinetiek. De, in de meeste gevallen, afwezigheid van een permanente chronische afweerreactie en de mogelijkheid tot regeneratie van weefsel maakt deze klasse van polymeren bijzonder interessant voor de productie van tijdelijke scaffolds voor tissue engineering [9]. Enkele biodegradeerbare polymeren van natuurlijke oorsprong zijn collageen, fibronectine, gelatine, alginaat, hyaluronzuur en laminine. Gelatine is een interessant natuurlijk polymeer, afgeleid van collageen via een zure of basische behandeling, voor gebruik in onderzoek dankzij de lage(re) kostprijs, goede biocompatibiliteit, en mogelijkheid tot functionaliseren. De belangrijkste groep van synthetische biodegradeerbare polymeren zijn de polymeren afkomstig van lineair alifatische polyesters, zoals PLA, PGA, PCL, . . . De degradatie en biocompatibiliteit van deze lineair alifatische polyesters is vrij goed gekend [10, 11], wat onderzoek op deze materialen gunstig maakt. De degradatie is afkomstig van hydrolyse en enzymatische (*esterase*) splitsing van de esterbindingen van het polyester. Deze groep van materialen worden frequent benut in onderzoek daar ze ‘FDA approved’ zijn.



Figuur 1.3: Enkele veelvoorkomende biodegradeerbare synthetische polymeren: (1) polyglycolide (PGA); (2) polylactide (PLA); (3) poly- ϵ -caprolacton (PCL)

1.4 Composieten

Composieten bestaan uit meerdere materialen of fasen, verschillend op een schaal groter dan de atomaire structuur. Mechanische eigenschappen van composieten zijn verschillend ten opzichte van de homogene materialen waaruit ze zijn opgebouwd, en hangen grotendeels af van hun structuur. Meer bepaald hangen ze af van de vorm van de ingesloten heterogeniteiten, de volumefractie ingenomen door dergelijke heterogeniteiten en, van het grensvlak tussen de samenstellende delen [5].

Het is duidelijk dat de mechanische eigenschappen van composieten op een complexere manier afhangen van hun structuur dan in het geval van homogene materialen. Zonder hier dieper op in te gaan kan worden vermeld dat aan de hand van geïdealiseerde modellen (de *Voigt en Reuss* modellen) grenswaarden kunnen bepaald worden voor de stijfheid van een composiet waarbij insluitingen verticaal, respectievelijk horizontaal aanwezig zijn [5]. Typisch vertonen composieten anisotroop gedrag⁸. Aldus dient te worden gewerkt met de tensoriële vorm van

⁸De mechanische eigenschappen van een anisotroop materiaal zijn afhankelijk van de richting waarin een kracht wordt aangelegd

de algemeen gekende *wet van Hooke*:

$$\sigma_{ij} = \sum_{k=1}^3 \sum_{l=1}^3 C_{ijkl} \varepsilon_{kl} \quad (1.11)$$

Met C_{ijkl} de elasticiteitsmodulus tensor. Deze formule kan anisotropie incorporeren in het verband tussen ‘*stress*’ (σ_{ij}) en ‘*strain*’ (ε_{kl}). Anisotropie resulteert in een verbeterde stijfheid en sterkte in een bepaalde richting (in vergelijking met isotropisch materiaal), ten koste van deze in een andere richting. Indien men gebruik wil maken van composieten is het logischerwijze van groot belang de richting van de resulterende lasten te kennen.

De samenstellende componenten van composietmaterialen dienen elk afzonderlijk biocompatibel te zijn. Meestal is het bijkomend gewenst dat het grensvlak tussen de samenstellende delen niet degradeert. In wat volgt wordt een indeling gemaakt in soorten composietmaterialen. Voor verdergaande uitleg wordt verwezen naar *The Biomedical Engineering Handbook: Composite Biomaterials* [5].

1.4.1 Particulare composieten

Composieten die als heterogeniteiten partikels incapsuleren, worden particulare composieten genoemd. Sferische partikels zijn het minst effectief voor het creëren van een verbeterde stijfheid. Hiervoor zijn fibreuse en lamina inclusies beter geschikt.

Indien de ‘*compliance*’ van de insluitingen echter groter is dan dat van de matrix (veelal een polymeer), verminderen sferische partikels de stijfheid in mindere mate dan de fibreuse of laminaire. Laatstgenoemde kunnen in dergelijk geval beschouwd worden als ‘*crack-like defects*’. Een eigenschap die niet terug te vinden is bij sferische insluitingen die, indien compliantier dan de matrix, gebruikt kunnen worden als ‘*crack stoppers*’. Deze eigenschap wordt gebruikt bij de constructie van ‘*high impact*’ polystyreen. [5]

Voorbeelden van particulare versterkingen zijn o.a. het insluiten van botpartikels in PMMA cement en dentale composieten (polymeer matrix met stijve inorganische inclusies).

1.4.2 Fibreuse composieten

Zoals reeds vermeld is het gebruik van fibreuse insluitingen efficiënter voor het verbeteren van de mechanische eigenschappen. Afhankelijk van de voorwaarden waaraan het composiet moet voldoen kunnen de fibers unidirectioneel of random ingesloten worden. Dit heeft uiteraard zijn effect op de mechanische eigenschappen van het composiet. Als gewerkt wordt met unidirectionele fibers zal het materiaal, wanneer transversaal belast, zwakker zijn dan het homogene materiaal. Faling van fibreuse composieten kan gebeuren door: (1) het breken, het uittreden of verwringen van de fibers; (2) matrix ‘*cracking*’, of; (3) het ontbinden van de fibers.

Carbonvezel versterkt ‘*ultra high molecular weight polyethylene*’ (UHMWPE) is een voorbeeld van een dergelijk composiet. CoCr legering-, ‘*stainless steel*’-, Ti- of grafietfibers kunnen worden gebruikt om PMMA te versterken teneinde sterker botcement te bekomen. De verminderde temperatuursstijging tijdens de polymerisatie van PMMA dankzij de ingesloten fibers is voordelig ten opzichte van mogelijke necrose. ‘*Stress shielding*’, zoals hoger vermeld, is een nadelig effect van het gebruik van metalen. Een oplossing kan het gebruik van composietmaterialen zijn. [5]

1.4.3 Poreuze composieten

Bij het vervaardigen van biomaterialen worden frequent coatings aangebracht om weefselingroei te bevorderen. Weefselingroei impliceert immers dat de geïmplanteerde structuur wordt verankerd in het omgevende weefsel, wat in vele gevallen opportuun is. Poreuze structuren lenen zich hier uitermate toe. Poreus composiet kan eigenlijk worden aanzien als een composiet waarbij de heterogeniteiten ledige ruimte zijn.

In vergelijking met het homogene materiaal dient meer zorg te worden besteed aan inertheid en biocompatibiliteit van de poreuze laag. De mechanische eigenschappen van dergelijke coating veranderen in de tijd na implantatie en optimaal dienen de poriën meer dan $150 \mu m$ te zijn. Een onderscheid kan gemaakt worden tussen het poreuze composiet opgevuld met weefselvocht, en het poreuze composiet, opgevuld met weefsel. [5]

In het geval van botimplantaten worden 3 fasen onderscheiden in de tijd: (1) de poriën worden opgevuld met bloed; (2) migratie van osteoprogenitor mesenchymale cellen, en; (3) na ongeveer 4 weken, formatie van trabeculair bot [5]. Poreus HA en TCP zijn gekende voorbeelden met dergelijke werking. De resorptiesnelheid van TCP is groter dan deze van hydroxyapatiet. Simultaan met de resorptie van het materiaal grijpt botingroei plaats.

Het creëren van poreuze composietmaterialen uit polyurethaan, polyamide, of polyester is een strategie met groot potentieel voor zachte weefsel toepassingen.

Hoofdstuk 2

Tissue Engineering

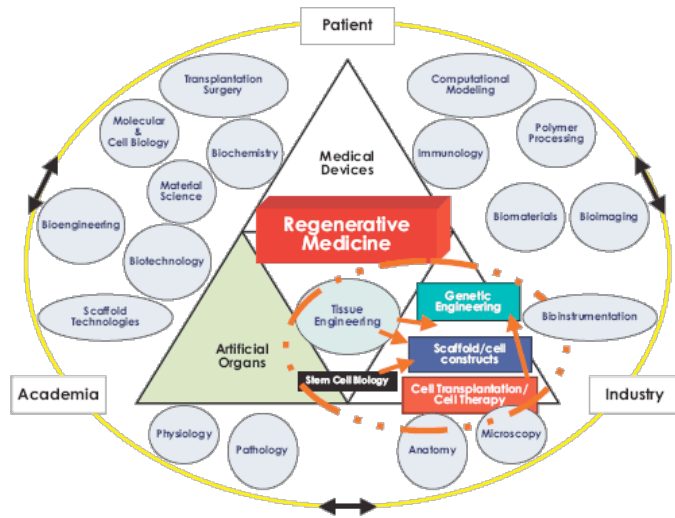
In augustus 2008 wachtten ongeveer 1100 patiënten in België op een orgaantransplantatie. Hierbij wordt het grootste aantal vertegenwoordigd door patiënten die wachten op nieren (802), gevolgd door levers (183), longen (61), harten (33) en pancreassen (27). In diezelfde maand werden in België ongeveer 600 transplantaties uitgevoerd. Het cijfermateriaal komt uit een studie van de federale overheid [12]. Orgaanfalen is een wezenlijke problematiek in de gezondheidssector. Transplantatie, reconstructieve chirurgie, en, artificiële prothesen of mechanische apparaten ('dialyser', 'hip joint', 'heart valves', ...) zijn mogelijke behandelingsstrategieën [13]. Deze behandelingen zijn echter imperfect door respectievelijk donor tekort, lange termijn problemen en inadequate functie performantie. De laatste decennia worden veelvuldig de mogelijkheden onderzocht voor weefselproductie en –reconstructie. Hier komt het concept “Tissue Engineering” naar voor, een werkwijze die een vermindering van de kost en het limiteren van transplantatie nastreeft.

2.1 Definitie, Doel en Historiek

Tissue engineering is een inter- en multidisciplinaire wetenschap ¹ die de principes van engineering en levenswetenschappen toepast voor de ontwikkeling van biologische substituten die herstel/behoud/verbetering van weefselfuncties nastreven [2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. De ‘European Commission on Health and Consumer Protection’ definieerde tissue engineering als “*the persuasion of the body to heal itself through the delivery, to the appropriate site, independently or in synergy, of cells, biomolecules and supporting structures*” [25]. Dit complexe inter- en multidisciplinaire karakter wordt schematisch weergegeven in figuur 2.1. Als basisconcept beroept men zich op de hypothese dat herstel en regeneratie van weefsel kan gestuurd worden door gebruik en controle van cellen, materialen, en biomolecules [14].

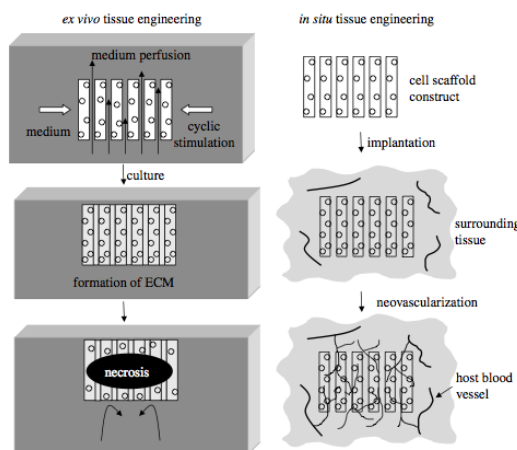
Grosso modo kunnen twee methoden worden onderscheiden: (i) *in vitro* constructie van bio-artificieel weefsel via cellen geïsoleerd uit donorweefsel, en; (ii) *in vivo* alteratie van celgroei en –functie. De eerste methode stelt de productie van bioartificieel weefsel, die kan gebruikt worden als een alternatief voor orgaantransplantatie en studie van complexe weefselfuncties en morfogenese *in vitro*, als doel. De tweede methode heeft als doel de groei/functie van cellen *in situ* te veranderen. [15]

¹O.a. moleculaire en cellulaire biologie, genetica, biomaterialen, fysiologie, anatomie, biomechanica, chirurgie [14, 15]



Figuur 2.1: Het complexe inter- en multidisciplinaire karakter van tissue engineering

Bij beide methoden wordt weefselproductie via de aanmaak van ECM vooropgesteld. Daaruit volgt dat het van cruciaal belang is te beschikken over cellen met het juiste/gewenste fenotype, m.a.w. de gewenste differentiatie. Een aspect dat ten dele wordt vertolkt via materiaalinteracties. Figuur 2.2 toont het verschil tussen beide strategieën. Uit deze figuur valt rechtstreeks af te leiden dat neovascularisatie één van de grote problemen is waarmee men bij tissue engineering te kampen krijgt. In het bijzonder voor *in vitro* tissue engineering [26]. Volgens Goddard en Hotchkiss [18] is het doel van tissue engineering de rekrutering van geschikte progenitor cellen, de aanmoediging van proliferatie en differentiatie, en het vervolledigen van matrixvorming. Meer concreet is het doel gedefinieerd door Langer en Vacanti [13]: “...to surpass the limitations of conventional treatments based on organ transplantation and biomaterial implantation.”



Figuur 2.2: *In vitro* vs. *in vivo* tissue engineering [26]

Het grondbeginsel van tissue engineering vindt men terug in het domein van de biomaterialen. Voorheen was er veelal de aspiratie een zo inert mogelijk materiaal te produceren met het oog op een minimale interactie met het lichaam. Tissue engineering begon bij het gebruik van bioactieve materialen². In 1984 werd door Wolter en Meyer een eerste maal de term “tissue engineering” gebruikt bij de observatie van een endotheelachtige structuur en organisatie op het oppervlak van een PMMA oftalmologische prothese. Twee vroege voorbeelden zijn het kweken van hepatocyten in holle fibers (Jauregui en Gann) en de groei van chondrocyten op PGA (Cima *et al.*), beide in 1991. [14]

2.2 Materialen en Methoden: algemene Principes en Bouwstenen

Voor de ontwikkeling van nieuw weefsel worden drie algemene strategieën aangewend, nl. de transplantatie van [2, 13, 15, 16, 19]:

1. Geïsoleerde cellen of celsubstituten;
2. Weefsel inducerende substanties: *in situ* weefsel regeneratie;
3. Cellen uitgezaaid in, of op matrices;

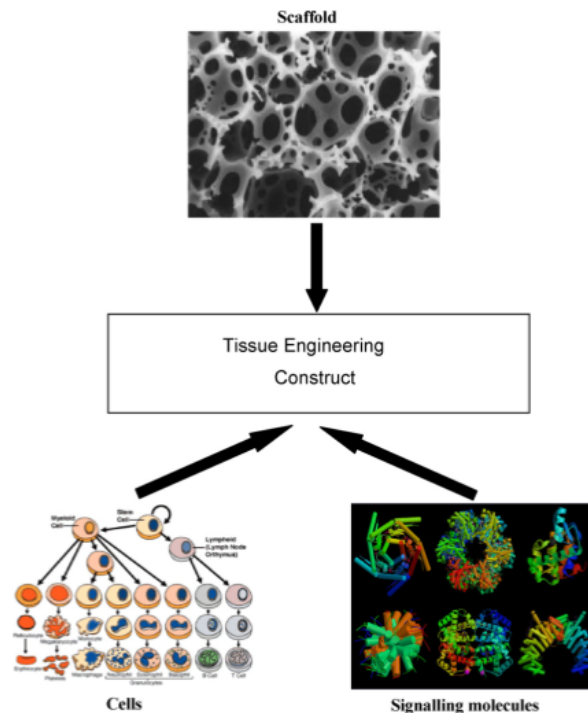
(1) De eerste strategie vermijdt de complicaties van chirurgie, laat manipulatie van cellen toe vóór infusie, en staat toe enkel die cellen te vervangen die de beoogde functie vervullen. Immunologische rejectie en falen van functievervulling zijn mogelijke limitaties. Deze strategie verleent geen dragende ‘*supportive*’ functie en is bijgevolg moeilijk toepasbaar indien druk, ‘shear’ of ‘flow’ worden uitgeoefend.

(2) De tweede strategie komt neer op de directe implantatie van een niet-cellulaire scaffold die de lichaamseigen cellen stimuleren tot lokaal weefselherstel. Het herstelproces gaat gepaard met scaffold ingroei en de aanmaak van ECM. Doorgaans wordt de stimulatie gerealiseerd door inclusie van signaalmoleculen (bv. groeifactoren). Deze benadering hangt sterk af van de zuiverheid van de (‘*large-scale*’) geproduceerde signaalmoleculen en de manier waarop deze tenslotte bij het doelweefsel terechtkomen.

(3) De derde strategie wordt zowel toegepast als een gesloten systeem, dan wel als een open systeem. In een gesloten systeem worden de cellen gescheiden van het lichaam via een semi-permeabel membraan. Extracorporeale apparaten zijn typische toepassingen van gesloten systemen. Bij open systemen worden cellen uitgezaaid op een scaffold en geïncubeerd in een bioreactor. Het geheel wordt vervolgens geïmplanteerd in het lichaam (figuur 2.3). [2, 13, 16]

De eerste twee strategieën worden sterk gelimiteerd in omstandigheden waarbij het defect een zekere grootte aanneemt. Vandaar dat de derde benadering zich ontwikkeld heeft tot het meest toegepaste type tissue engineering. Aldus wordt klassiek een celpopulatie uitgezaaid op een scaffold, die vervolgens wordt geëxpandeerd in een bioreactor tot ontwikkeling van weefsel. Het geheel van scaffold met cellen en nieuw ECM wordt geïmplanteerd, waarna het scaffoldmateriaal verdwijnt aan dezelfde snelheid van de ECM productie. [2, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24]

²Materialen specifiek ontwikkeld voor interactie met het lichaam



Figuur 2.3: Klassieke werkwijze voor *tissue engineered constructs* [25]

Zoals reeds aangehaald, is tissue engineering een interdisciplinaire wetenschap. Het inzicht betreffende structuur en gedrag van de extracellulaire matrix (ECM) van natief weefsel, en het gedrag van cellen bij *in vitro* celkweek en na *in vivo* implantatie vereist input van biologen. Anderzijds wordt input verwacht van ingenieurs betreffende materiaalkarakteristieken voor de productie van scaffolds. Zodoende bestaan de meeste tissue engineered constructies uit minstens twee componenten: cellen en een scaffold. Een derde belangrijke component van vele constructies zijn groeifactoren of meer algemeen biomoleculen. Uiteraard is het zo dat elke component instaat voor de vertolking van specifieke (gewenste) eigenschappen. Zo is de cellulaire component noodzakelijk voor weefselproductie door de aanmaak van ECM (functievervulling van het weefsel waarvoor het werd ontwikkeld), evenzo als voor het lange termijn behoud van deze matrix. Het scaffold materiaal op zijn beurt verschaft mechanische stabiliteit op korte termijn en een template voor de 3D organisatie van het zich ontwikkelend weefsel. Interactie tussen beide componenten is een kritisch aspect voor succes van het geheel. [14, 16]

Het feit dat een tissue engineering benadering gebruikt maakt van een multicomponent systeem ligt aan de basis van het fundamentele verschil tussen cellulaire en niet-cellulaire implantaten, en het grote voordeel van eerstgenoemde. Een cellulair systeem is immers in staat zich te remodeleren en herstellen op zodanige wijze dat de eigenschappen niet veranderen in functie van de tijd. In tegenstelling tot niet-cellulaire materialen die onderhevig zijn aan degradatie (enzymen, hydrolyse, 'fatigue',...), wat de performantie van het implantaat zal aantasten.

2.2.1 Celidentificatie, -isolatie en upscaling

De eindbestemming bij tissue engineering is het herstel of de vervanging van een defect, uitgaande van een kleine hoeveelheid weefsel verkregen via biopsie. Bijgevolg vangt het hele proces aan met het isoleren en het identificeren van het relevante celtype.

Een vermaard begrip met betrekking tot de celdeling is de zogenaamde *Hayflick limiet* (1965) [27]. De Hayflick limiet determineert het aantal mogelijke celdelingen. Indien dit maximale aantal celdelingen wordt overschreden komt men in een stadium van ‘*senescence*’³ terecht. Doorgaans is deze rond de 50 celdelingen gesitueerd. Het *Hayflick fenomeen* is een verouderingsproces dat gepaard gaat met een veranderde genexpressie als gevolg van de telomeer appendix (bij mensen: TTAGGG/CCCTAA sequenties) inkorting bij iedere celdelingscyclus. In 1998 slaagt Geron Corporation [28] erin telomeren te verlengen door introductie van het enzym *telomerase* in menselijke cellen. Hierdoor worden als het ware onsterfelijke cellijnen gekweekt. Een concrete invulling van een probleemstelling waarbij onsterfelijke cellijnen een plausibele oplossing bieden is bv. het opschalen van een biopsie afkomstig van een oudere patiënt. Permanente cellijnen bieden het voordeel dat ze minder onderhevig zijn aan fenotypische variatie, doch ten koste van een verlies aan functionele eigenschappen. Dit verlies wordt geassocieerd aan de manipulaties noodzakelijk voor het bereiken van immortaliteit [29]. De studie van deze tak van de wetenschap wordt verder niet behandeld.

Drie bronnen zijn voorhanden voor de isolatie van cellen en het benutten in implantaten [2, 16]:

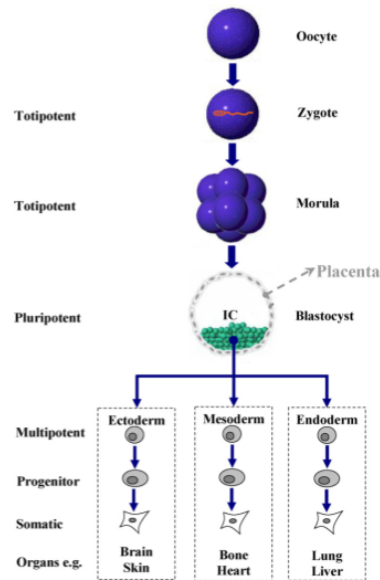
- **Autologe cellen:** patiënt eigen cellen;
- **Allogene cellen:** cellen afkomstig van een immunologisch identieke donor, in het geval het gaat om genetisch identieke organismen (tweelingen, klonen) spreekt men van *isogene* cellen;
- **Xenogene cellen:** niet-humane cellen;

Een doorgedreven onderverdeling kan gemaakt worden in volwassen of embryonale stamcellen, of een mengsel van gedifferentieerde cellen met variërende maturatietijdstippen. Het spreekt voor zich dat het gebruik van dierlijke (xenogene) cellen voor weefselherstel een potentieel gevaar inhoudt door mogelijke pathogentransmissie [16]. Vermits zowel allogene als xenogene cellen immunogeen zijn voor de patiënt, dienen deze een preventieve behandeling te ondergaan. De noodzakelijke behandeling ter preventie van immunologische complicaties is een nadeel dat niet van toepassing is bij het gebruik van autologe cellen. Daarentegen is de frequente onbeschikbaarheid van autologe cellen een aanzienlijk nadeel (cfr. genetische afwijkingen, brandwonden, ernstig zieke of oudere patiënten).

Het laatste decennium is er een stijgende interesse in applicaties voor stamcellen. Vooral in gevallen waarbij de bron van de cellen gelimiteerd of ontoegankelijk blijkt, is het gebruik van stamcellen een veelbelovende techniek. Stamcellen kunnen onderverdeeld worden in adult (multipotente) en embryonale (veelal pluripotente) stamcellen [25]. Totipotentie treft men aan in de vroege stadia van het embryo (zie figuur 2.4). Mesenchymale stamcellen uit beenmerg of vet zijn geprefereerde cellijnen [26]. Zoals uit media-aandacht blijkt, is er een groot ethisch

³Stadium waarin normale diploïde cellen niet meer capabel zijn om te delen. Alsnog genaamd *Hayflick fenomeen* of *Hayflick limiet*.

debat gaande omtrent embryonale stamcellen. De procesgebonden destructie van het embryo is vanuit ethisch perspectief de grootste complicatie. Recent slaagde Chung *et al.* [30] er in hESCs⁴ te isoleren zonder destructie van het embryo én zonder de noodzaak aan een cocultivatie van meerdere hESC lijnen. Een gegeven dat een doorbraak kan betekenen in het ethische debat.



Figuur 2.4: Categoriën van stamcellen in termen van potentie [25]

In grote lijnen wordt voor het isoleren van cellen uit lichaamsvochten gebruik gemaakt van bulkmethoden, zoals centrifuge en aferese. Daarentegen is een enzymatische behandeling vereist voor de isolatie van cellen uit vaste weefsels. De enzymen (cfr. *trypsine*, *collagenase*) bewerkstelligen het detacheren van de (gewenste) cellen uit de ECM, waarna de bekomen suspensie verder wordt behandeld met behulp van bulkmethoden.

Vanuit het oogpunt om de donor niet onnodig te belasten, wordt via biopsie slechts een minimale hoeveelheid weefsel geïsoleerd. Dit brengt met zich mee dat na isolatie van de gewenste cellen een ‘*upscaling*’ noodzakelijk is om de gewenste hoeveelheid cellen te bereiken. Deze opschaling gebeurt *in vitro* via celculturen en afhankelijk van het celtype is dit in mindere of meerdere mate moeilijk (bv. snellere celdeling van fibroblasten vs. neuronen). Dit ‘*upscaling*’ proces heeft in alle situaties één fundamentele gemeenschappelijke factor: behoud van de fenotypische functie. [14]

De moeilijkheid bij stamcellen is net de opschaling, die gepaard gaat met dedifferentiatie [26].

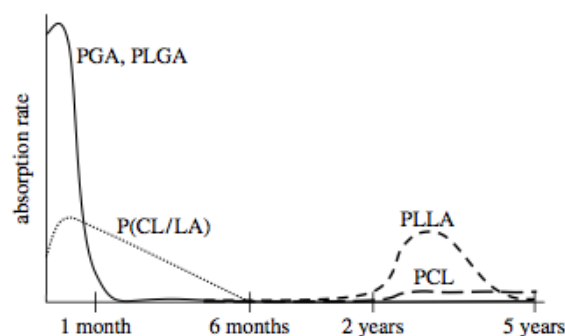
De celpopulatie wordt vervolgens uitgezaaid op het dragermateriaal, de scaffold. De cellen kunnen ook rechtstreeks geïncorporeerd worden in het biomateriaal bij de productie van de scaffold. Dit brengt enige obstakels met zich mee, cfr. het gebruik van solventen, hoge temperaturen en ‘shear’/‘stress’ limieten. In dit geval is compatibiliteit met levende cellen vereist tijdens het gehele fabricageproces. [2]

⁴Human embryonic stem cells’

2.2.2 Biomaterialen in tissue engineering

Regeneratie is een essentieel onderdeel van het natuurlijke genezingsproces en is verantwoordelijk voor de gedeeltelijke of gehele vervanging van een weefsel/orgaan. Om tot een goed eindresultaat te komen dienen cellen een correcte mitose, differentiatie en proliferatie te ondergaan. In tissue engineering is het veelal gewenst dat weefsel het geïmplanteerde materiaal op lange termijn volledig substitueert. Vanuit dit standpunt pogen wetenschappers implantaten te vervaardigen die de aanmaak van ECM stimuleren. Dergelijke implantaten laten celproliferatie toe en ondersteunen de differentiatie. Dit verklaart het stijgende belang van onderzoek naar biodegradeerbare materialen, daar waar vroeger de nadruk vooral lag op de productie van biostabiele materialen. Indien de degradatieproducten volledig worden verwerkt/geëlimineerd door het lichaam, spreekt men van bioresorbereerbare materialen [2]. Keramieken en polymeren worden als biodegradeerbare materialen aangewend in het tissue engineering domein [19, 26].

Typisch is de lange(re) degradatietijd van keramische materialen [7, 14] en de grote variabiliteit aan mogelijke degradatietijden (dagen tot jaren) bij polymeren (figuur 2.5) [8, 9, 14]. De degradeerbaarheid van een polymeer wordt onder meer gecontroleerd door een aantal structurele eigenschappen: hydrofiel/hydrofoob evenwicht, vorm en morfologie, oppervlaktegebied, aggregatietoestand, chemische structuur van de hoofdketen en zijgroepen, en, kristalliniteit [9]. Bij de polymeren worden natuurlijke (biopolymeren) en synthetische biodegradeerbare polymeren⁵ veelvuldig als scaffoldmateriaal benut. Voorbeelden van eerstgenoemde zijn collageen, agarose, algiinaat, gelatine, fibronectine, . . . Het grote voordeel van natuurlijke polymeren is hun nabootsing van de natieve cellulaire omgeving. Nadelen zijn de eenvoudige degradatie, en het risico op virale infecties [2]. Binnen de synthetische polymeren zijn de bekendste voorbeelden PCL, PLA, PGA en combinaties hiervan (figuur 1.3). De chemische en fysische variatie eigen aan natuurlijke polymeren is hier niet van toepassing. Er is echter wel een verhoogde kans op inflammatie en ‘foreign body reactions’ [2]. PLA, PGA en zijn copolymeren zijn uitermate interessant voor tissue engineering doeleinden daar deze ‘FDA approved’ zijn, en de degradatie controleerbaar is door variatie van de copolymeer samenstelling [10, 11, 18]. Hydroxyapatiet (HA), β -tricalciumfosfaat (TCP), en bioactief glas zijn gekende keramische materialen, bekend voor hun osteoconductive (osteoblast adhesie, groei en differentiatie) en osteoinductieve (induceren van botingroei) capaciteiten [7, 19, 22].



Figuur 2.5: Lineair alifatische polyesters en hun degradatietijden [26]

⁵Niet-degradeerbare synthetische polymeren zoals PEG en Pluronic (blok-copolymeren van PEO en PPO) worden ook frequent gebruikt in het tissue engineering domein

2.2.3 Scaffolds

Door het gebruik van stamcellen zijn de laatste jaren nieuwe termen naast tissue engineering in gebruik genomen: o.a. ‘*regenerative medicine*’, ‘*cell therapy*’, ‘*cell transplantation*’. Om het onderscheid eenvoudiger te duiden wordt een indeling gemaakt op basis van het scaffold-gebruik. Tissue engineering valt daarbij te beschouwen als dat onderdeel van de regeneratieve geneeskunde waarin scaffolds worden benut. [26]

Scaffolds (in tissue engineering) worden gedefinieerd als poreuze structuren, meestal polymere van aard, die functioneren als substraat en gids voor weefselregeneratie [31]. Met andere woorden, een simulatie van de ECM. Indien géén 3D-structuur wordt voorzien, organiseren cellen zich willekeurig in een 2D-monolayer [20, 22], wat het belang van (3D) scaffolds onderstreept. Dit onderdeel zal gewijd worden aan het algemene concept “*scaffold*”. In hoofdstuk 3: *Scaffold Ontwerp: Conventionele vs. RP Technieken* wordt de fabricage behandeld.

Een scaffold staat in voor het verschaffen van mechanische stabiliteit op korte termijn en is een template voor de 3D-organisatie van het zich ontwikkelende weefsel [14]. Meer bepaald kunnen aan scaffolds drie hoofddoelen worden gerelateerd [2, 20, 21]: (i) het definiëren van een ruimte dat het regenererende weefsel vormgeeft; (ii) tijdens de regeneratie staan scaffolds in voor de tijdelijke functievervulling van het defect, en; (iii) “gids” voor weefselingroei.

Het eerste doel duidt het belang aan van een 3D-structuur met gedefinieerde vorm, volume en architectuur [21]. Onrechtstreeks benadrukt dit de nood aan gemakkelijk te verwerken materialen zodat zelfs patiëntspecifieke data kunnen verwerkt worden [2]. In dit opzicht vertonen de keramische materialen inherent een beperking [19], waardoor eerder composieten van inorganische (keramische) en polymeermaterialen worden gebruikt bij de fabricage van 3D-structuren voor botherstel [7].

Uit het tweede doel volgen enkele conclusies met betrekking tot mechanische eigenschappen en stabiliteit (\sim degradatie). De scaffold dient optimaal dezelfde mechanische karakteristieken te vertonen als van het te herstellen weefsel [31, 32]. Eén reden is dat het opgevulde defect kan ‘collapsen’, of weefsel dat niet lang genoeg ondersteund wordt geen herstellende functie kan uitoefenen. Een tweede reden volgt uit het feit dat cellen met een hoge sensitiviteit de mechanische eigenschappen van het substraat kunnen aftasten [21]. Het is vanuit onder andere dit perspectief dat voor botherstel gebruik wordt gemaakt van keramische implantaten of composieten (hoge stijfheid), en bij herstel van meer compliant weefsel eerder polymeren in aanmerking komen [14, 21, 22]. Het afstellen van de degradatie- of resorptiesnelheid op de weefsel(in)groei volgt uit de gewenste stabiliteit [19, 21]. Het is gewenst dat tijdens weefsel(in)groei het scaffoldmateriaal degradeert via hydrolyse. Hetzij enzymatisch, hetzij niet-enzymatisch. Het degradatie-absorptie proces is het resultaat van vele intergerelateerde factoren, waaronder het hydrofiele/hydrofobe karakter, de kristalliniteitsgraad, de aanwezigheid van katalysatoren, het poriënvolume, en het oppervlaktegebied. (Opmerking: voor polyesters is een te snelle degradatie ongewenst door de mogelijke lokale verzuring die de celviabiliteit en migratie, zowel *in vivo* als *in vitro*, negatief beïnvloedt. [9, 10, 11, 21])

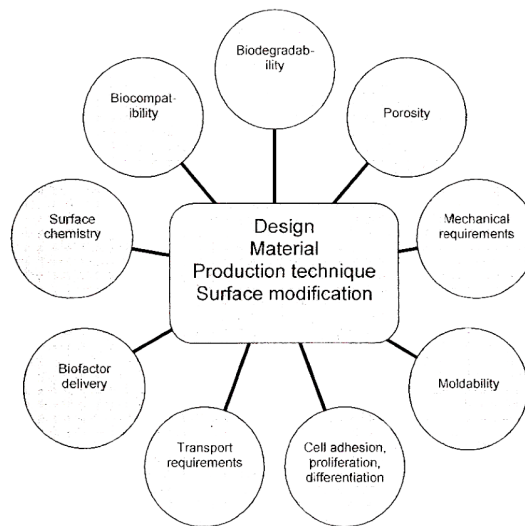
Het derde hoofddoel impliceert dat de scaffold fungeert als adhesiesubstraat en mogelijke donor van cellen, proteïnes/peptiden⁶ en/of andere biofactoren⁷, en benadrukt het belang

⁶Een belangrijke peptide sequentie die veelvuldig wordt geïncorporeerd is de RGD-sequentie (dit is een deel van de celbindingsregio van fibronectine en vitronectine)

⁷Scaffolds kunnen ook gedesigned worden met oog op afgifte van groeifactoren [16]. Groeifactoren bewerkstelligen de cellulaire differentiatie en weefselgroei *in vitro*, of celmigratie *in vivo*

van een oppervlakchemie voor de aanhechting, proliferatie en differentiatie van cellen, indien nodig. Het aspect biocompatibiliteit van zowel oppervlakte als bulkmateriaal komt hierbij kijken. Functionele groepen voor de covalente binding van biofactoren dienen eveneens te worden beschouwd. [2]

Het is duidelijk dat scaffolds aan bepaalde basisvereisten moeten voldoen, waaronder [2, 19, 20, 21, 22]: (1) hoge porositeit – liefst 100 % interconnectief (nutriënt/metaboliet voorziening en weefsel-ingroei) – en geschikte poriëngrootte/geometrie – 5-10 keer de celdiameter (100-300 μm) –; (2) biodegradeerbaar met de gewenste degradatietijd; (3) mechanische integriteit gedurende de vooropgestelde tijd; (4) biocompatibiliteit; (5) interactie met cellen (adhesie, groei, migratie, differentiatie) – belang van oppervlakchemie –; (6) gemakkelijke verwerking. In figuur 2.6 worden schematisch de vereisten, opgelegd aan scaffolds, weergegeven. De figuur benadrukt de complexe interactie van vereisten die gesteld worden aan een scaffold, en het multidisciplinaire karakter van tissue engineering.



Figuur 2.6: Veelzijdigheid van de inputvereisten voor scaffoldfabricage [2]

2.2.4 Bioreactoren

In het algemeen worden bioreactoren gedefinieerd als apparaten in dewelke biologische en/of biochemische processen ontwikkelen onder nauw gecontroleerde omgevings- en procesgebonden factoren (bv. pH, temperatuur, druk, nutriënt aanvoer en afvoer van afvalstoffen) [33]. Het *in vitro* kweken van 3D cel-scaffold constructies onder condities die een efficiënte nutriëntvoorziening ondersteunen, eventueel samen met mechanische krachten⁸ om de cellulaire activiteit en fenotype te reguleren, is een belangrijke stap in de ontwikkeling van grafts voor de behandeling van beschadigd weefsel.

Ondanks dat statische uitzaaiing van cellen op een scaffold de meest klassieke methode is, worden o.a. een lage uitzaaiingsefficiëntie en niet-uniforme celdistributie gerapporteerd [33, 34].

⁸Mechanotransductie is het proces waarbij cellen mechanische stimuli detecteren en vertalen in biochemische signalen. ‘Shear stress’ wordt beschouwd als een van de belangrijkste mechanische stimuli voor het activeren van mechanotransductie. [34]

Enkele bioreactor systemen zijn [33]: (a) ‘spinner flask’ - tijdens de celuitzaaiing worden cellen getransporteerd door convectie; tijdens cultivatie zorgt het roeren van het medium voor een beter massatransport -; (b) ‘rotating-wall’ - dynamische culturomgeving, met lage ‘shear stress’ en hoog massatransport -; (c) ‘hollow fiber’ - wordt gebruikt voor het verbeteren van het massatransport tijdens de cultivatie van zeer hoog metabolische en gevoelige celtypen, cfr. hepatocyten -; (d) directe perfusie - het medium stroomt direct door de poriën van de scaffold, wat resulteert in grote uniformiteit en verhoogd massatransport zowel intern als extern -; (e) bioreactoren die gecontroleerde mechanische belastingen aanleggen.

Bioreactoren worden ontworpen met het doel op het creëren van micro-omgevingen onder dewelke cellen kunnen worden gemanipuleerd. De meeste perfusiesystemen laten geen continue beeldvorming toe, en de systemen die dit wel toelaten zijn ontworpen voor ‘*single cell evaluation*’. Met andere woorden, men beschikt achteraf enkel over een ‘*snapshot*’. Stephens *et al.* [34] ontwierpen een perfusiesysteem waar *in situ* beeldvorming van cellen en scaffold in ‘*real time*’ werd mogelijk gemaakt. De mogelijkheid om levende cellen in beeld te brengen in 3D scaffolds onder statische en dynamische flow zou kunnen helpen in de identificatie en optimalisatie van scaffold eigenschappen (oppervlaktechemie en architectuur), en ‘flow’ condities die cel responsen verbeteren.

2.3 Weefsel Architectuur

De meest kritieke stap in het tissue engineering proces is de uitzaaiing van cellen op een scaffold. Kritisch in die zin dat de juiste moleculaire en macroscopische architectuur van weefsel een essentieel aspect is om uiteindelijk de gewenste eigenschappen voor het gekweekte weefsel te bekomen [16]. De finale processtap is het kweken van weefsel in een bioreactor, en/of de implantatie en regeneratie *in vivo* [26].

Proliferatie en functievervulling van de celpopulatie wordt slechts mogelijk gemaakt na adhesie van de cellen aan het substraat. Celadhesie wordt doorgaans gereguleerd door ECM proteïnes zoals collageen, fibronectine, laminine, vitronectine en glycosaminoglycanen (zie 2.4: *Materiaal-Cel Interacties*). Bij adsorptie van proteïnen speelt de conformatie een belangrijke rol in het celadhesie- en groeigedrag op synthetische substraten. [15, 35]

Een kritisch aspect bij de performantie van cellen is de cel-cel communicatie. Dit omvat zowel de directe communicatie tussen cellen onderling, als de indirecte communicatie via secretie van signaalmoleculen. De dichtheid van de uitgezaaide cellen speelt hierbij een aanzienlijke rol. De uitzaaiingsefficiëntie wordt beïnvloed door [15]: (i) de affiniteit van oppervlakteproteïnes voor ECM componenten; (ii) de dichtheid aan bindingsplaatsen op het materiaaloppervlak, en; (iii) de aan- of afwezigheid van nutriënten. Zoals reeds eerder vermeld kan de efficiëntie mede worden verhoogd door directe incorporatie van cellen in het gebruikte biomateriaal. Zhou *et al.* [36] verhoogden de efficiëntie door het gebruik van ‘*cell sheets*’ bestaande uit ‘*multilayered porcine bone marrow stromal cells*’ (BMSC). De techniek toonde het potentieel van ‘cell sheets’ voor constructies met middelmatige tot hoge belasting doeleinden.

Als gesproken wordt over nutriënten komt men terecht bij één van de grootste vraagstukken uit het tissue engineering domein: de metabolische noden van cellen (nutriënt aanvoer en afvoer van afvalstoffen) [37]. Meer bepaald de nood aan zuurstof en de problematiek hiervan afgeleid voor ‘*tissue engineered constructs*’. Zuurstof kan slechts enkele honderden μm diffunderen [15], wat een fundamentele beperking met zich meebrengt. Het implantaat verbruikt de

aanwezige zuurstof in enkele uren, doch neemt angiogenese op zijn minst enkele dagen in beslag. Gedurende die dagen is er geen zuurstof- en nutriëntvoorziening naar niet geperfuseerde delen van het implantaat, wat leidt tot necrose van de geïmplanteerde cellen. Afhankelijk van het celtype is de nood aan zuurstof verschillend⁹. Hieruit volgt dat er voldoende aandacht dient te worden geschonken aan het induceren van vascularisatie. Een scaffold met voldoende haarvaten is in staat zuurstof en nutriënten voldoende aan te voeren naar alle cellen in de scaffold. Dit kan eventueel verwezenlijkt worden door de gecontroleerde afgifte van groeifactoren (bv. VEGF en FGF) [2, 21, 26, 37]. Via de lokale(!) afgifte van deze groeifactoren worden endotheelcellen aangetrokken die neovascularisatie stimuleren. Idealiter zou de scaffold geprevasculariseerd zijn vóór implantatie, waarna het prevasculaire netwerk zich hecht aan het natieve vasculaire netwerk [16, 37]. Ko *et al.* [37] beschreven de globale vascularisatieproblematiek. Het overkomen van deze problematiek wordt algemeen erkend als één van de grootste uitdagingen in het domein van tissue engineering. In conclusie werd gesteld dat de huidige trend probleemoplossend te werk gaat via de integratie van uiteenlopende parameters. Deze parameters hebben betrekking op design, groeifactoren, het gebruik van ECM matrices, en het kweken van de cel/scaffold constructies in biomechanisch dynamische omgevingen. Het gedrag van cellen en nutriëntopname kan ook verschillend zijn *in vitro* vs. *in vivo* [15] (cfr. figuur 2.2 [26]). Voor de performantie na implantatie dient hier uiteraard rekening mee te worden gehouden.

In het kader van een adequate driedimensionale stroming van cultuurmedium of bloed, met het oog op de continue toevoer van nutriënten en metabolieten, heeft een scaffold nood aan een interconnecterend poriënnetwerk [38]. Dit verklaart mede de eis aan interconnectie van poriën in een scaffold waarvan nu door de wetenschappelijke gemeenschap aangenomen wordt dat 100% interconnectiviteit ideaal is.

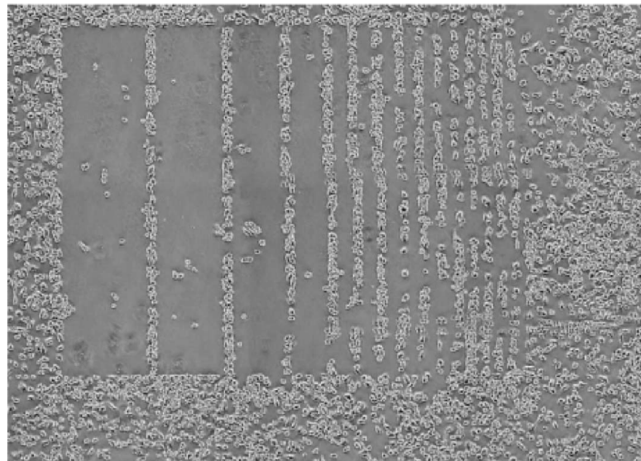
Het groeifactorafgifte-profiel moet lokaal en laag zijn zodat gelokaliseerde ingroei van weefsel wordt bekomen. Overmatige afgifte van bv. VEGF resulteert in ernstige vasculaire lekken en hypotensie. Dit beklemtoont het belang van een juiste concentratie ter preventie van tumorformatie. Groeifactoren kunnen geïncorporeerd worden via bulkinkapseling, specifieke en niet-specifieke oppervlakteadsorptie, en via microsferen. Het gebruik van groeifactoren vertoont echter enkele nadelen: kleine overlevingstijd van proteïnes, lage beschikbaarheid, enzymatische inactivatie, en hoge productiekosten. Het gebruik van gen transfer technieken kan hieraan mogelijks verhelpen. [2]

Eenmaal de cellen uitgezaaid nemen ze een stabiele vorm aan. De uiteindelijke celconformatie wordt bepaald door drie factoren: (i) adhesie tussen cellen en scaffold (functie van de affiniteit en aantal bindingsplaatsen); (ii) rigiditeit van de scaffold (weerstand tegen cel-geïnduceerde ‘*tractional forces*’), en; (iii) cel-cel adhesie. De eerste factor werd onderzocht door Mooney in 1992 [15] in het geval van hepatocyten. Verhoogde/verlaagde adhesie (grotere/lagere hoeveelheid fibronectine) zorgde voor een grotere/kleinere celspreiding, verhoogde/verlaagde DNA synthese, maar verminderde/behoud van expressie van lever-specifieke functies. Daarnaast kan het kwantitatieve verschil tussen cel-scaffold en cel-cel adhesie alsnog een potentiële factor in de organisatie van cellen op het substraat zijn. In verband met de rigiditeit kan gezegd worden dat cellen het substraat met hoge sensitiviteit aftasten (zie 2.7: *Materiaal-Cel Interacties*). Als het substraat te rigide is resulteert dit in de onmogelijke reorganisatie en rekrutering van receptoren. Anderzijds zal bij te compliante substraten celadhesie onmogelijk

⁹Vooraf hepatocyten en cellen uit de eilandjes van Langerhans zijn gevoelig aan oxidatieve stress

worden door de incompetentie om de geïnduceerde ‘tractional forces’ te weerstaan. [15, 21]

Een mogelijke manier om de celverdeling en -oriëntatie te controleren is via micropatterning. Dit is een techniek waarbij microkanaaltjes worden gemaakt op een schaal in de orde van natuurlijke organen (figuur 2.7). Een goede controle over de celoriëntatie is belangrijk bij het kweken van anisotroop weefsel. [15]

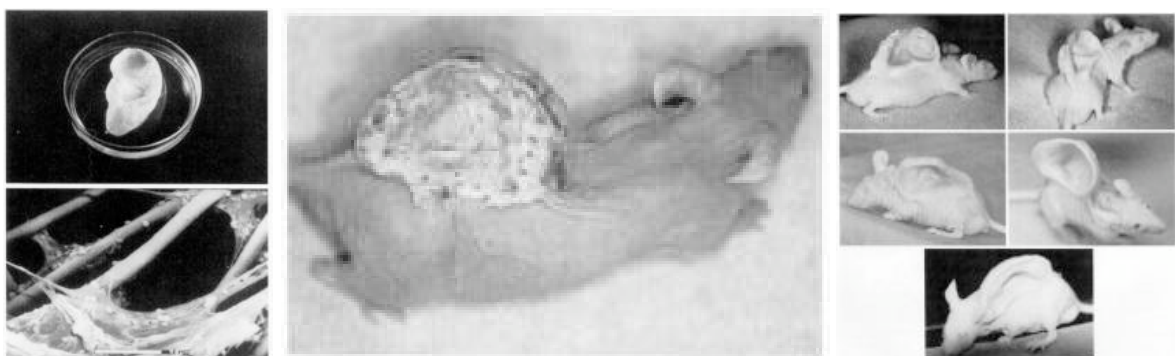


Figuur 2.7: Micropatterned groei van epitheelcellen (‘KB nasopharyngeal carcinoma cell line’) in een logaritmisch streep patroon. De breedte van de strepen is $50 \mu\text{m}$ en de afstand tussen de strepen varieert tussen $30 \mu\text{m}$ en $500 \mu\text{m}$. [39]

Natief zijn celsystemen overwegend heterotroop en er bestaat een nauwe structurele en functionele interactie met matrixcomponenten en cellen van andere types. Deze heterotypische celinteracties zijn essentieel voor het tot stand brengen van functionele weefsels en organen. De studie van cel-cel interacties in experimentele cultuursystemen van hogere complexiteit is relevant in de context van biomateriaal scaffolds voor weefselregeneratie. Kirkpatrick *et al.* [29] ontwikkelden co-cultuur systemen van menselijke osteoblasten met ofwel primair geïsoleerde microvasculaire endotheelcellen, ofwel met gematureerde endotheelcellen geïsoleerd van progenitor endotheelcellen uit het beenmerg. Het voordeel van *in vitro* experimenten is dat de complexe werkelijkheid wordt gesegmenteerd in minder complexe fenomenen die wetenschappelijk eenvoudiger te controleren vallen. Het nadeel is dat het overgaan van *in vitro* naar *in vivo* situaties niet altijd even eenduidig en rechtlijnig is. [15, 29]

Het bekomen van een goede performantie van weefsel is essentieel. Volgens Griffith en Naughton [16] hangen de opgelegde fysiologische stresses tijdens het engineering proces *in vitro* hier nauw mee samen. Dit wordt gereflecteerd in de evolutie van bioreactoren. De eerste generatie was enkel ontwikkeld voor het rondpompen van cultuurmedium. Vanaf de tweede generatie werd er meer aandacht geschonken aan de reproductie van het natieve milieu, cfr. gebruik van gepulseerde stromen voor engineering van bloedvaten [37]. Door de complicaties van een ‘scale-up’ voor klinisch gebruik, lijkt de interesse te verschuiven naar systemen waarbij *in situ* weefsel wordt ge-engineerd. Hierbij wordt mechanische stress op natuurlijke wijze aangebracht.

Eén van de eerste grote doorbraken in het tissue engineering domein situeert zich in 1997 [40]. In 1999 werd de media opgeschud door een foto van een muis met een menselijk uitziend oor op de rug (figuur 2.8). Het bijschrift postuleerde dat het om genetische modificatie ging. Het ging echter allesbehalve om genetische modificatie, eerder een ‘*proof of principle*’ van het tissue engineering concept. Een polymeer scaffold (PGA-PLA) werd bezaaid met chondrocyten van een koe. De scaffold werd geconstrueerd op basis van een afdruk, genomen van de auricle van een 3-jarig kind. Het geheel werd geïmplanteerd op de dorsa van muizen. Er werd geconcludeerd dat de scaffold degradeerde en dat neogeneratie van kraakbeen werd bewerkstelligd. Het oor werd nooit overgetransplanteerd naar een mens. Sindsdien wordt gerefereerd naar de muis als de zogenaamde *Vacanti mouse*, naar Charles A. Vacanti, regisseur van de transplantatie. Zoals te verwachten veroorzaakte het artikel uit de New York Times (1999), waarin de foto’s wijdverspreid werden, een enorme opschudding.



Figuur 2.8: Vacanti mouse: (links) PGA scaffold bezaaid met chondrocyten; (linksonder) SEM toont de adhesie van chondrocyten op de scaffold; (midden) transplanteren van de scaffold; (rechts) 12 weken na implantatie [40]

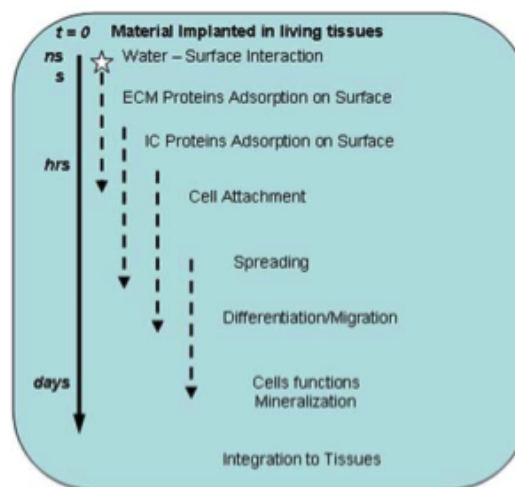
2.4 Materiaal-Cel Interacties

De interactie die plaatsgrijpt tussen cellen en een biomateriaal wordt bepaald door de bioactiviteitsgraad van het materiaal. Het ontwikkelen van biomaterialen was veelal een ‘*trial-and-error*’ methode, hoewel vanuit wetenschappelijke takken meer en meer gestreefd wordt naar het ontwikkelen van technieken voor biomateriaal evaluatie: “*materiomics*” [2]. Daarnaast lokt de implantatie van lichaamsvreemd materiaal een respons uit van het lichaam: inflammatoire reactie, ‘foreign body reaction’ [29, 41]. De biocompatibiliteit van een biomateriaal speelt hierbij een cruciale rol. Voor tissue engineering zijn biomaterialen nodig die een interactie vertonen met cellen (\sim bioactief) en eveneens een zo min mogelijke inflammatie uitlokken door de gast (\sim biocompatibel). Het liefst van al zijn de gebruikte biomaterialen eveneens biodegradeerbaar/ bioresorbeerbaar. Dit impliceert dat de fenomenen die plaatsgrijpen aan de interfase tussen het implantaat en het weefsel geen nadelige effecten (chronische inflammatie of formatie van overbodig weefsel) mogen induceren [4].

De bulkeigenschappen van het materiaal vertolken de fysische en chemische eigenschappen gedurende de leefbare tijd van het implantaat [4]. Het oppervlak – zowel chemisch als fysisch – bepaalt de interactie tussen het implantaat en weefsel. De interacties tussen een oppervlak

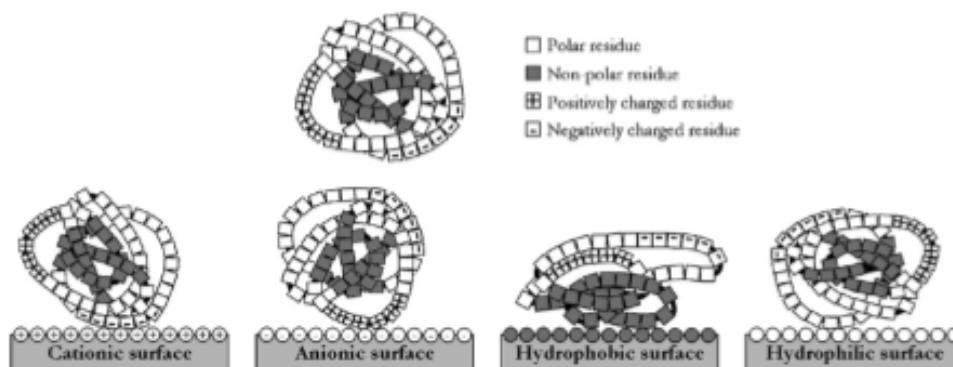
en zijn omringend weefsel, na implantatie, vormen een proces dat kan onderverdeeld worden in 4 verschillende stadia [42]:

1. Migratie van watermoleculen naar het oppervlak en vorming van een 'water shell' (nanoseconden);
2. Adsorptie van proteïnes uit de ECM (seconden tot uren);
3. Cellen bereiken het oppervlak en interageren met het implantaat via de geadsorbeerde proteïnes (minuten tot dagen);
4. Het nuttige leven van het implantaat (dagen tot enkele tientallen jaren);



Figuur 2.9: Voorbeeld van een materiaal-weefsel (bot) interactie in de tijd [42]

Het tweede stadium wordt gekarakteriseerd door het zogenaamde *Vroman effect* [35, 41, 42]. Dit effect slaat op het complexe competitieve proces van adsorptie (figuur 2.10) – desorptie van de vele aanwezige proteïnes.

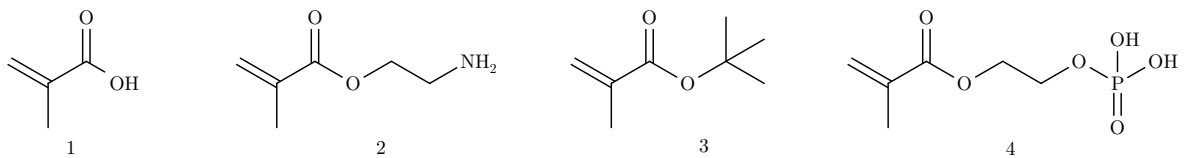


Figuur 2.10: Adsorptie van proteïnes [18]

In het derde stadium grijpt adhesie, migratie en differentiatie van cellen plaats en dit complexe proces is sterk afhankelijk van verschillende oppervlakte-eigenschappen en wordt beïnvloed door biologische moleculen. Cellen voelen hun omgeving af door gebruik te maken van protrusies (*lamellipodia* of *pseudopodia* bij respectievelijk epitheelcellen en fibroblasten, of amoebae en neutrofielen). Protrusies zijn bladvormige structuren (ordegrootte micron) samengesteld uit een actine filament ‘*mesh*’ met, op het einde, kleinere haarachtige protrusies, *filopodia*. Filopodia bestaan uit lange, dunne actine filamentbundels die functioneren als voelsprietten en de ECM en het substraat oppervlak “voelen”. Als een bindingsplaats wordt gevonden start een feedback cascade die de localisatie van meerdere receptoren in die regio mogelijk maakt. [2, 42]

Bovenstaande uitleg accentueert nog maar eens het belang van het materiaaloppervlak. Het hydrofiele/hydrofobe karakter van een oppervlak is één van de factoren die celadhesie en functie kan beïnvloeden [42]. Via coating van het oppervlak met een proteïne of de incorporatie van bindingsplaatsen kan celadhesie worden gestimuleerd. Dit is het domein van de oppervlaktemodificatie/functionalisering. De covalente binding van biomoleculen aan een oppervlak gebeurt in twee stappen: (i) activatie van het oppervlak, en; (ii) de immobilisatie van proteïnes of de immobilisatie van kleine peptide sequenties (bv. de RGD sequentie) [2, 35]. Naast covalente binding bestaan nog elektrostatische- en affiniteitsinteractie [18, 4]. In hoofdstuk 4 wordt dieper ingegaan op het concept oppervlaktemodificatie.

Collageen- en gelatine immobilisatie worden frequent gebruikt [18, 22, 43]. De grote complicatie van collageen is zijn immunogeen en antigeen gedrag [2, 22]. Gelatine is, omwille van zijn verwerkingsgemak bij hoge concentraties, en de afwezigheid van antigeen gedrag, een geschikt alternatief. Door coaten met dergelijke proteïnes worden aanhechting, proliferatie en ECM depositie bevorderd. Incorporatie van RGD bevordert niet alleen celadhesie en groei, maar in sommige gevallen zelfs differentiatie en ECM productie [2]. Daarnaast zijn de betere stabiliteit, verhoogde kans op de juiste oriëntatie van bindingsdomeinen, en het economische aspect, voordelen van kleine peptide sequenties t.o.v. integraal proteïnegebruik [18]. Benoit *et al.* [44] rapporteerde de bevinding dat hMSCs (‘human mesenchymal stem cells’) osteogene of adipogene differentiatie kunnen ondergaan door immobilisatie van kleine functionele groepen. Enkele van deze functionele groepen worden voorgesteld in figuur 2.11. In de plaats van complexe biomoleculen kan differentiatie dus ook plaatsgrijpen door immobilisatie van kleine functionele groepen. Dit impliceert dat de aanmaak van therapeutische materialen eenvoudiger, goedkoper en makkelijker te controleren verloopt. De auteurs beweren dat dit het eerste voorbeeld is waarin enkel de synthetische matrix de inductie van differentiatie beïnvloedt aan de hand van kleine chemisch functionele groepen.



Figuur 2.11: Enkele functionele groepen die differentiatie stimuleren: (1) methacrylzuur; (2) 2-aminoethyl methacrylaat; (3) t-butyl methacrylaat; (4) ethyleen glycol methacrylaat fosfaat

Naast deze interacties kunnen evenzeer nadelige responsen ontstaan, cfr. bloedklontering, fibreuze capsulevorming, falen van het implantaat, . . . [29, 41, 42]. Anderson *et al.* [41] verschaften in 2008 een gedetailleerde review die het gehele proces beschrijft. Hierin wordt onder meer uiteengezet dat de oppervlaktechemie zijn impact heeft op het gedrag van macrofagen (adhesie, apoptose, fusie, cytokine secretie, . . .).

Het unieke aan tissue engineering is zijn hybride karakter. Er worden cellen, proteïnes en/of andere biomoleculen gecombineerd met biomaterialen voor functionele regeneratie van ziek/beschadigd weefsel. Het implantaat zal *in vivo* onderhevig zijn aan inflammatoire mediators en signaalmoleculen zoals cytokines, groeifactoren, en ECM enzymen/proteïnes. Deze kunnen, afhankelijk van het celtype, activatie, differentiatie, proliferatie, of migratie uitlokken. Ondertussen moet het implantaat zijn functie en eigenschappen kunnen bewaren temidden van deze gecompromitteerde omgeving. [42]

Hoofdstuk 3

Scaffold Ontwerp: Conventionele vs. RP Technieken

Scaffold ontwerp is onderhevig aan verschillende, soms conflicterende vereisten (zie 2.2.3: Scaffolds). Eén van de grote moeilijkheden bij het ontwerpen van een scaffold is de introductie van een gecontroleerde interne architectuur, en poriën. Verschillende technieken werden ontwikkeld voor de introductie van porositeit. Deze kunnen opgedeeld worden in conventionele technieken en rapid prototyping (RP) technieken.

3.1 Conventionele Technieken

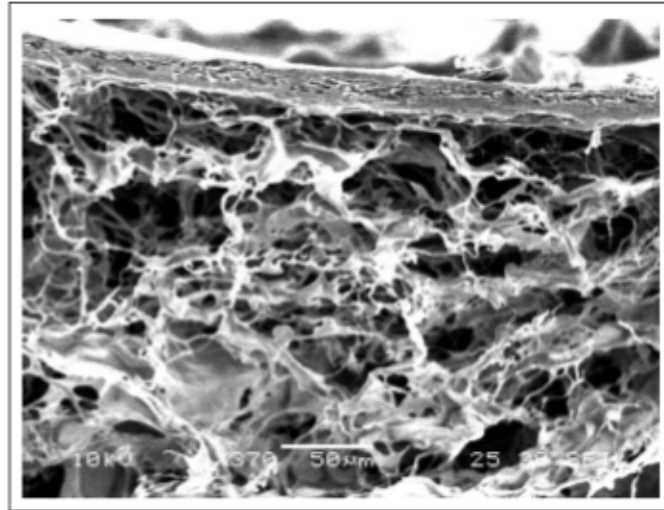
‘Solvent-casting’ en ‘particulate-leaching’, ‘gas foaming’, ‘fibre networking’, ‘phase separation’, ‘melt moulding’, ‘emulsion freeze drying’, ‘solution casting’ en ‘freeze drying’ zijn conventionele technieken [2, 20, 21, 22].

Conventionele/klassieke technieken worden gedefinieerd als processen die scaffolds creëren met de eigenschap van een continue, ononderbroken poriënstructuur, doch met een gebrek aan enige vorm van *‘long-range’* microarchitecturale kanaaltjes [22]. Scaffolds die geproduceerd worden via dergelijke technieken voldoen in vele gevallen niet aan de vereisten van een ideale scaffold. Zo zijn enkele nadelen door het gebruik van conventionele technieken [2]:

- Mindere mechanische sterkte;
- Gelimiteerde porositeit en gebrekkige interconnectiviteit;
- Patiëntspecifieke implantaten zijn moeilijk te produceren door de minder controleerbare externe geometrie;
- Onmogelijkheid tot het bekomen van een spatiale poriëndistributie (interne kanaalvorming is niet mogelijk);

Met andere woorden, er is een gelimiteerde mogelijkheid voor de precieze controle van poriëngrootte, poriëngeometrie, interconnectiviteit van poriën, spatiale distributie van poriën en de constructie van interne kanalen in de scaffold. Onderzoekers poogden dan ook deze technieken te modifieren om tegemoet te komen aan hun limitaties. Ongeacht dergelijke verbeteringen blijft de controle over de scaffoldarchitectuur procesafhankelijk in plaats van designafhankelijk. [21]

De beperkte controle over de interne architectuur heeft zijn invloed op de zuurstof- en nutriëntvoorzieningen van cellen. Als gevolg van de gebrekkige zuurstof/nutriëntvoorzieningen en onvoldoende afvoer van afvalstoffen, kunnen cellen niet dieper migreren (zie figuur 3.1). Cellen overleven bijgevolg enkel in de nabijheid van het oppervlak. Uitsluitend de generatie van kraakbeen met een doorsnede groter dan 1 mm werd, met behulp van conventionele technieken, als succesvol gerapporteerd. Wellicht ligt de lage zuurstofnood van chondrocyten aan de basis. [22]



Figuur 3.1: Scaffold geproduceerd via ‘freeze-drying’. De poriën zijn interconnected maar heterogeen. Een dense laag “huidis gevormd aan het oppervlak. Deze beïnvloedt sterk de diffusie-efficiëntie van de scaffold. [21]

Naast de architecturale beperkingen van conventionele scaffold fabricagetechnieken is het tweede grote nadeel van conventionele technieken (excl. ‘gas foaming’ en ‘melt moulding’) het gebruik van organische solventen. Chloroform en dichloormethaan worden frequent gebruikt in de loop van het proces voor het oplossen van synthetische polymeren. De aanwezigheid van residueel organisch solvent is een significant probleem door de toxiciteitsrisico’s en de carcinogeniteit voor cellen. [22]

3.2 Rapid Prototyping als krachtig Alternatief

Als een alternatief voor conventionele fabricagetechnieken zijn recent een groep technieken voorhanden, genaamd ‘*Rapid Prototyping techniques*’ [20]. ‘*Solid freeform fabrication*’ (SFF) is de algemene term voor een aantal technieken die vaste objecten produceren door de specifieke, sequentiële afgifte van energie en/of materiaal. In de literatuur wordt hiernaar verwezen als ‘*layered manufacturing*’, ‘*additieve fabricage*’, ‘*rapid prototyping*’ (RP), ‘*rapid manufacturing*’ (RM) en ‘*rapid tooling*’ (RT). RP, RM en RT slaan respectievelijk op de snelle productie van een prototype, een afgewerkt object of een afgewerkt gereedschap. [2]

‘Rapid prototyping’ is een additief proces waarbij elk deel geconstrueerd wordt aan de hand van een laag-op-laag manier. In het algemeen wordt het fysische object gegenereerd aan de

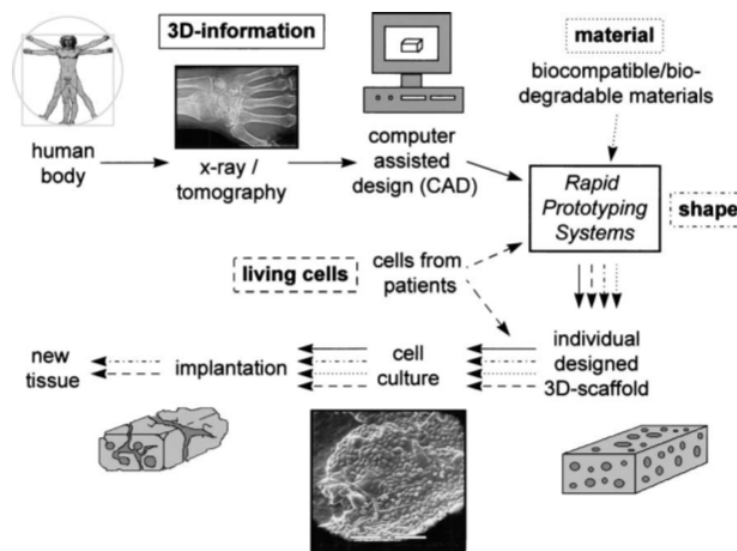
hand van een 3D computermodel [2, 20, 21, 22]. Een dergelijk model kan op 2 manieren tot stand komen: (i) ontwerp aan de hand van CAD software, of; (ii) het incorporeren van 3D data bekomen via CT- of MRI- scans. De laatste manier benadrukt meteen het enorme voordeel van RP technieken, nl. directe fabricage van scaffolds met een complexe, patiëntspecifieke externe geometrie [2, 20, 22]. De hoge graad van interconnectiviteit, precieze controle van de interne architectuur¹, mogelijk gebruik van heterogene materialen, de snelheid door de hoge mate van automatisatie en het gelimiteerde aantal processtappen, en de superieure kost vs. efficiëntie zijn belangrijke voordelen van de RP technieken ten opzichte van conventionele technieken [2]. De goede controle die mogelijk is met betrekking tot de interne architectuur van een scaffold heeft een positieve weerslag op weefselvorming, zoals reeds eerder besproken.

Meestal worden RP technieken onderverdeeld in directe en indirecte methoden. Bij eerstgenoemde wordt direct een scaffold geproduceerd uit een biomateriaal. Bij indirecte methoden wordt via RP een mal gemaakt, waar de scaffold dan secundair via processing van een biomateriaal wordt bekomen.

De procesketen van RP technieken kan in 4 stappen worden onderverdeeld [2, 20, 21, 22, 38]:

- 3D modellering: via software of via beeldvormingstechnieken
- Data conversie en transmissie: conversie van de CAD data naar een STT file en segmentatie van de STT file in lagen + transmissie naar het RP toestel;
- Controle en voorbereiding;
- Productie en postprocessing;

De algemene visie waarbij beeldvormingstechnieken, CAD/CAM systemen, tissue engineering en RP technieken worden gecombineerd wordt voorgesteld in figuur 3.2.

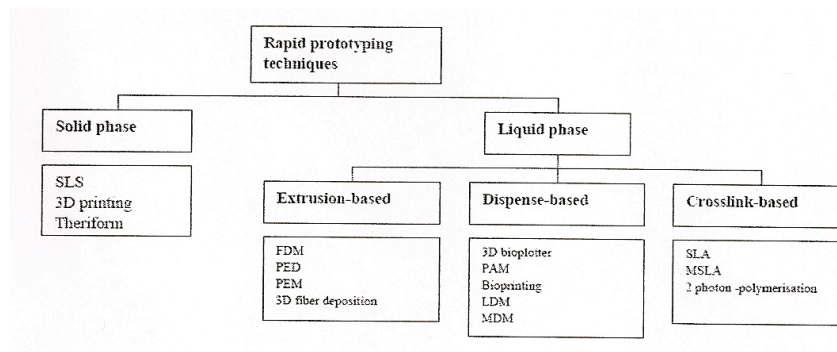


Figuur 3.2: Algemene visie voor het gebruik van RP technieken in de biomedische wereld [38]

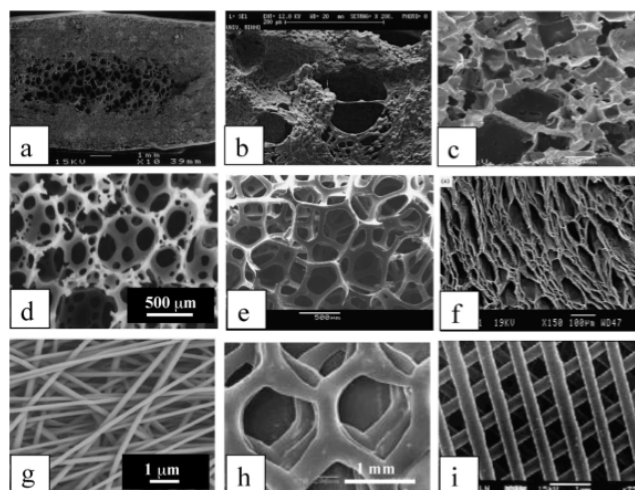
¹Logischerwijze wordt dit nog steeds beperkt door de resolutie van het systeem

Grosso modo bestaan er meer dan 30 RP technieken die gebruikt worden in de meest uiteenlopende industrieën [45]. Een 20-tal daarvan worden gebruikt in de biomedische wereld. Deze systematisch uiteenzetten zou het doel van deze literatuurstudie overstijgen. Vandaar dat geopteerd wordt voor de weergave van een algemeen schematische indeling en enkele SEM afbeeldingen die het onderscheid tussen conventionele en RP technieken aantonen. Eén techniek wordt verder besproken in hoofdstuk 4: *3D-Bioplotter*.

Tabel 3.1: Overzicht van enkele RP technieken [2]



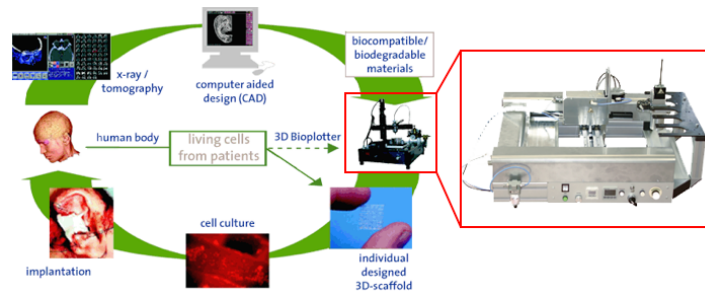
In figuur 3.3 worden enkele SEM doorsneden van scaffolds weergegeven, met foto's a-g afbeeldingen van conventioneel gefabriceerde scaffolds en h-i afbeeldingen van RP gefabriceerde scaffolds. Uit het verschil tussen beide groepen (a-g vs. h,i) valt ogenblikkelijk de precieze controle van het interne poriënnetwerk op bij de RP gefabriceerde scaffolds. Het is bovendien duidelijk dat door toepassing van RP technieken een goed te controleren spatiale poriëndistributie kan worden verkregen met hoge graad van interconnectiviteit.



Figuur 3.3: Typische poreuze structuren bekomen via: (a) ‘melt moulding’; (b) ‘extrusion with gas blowing’; (c) ‘particle leaching’; (d) ‘paraffin microsphere leaching’; (e) ‘gas foaming’; (d) ‘phase separation/freeze drying’; (g) ‘electrospinning’; (h) ‘3D-Printing’; (i) ‘fused deposition modelling’ [25]

3.3 3D-Biplotter

De procesketen voor de productie van geplotte 3D implantaten wordt schematisch voorgesteld in figuur 3.4. Deze is analoog aan de vooropgestelde algemene visie van RP technieken voor biomedische toepassingen (figuur 3.2).



Figuur 3.4: Procesketen van 3D-bioplotting

Het succes van een tissue engineered constructies is in grote mate afhankelijk van het ontwerp en dit vormt het uitgangspunt voor het succes van RP technieken [2]. Een goede controle van de interne architectuur enerzijds is nodig in het kader van weefselregeneratie, een goede controle van de externe architectuur anderzijds laat toe patiëntspecifiek te werken. Organen zijn 3D structuren die bestaan uit levende cellen en een draagstructuur (ECM). Op basis van de mechanische sterkte van de draagstructuur kan een indeling in harde en zachte weefsels gemaakt worden. Hoogstwaarschijnlijk zal de vervanging van hard weefsel (bot) succesvol zijn met FDM-gebaseerde scaffolds uit “harde” polymeren (of composieten van polymeren en keramieken). De mogelijkheden en vereisten voor zachte weefsels zijn echter verschillend. Zacht weefsel heeft een grote waterinhoud, en is in feite opgebouwd uit levende cellen en de ECM, die de cellen op de juiste plaats houdt en de mechanische sterkte bepaalt. Uit deze kennis volgt dat hydrogelen geschikte materialen zijn voor de regeneratie van zacht weefsel. Hydrogelen zijn chemische of fysische 3D netwerken die kunnen zwellen zonder daarbij in oplossing te gaan. Ze hebben dus het vermogen veel water op te nemen en laten bijgevolg een goede diffusie van hydrofiele substanties toe. Met andere woorden, zuurstof, zouten, nutriënten en metabolieten kunnen worden aan- of afgevoerd. Een gegeven dat de incorporatie van cellen mogelijk maakt. Verder is de hoeveelheid droog polymeer laag, waardoor degradatieproducten slechts in geringe hoeveelheden voorkomen, met een verminderde immuunrespons als effect. [20, 38, 46]

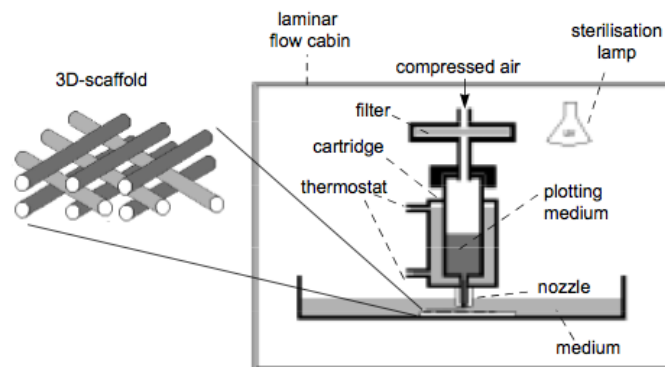
Voor tissue engineering van zacht weefsel dient de RP technologie aan een aantal voorwaarden te voldoen [38]: (1) gebruik van hydrogelen; (2) de range aan hydrogelen zou zo breed mogelijk moeten zijn gezien de mechanische en chemische condities van zacht weefsel; (3) toxische contaminatie (cfr. solventen) moet vermeden worden; (4) de temperatuur mag niet boven de 37°C komen (denaturatie van proteïnes), en; (5) de optie om groeifactoren te incorporeren is gewenst. Hoge resoluties zijn niet noodzakelijk gezien de flexibiliteit van hydrogelen.

De procescondities van STL, SLS en CNC milling laat geen verwerking van hydrogelen toe. Daarnaast is het verwerken van hydrogelen via de 3D-printing en FDM technieken nog niet beschreven. Samengevat komen de standaard RP technieken niet in aanmerking voor de productie van ‘soft tissue’ implantaten. [20, 38]

3.3.1 3D-Biplotter

De Biplotter, een veelbelovend RP apparaat uitgevonden in het jaar 2000 aan de 'Freiburg Materials Research Centre' (Duitsland), is een commercieel beschikbaar plotsysteem dat toelaat om scaffolds te creëren van materialen met een lage mechanische sterkte [2, 20, 38]. In figuur 3.4 wordt het toestel afgebeeld, in figuur 3.5 wordt schematisch de werkwijze voorgesteld. Een plotting materiaal (eventueel met cellen) wordt onder druk gedispenseerd uit een 'cartridge' in een vloeibaar medium met gelijkaardige densiteit. Alles is computergestuurd. De 'nozzle' kan hierbij in de x-, y- of z-richting bewegen met een standaard resolutie van 50 μm . De resolutie van het systeem hangt samen met de diameter van de naald die meestal tussen 200-300 μm bedraagt. Op die manier kan een 3D scaffold laag na laag op een gecontroleerde manier opgebouwd worden. Hierop kunnen cellen worden uitgezaaid die eventueel culturen van de patiënt zijn, waardoor een autoloog implantaat wordt geproduceerd.

Landers *et al.* [38] rapporteerde de fabricage van alginaat hydrogel scaffolds door het plotten van een waterige oplossing van sodium alginaat, gelatine en EDTA in een waterige CaCl_2 oplossing van 0,03 mol/l. Het alginaat vormt een gel in de directe omgeving van calciumionen. Een andere toepassing was de fabricage van fibrine/alginaat scaffolds. De scaffolds vertoonden een specifieke externe vorm en een intern poriënnetwerk met 100% interconnectiviteit. Als voorbeeld werd de geometrie van een neus geplot (figuur 3.6).

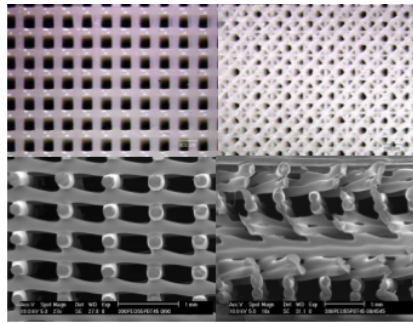


Figuur 3.5: Schema van de 3D-Biplotter werking [38]



Figuur 3.6: Silicone model van een neus via 3D plotten [38]

De performantie van de 3D-Biplotter werd gealtereerd door Moroni *et al.* in samenwerking met Envisiontec, voor de extrusie van thermoplastische polymeren op hoge temperatuur [2]. Moroni *et al.* [31, 32] onderzochten de invloed van de scaffoldarchitectuur op de dynamisch mechanische eigenschappen. Het resultaat bevestigde dat de visco-elastische eigenschappen gemoduleerd konden worden door de interne architectuur aan te passen. Hieruit blijkt dat porositeit en fiber depositie/oriëntatie cruciale factoren zijn (figuur 3.7).

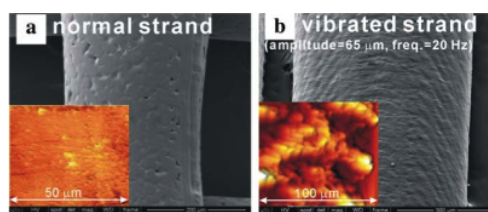


Figuur 3.7: SEM van scaffold doorsneden [32]

Het grote verschil tussen de 3D-Biplotter en andere dispensietechnieken is het gebruik van een plotting medium met aangepaste densiteit. De resulterende graviteitscompensatie maakt het gebruik van laagvisceuze materialen mogelijk zonder dat de struts invallen (en dus de poriën sluiten) en verbreedt het spectrum aan mogelijke plotmaterialen [20, 23, 38]. Het medium kan ook fungeren als ‘*cross-linking agent*’.

Temperatuurgevoelige componenten zoals proteïnes en groeifactoren kunnen geïmplementeerd worden in het plotting proces. De biplotter is zo geconcipeerd dat hij in een steriele omgeving (steriele laminaire stroming) gebruikt kan worden waardoor werken met levende cellen mogelijk wordt gemaakt. Er werd aangetoond dat cellen de chemische en mechanische stress waaraan ze worden blootgesteld tijdens het plotproces overleven. Met andere woorden, het is mogelijk om “levende” scaffolds te produceren. [38]

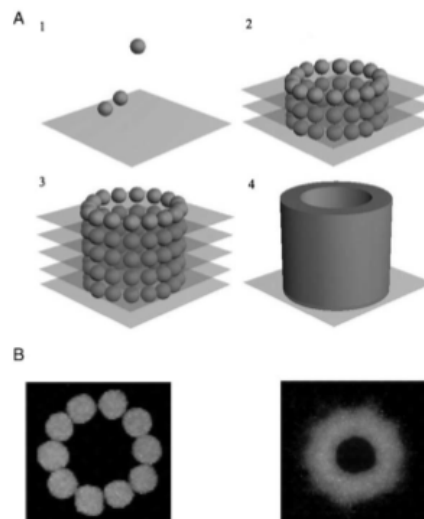
Eén van de grote nadelen die wordt geassocieerd aan het gebruik van de biplotter is het verkrijgen van zeer gladde oppervlakken die celhechting bemoeilijken [20, 47]. Coaten of modificeren van het oppervlak is dan ook opportuun [20]. Kim en Son [47] presenteerden een oplossing door het gebruik van een piëzo-elektrische transducer (PZT) die de oppervlakteruwheid verhoogt (figuur 3.8). Het resultaat toonde een verhoogde compressiemodulus en verbeterde celadhesie en proliferatie.



Figuur 3.8: Vergelijking van de oppervlakteruwheid via AFM [47]

3.3.2 Bioprinting

Een andere veelbelovende techniek ontwikkeld door Boland *et al.* [20]/Mironov *et al.* [24] is de techniek van het bioprinten of orgaanprinten. Bioprinten wordt gedefinieerd als de geautomatiseerde, computer gestuurde, laag-na-laag depositie van cellen en celaggregaten, opgevolgd door een maturatieproces van de geprinte constructie tot gevasculariseerd levend weefsel of orgaan [24]. Het uitgangspunt van dit proces verschilt van andere conventionele tissue engineering methodes. Dit proces steunt immers op de zelforganiserende (*'self-assembly'*) eigenschappen van cellen tot weefsel en, uiteindelijk, tot organen, door het nabootsen van de natuurlijke morfogenese. Als voorbeeld worden endotheelcellen beschouwd. Deze zijn genetisch voorbestemd om bloedvaten te vormen. Op basis van de *'self-assembly'* hypothese zouden, indien de geschikte externe condities worden opgelegd, endotheelcellen tubulaire structuren vormen. De eerste uitdaging is het opleggen van de juiste externe condities.



Figuur 3.9: (A) bioprinting sequentie; (B) 12 bio-inkt partikels (eicellen van Chinese hamsters), geprint in collageen type I hydrogel (links) fuseren tot een continue structuur na ongeveer 120u (rechts) [24]

Het bioprinten omvat in 4 belangrijke componenten [20, 24]: (i) een bio-inkt; (ii) biopapier; (iii) bioprinter, en; (iv) bioreactor. De bioprinter kan een gemodificeerde commerciële printer zijn (voordelen: goedkoop, snel en veelzijdig; nadelen: harde mechanische condities voor cellen) of een mechanische extruder die werkt op druk (voordelen: minder harde condities en mogelijke afgifte van multicellulaire aggregaten; nadelen: hogere kost, trager en parallelle processing is moeilijk) [24]. De voorheen besproken 3D-Biplotter kan fungeren als bioprinter [2]. Celprinting is echter nog een techniek in volle ontwikkeling. Voornamelijk vascularisatie blijft een fundamenteel probleem [20, 37]. Daarnaast zijn er nog vragen omtrent steriliteit en de viabiliteit van cellen [2, 24].

Hoofdstuk 4

Oppervlaktemodificatie

Een aspect waar reeds veelvuldig de klemtoon op werd gelegd is het begrip biocompatibiliteit enerzijds en het anderzijds daarmee samenhangende domein van de oppervlaktemodificatie. Het vinden van een enkelvoudig biomateriaal dat voldoet aan alle vereisten betreffende biocompatibiliteit, mechanische sterkte, en degradatie is onbegonnen werk [4]. Dit is een probleemstelling waarmee men dikwijls geconfronteerd wordt bij tissue engineering (of algemeen in de regeneratieve geneeskunde). Er dienen dan ook compromissen te worden gesloten die samengevat neerkomen op, (i) ofwel het gebruik van composietmaterialen die de eigenschappen van meerdere biomaterialen gaan combineren, en/of; (ii) modificatie van het materiaaloppervlak. Klassiek vertrekt men van een biomateriaal dat voorziet in de gewenste bulkeigenschappen, waarna men de mogelijkheid heeft om de oppervlakte-eigenschappen te modificeren (met behoud van bulkeigenschappen) [4, 42].

4.1 Redenen voor Oppervlaktemodificatie

Het is van groot belang dat een inflammatoirespons van het lichaam, die wordt uitgelokt door implantatie van lichaamsvreemd materiaal, tot een minimum wordt herleid¹. Een conclusie betreffende de materiaal-cel interacties was de hoge sensitiviteit waarmee cellen het oppervlak kunnen aftasten. Men heeft er dus alle belang bij om biomimetische materialen te creëren, materialen waarvan het oppervlak bindingsplaatsen verschaft gelijkend op de natuurlijke ECM [29]. Dergelijke ‘*biomimetic surfaces*’ bekomt men aan de hand van modificatietechnieken. Deze technieken steunen op de immobilisatie van proteïnes of de introductie van specifieke bindingsplaatsen (zoals de RGD sequentie).[4, 18, 42]

Een techniek waarbij het principe steunt op de nabootsing van natieve structuren is de elektrospinning (ESP) techniek. ESP creëert fibers met gelijkaardige fysische structuur als collageen, waardoor men een biomimetisch materiaal bekomt (zie figuur 3.3: g). [19, 48]

Een tweede mogelijke reden is de alteratie van het hydrofobe/hydrofiele karakter van een materiaaloppervlak, aangezien dit nauw samenhangt met het adsorptieprofiel van proteïnes. Als vuistregel geldt meestal dat hoe hydrofober een oppervlak is/gemaakt wordt, hoe meer adsorptie kan verwacht worden. Dit karakter bepaalt mede de bevochtigbaarheid van het materiaaloppervlak. [18]

In sommige gevallen is het gewenst de adsorptie van proteïnes zo laag mogelijk te houden. Er wordt hierbij gedacht aan catheters, en vasculaire materialen/implantaten. De in het algemeen aangewende strategie is het graften van het oppervlak met PEO.

¹PLGA is een ‘FDA approved’ en veelgebruikt biomateriaal met goede biocompatibiliteit en biodegradeerbaarheid. De degradatieproducten zijn natuurlijke componenten

In hoofdstuk 2: *Tissue Engineering* werden drie doelstellingen gedefinieerd met betrekking tot scaffolds. Uit de derde doelstelling volgt de nood aan een geschikte oppervlaktechemie voor het bekomen van de gewenste celadhesie, proliferatie en differentiatie. Het is immers geweten dat de interactie tussen cellen en oppervlaktes in belangrijke mate het cellulaire gedrag bepalen, en vele aspecten van de celfysiologie (adhesie, spreiding, activatie, rekrutering, migratie, proliferatie, en differentiatie) beïnvloeden of controleren [4, 49, 50]. Men streeft ernaar om specifieke interacties uit te lokken met de biologische omgeving [18].

Andere redenen kunnen de alteratie van de bloedcompatibiliteit, controle over de proteïne adsorptie/de anti-bacteriële eigenschappen/het toxiciteitsprofiel (bv. coating van metalen implantaten), of de verbetering van ‘wear-’ en ‘corrosion resistance’ zijn [4]. Controle over de proteïne adsorptie valt te verklaren vanuit de vaststelling dat cellulaire interacties met (natuurlijke en) artificiële oppervlakken gemiddeld worden door geadsorbeerde proteïnes (cfr. trombose, hemostase) [35].

Algemeen grijpen de interacties tussen een biologische omgeving en biomaterialen plaats aan het materiaaloppervlak. De biologische respons van levend weefsel op lichaamsvreemd materiaal hangt in grote mate af van de oppervlakte-eigenschappen, zoals de chemische samenstelling, bevochtigbaarheid, zuiverheid, textuur, oppervlakte-energie, corrosieweerstand, topografie, lading, en de neiging om nabije proteïnes te denatureren [50]. In het bijzonder wordt de biocompatibiliteit van een materiaal bepaald door de interacties op micro- en nanoschaal, en de fysicochemische oppervlakte-eigenschappen [4, 42]. Oppervlaktomodificatie wordt uitgevoerd indien [42]: (i) goed niet goed genoeg is; (ii) een apparaat het functioneel gezien nodig heeft, of; (iii) product differentiatie vereist is (\sim competitie op de markt).

4.2 Modificatie van Oppervlakken

De oppervlaktomodificatie technieken kunnen onderverdeeld worden in technieken waarbij chemisch functionele groepen worden geïntroduceerd op het oppervlak, en technieken voor de immobilisatie van bioactieve moleculen [50]. Door de introductie van polaire groepen wordt de bevochtigbaarheid en celadhesie verbeterd. In het geval van succesvolle oppervlaktomodificatie blijven de mechanische eigenschappen en het functionele karakter van het materiaal of het ‘device’ onveranderd, doch kan de weefsel interfase-gerelateerde biocompatibiliteit verbeterd worden [4].

4.2.1 Introductie van functionele groepen op oppervlakken

Functionele groepen kunnen op directe of indirecte wijze geïntroduceerd worden op een oppervlak. Bij de indirecte methode wordt een polymeer geënt op het oppervlak, of gepolymeriseerd vanaf het oppervlak. Het polymeer bevat de gewenste functionaliteit. In wat volgt worden enkele methodes bekeken. In 2007 werd door Roach *et al.* [42] een samenvattende tabel opge maakt van functionele groepen die hun effect vertonen op adhesie, proliferatie, differentiatie, mRNA expressie en spreiding van cellen (tabel 4.1).

‘Wet chemical’. Bij ‘wet chemical’ modificatie wordt een oppervlakte behandeld met een vloeistof voor de directe introductie van functionele groepen. Deze klassieke methode heeft als belangrijkste voordeel zijn gemakkelijke toepassing, naast een betere penetratie van 3D

Tabel 4.1: Overzicht van functionele groepen en hun effect [42]

| Functionele groep | Cellen bestudeerd | Type studie |
|---|----------------------------|--|
| CH ₃ ^{a,b} | Endotheel cellen | Adhesie |
| | Menselijke fibroblasten | Adhesie |
| | Mesenchymale stamcellen | Adhesie, proliferatie, mRNA expressie |
| CH ₃ ^{a,c} | Erythrolekemia | Aanhechting |
| | Myoblasten | Proliferatie en differentiatie |
| | Neutrofielen | Adhesie |
| | Mammalian endotheel cellen | Adhesie |
| OH ^{a,d} | Osteoblasten | Adhesie, mineralisatie |
| | Endotheel cellen | Adhesie |
| | Menselijke fibroblasten | Adhesie |
| | Mesenchymale stamcellen | Adhesie, proliferatie, mRNA expressie |
| OH ^{a,e} | Erythrolekemia | Aanhechting |
| | Myoblasten | Proliferatie en differentiatie |
| | Mammalian endotheel cellen | Adhesie |
| CH ₂ CH(CH ₂) ₉ OH | Osteoblasten | Adhesie, mineralisatie |
| | Neutrofielen | Adhesie |
| | Endotheel cellen | Adhesie |
| NH ₂ ^{a,f} | Menselijke fibroblasten | Adhesie |
| | Erythrolekemia | Aanhechting |
| | Mesenchymale stamcellen | Adhesie, proliferatie, mRNA expressie |
| | Myoblasten | Proliferatie en differentiatie |
| | Osteoblasten | Adhesie, mineralisatie |
| | Myoblasten | Proliferatie en differentiatie |
| NH ₂ ^{a,g} | Osteoblasten | Adhesie, mineralisatie |
| | Myoblasten | Proliferatie en differentiatie |
| COOH ^{a,h} | Menselijke fibroblasten | Adhesie |
| | Mesenchymale stamcellen | Adhesie, proliferatie, mRNA expressie |
| | Erythrolekemia | Aanhechting |
| COOH ^{a,i} | Myoblasten | Proliferatie en differentiatie |
| | Mammalian endotheel cellen | Adhesie |
| | Osteoblasten | Adhesie, mineralisatie |
| COOH ^{a,j} | Fibroblasten | Adhesie |
| | Endotheel cellen | Adhesie |
| [COCH ₃ , CO ₂ CH ₃ , CONH ₂ , CO ₂ NH ₂ , CN, PEG ^k , CF ₃ , F, Br, Cl, SH, CHCH ₂] ^a | Menselijke fibroblasten | Adhesie |
| | Mesenchymale stamcellen | Adhesie, proliferatie, mRNA expressie |
| | Mammalian endotheel cellen | Adhesie |
| | Neutrofielen | Adhesie |
| Fosforylcholine | Osteoblasten | Spreiding |
| Amino-zuren Polypeptide | RADS | Menselijke onderhuidse kankercellen |
| | RGDS, RDGS | Rat calvarial osteoblasten |
| | RGD | Osteoblasten en melanocyten ^l , Fibroblasten ^m |
| | RGFG ₁₃ , PHSRN | Rat calvarial osteoblasten |

^aSAM, ^bOctadecyldimethylchlorosilane, ^cHS(CH₂)₁₁-CH₃, ^d10-undecenyldimethylchlorosilane and hydroboration, ^eHS(CH₂)₁₂-OH, ^f3-aminopropyltrimethyl ethoxysilane en 11-bromoundecyldimethylchlorosilane, azidation and reduction, ^gHS(CH₂)₁₂-NH₂, ^h10-undecenyldimethylchlorosilane and oxidation, ⁱHS(CH₂)₁₀-COOH, ^jPEO and polyacrylic acid films, ^kpolyethylene glycol oligomers, ^lpolystyrene-blockpoly[2-vinylpyridine (HAuCl₄)_{0.5}] and RGDfk peptide grafting, ^mpolyacrylic & polyacrylamide with grafting of RGD on NH₂ groups

substraten dan ‘*plasma treatment*’, en de mogelijkheid *in situ* functionalisatie van ‘*microfluidic devices*’ uit te voeren. Nadelen zijn de niet-specificiteit (introductie van een grote range aan functionele groepen), de productie van schadelijke chemische afvalstoffen, onregelmatig etsen van de oppervlakte, aantasting van de mechanische eigenschappen van het oppervlak, en het overwegend niet geschikt zijn voor toepassingen op grote schaal. Conventioneel worden aminolyse (bv. 1,6-hexaandiamine behandeling), zure (bv. chroomzuur) en basische (bv. natriumhydroxide) hydrolyse toegepast. Aldus worden primaire amines, zuurstof-bevattende-, en carboxylgroepen geïntroduceerd. Hydroxylgroepen werden geïntroduceerd door reductie van de methylester zijketens van PMMA door behandeling met lithium aluminium hydride in ether. Oxidatie van oppervlakken kan de chemische, fysische, mechanische en biologische eigenschappen (nadelig) veranderen. [18]

‘Silane monolayers’. De immobilisatie van organosilanen op oppervlakken werd initieel ontwikkeld als een methode om een organisch polymeer te koppelen aan een inorganisch substraat (bv. ‘*glass-reinforced polymers*’ of ‘*fiberglass*’). Silanen hebben de mogelijkheid tot ‘self-assembly’ en worden ‘*self-assembled monolayers*’ (SAM) genoemd. ‘Self-assembly’ is de organisatie van een structuur of patroon zonder externe directie. Zo werden ‘monolayers’ gevormd op glas of silicone (via een siloxy binding), en goud, koper, of zilver (via thiol binding). Het grote voordeel van SAMs is de quasi kristalliniteit, waardoor meer gedefinieerde functionalisatie mogelijk is dan via ‘wet chemical’ of ioniserende technieken. De mogelijke hydrolyse van de siloxaanbinding bij hoge temperaturen of basische pH is dan weer nadelig. Hoewel de focus voornamelijk ligt op de modificatie van inorganische substraten, is dit zeker en vast een mogelijkheid voor polymeermodificatie. [18]

UV belichting. Polymeren die worden blootgesteld aan UV genereren reactieve sites dewelke functionele groepen kunnen vormen bij blootstelling aan een gas. Het kan ook gebruikt worden als initiatie voor UV geïnduceerde graft polymerisatie. De initiatie van een radicalaire graft polymerisatie van bioactieve componenten is eveneens mogelijk via UV belichting. De techniek verschilt met ioniserende gasbehandelingen in de mogelijkheid om de diepte van de reactiviteit aan te passen door alteratie van de golflengte. Nadelig is het mogelijke effect op de optische eigenschappen, en het blokkeren van UV licht door partikels. Een voorbeeld is de introductie van carboxylgroepen op PMMA. [18]

Ioniserende gasbehandelingen. Ioniserende gasbehandelingen is een term die gebruikt wordt voor een grote verzameling aan technieken. Onder meer plasma, ‘*corona discharge*’, en ‘*flame treatment*’ zijn mogelijke ioniserende gasbehandelingen.

‘Corona discharge’ is een eenvoudig, goedkoop, continu proces waar een elektrisch geïnduceerde stroom of geïoniseerde lucht het polymeeroppervlak bombardeert. Hierdoor worden oxidatieproducten gegenereerd. De introductie van een brede waaier aan geoxideerde groepen (niet-specificiteit \Rightarrow minder geschikt voor bioconjugatie), mogelijke contaminatie (geen vacuüm condities), variaties in locale temperatuur, en inhomogeniteiten van het geïoniseerde gas zijn nadelige effecten. [18]

Net zoals ‘corona discharge’ is ‘flame treatment’ een niet-specifieke methode. Hier bekomt men het geïoniseerde gas door verbranding van een zuurstofrijk gas. ‘Flame treatment’ kan hydroxyl, aldehyde, en carboxyl functionaliteiten introduceren. Het bereiken van een consistente behandeling is hier niet eenvoudig en deze strategie is niet geschikt voor de behandeling van de meeste biomaterialen. [18]

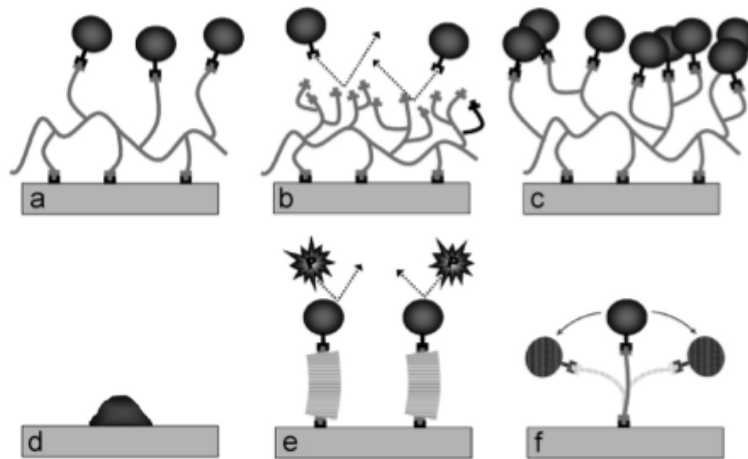
‘Plasma-surface modification’ (PSM). Plasma wordt wel eens de ‘4th state of matter’ genoemd. Plasma is een toestand waarin een gas partieel geïoniseerd is in geladen partikels, elektronen, en neutrale moleculen. Typisch wordt dit bekomen bij de excitatie van een gas tot een energetische toestand door radiofrequente golven (rf), microgolven, of elektronen van een heet filament. De afwezigheid van solventen en chemische afvalproducten, en, de mindere degradatie en verruwing van het materiaal (t.o.v. ‘wet chemical’ technieken) zijn handige voordelen. Verder kan het type functionaliteit gevarieerd worden door variatie van het gebruikte gas (Ar, N₂, O₂, CO₂, NH₃) en parameters als: druk, vermogen, tijd, debiet. NH₃ introduceert amines, O₂ een mengeling van voornamelijk COOH en OH, en door Ar worden typisch vrije radicalen geïntroduceerd. Plasmabehandeling met een inert gas (bv. Ar) kan door de introductie van radicalen voorafgaan aan een graft copolymerisatie (~ ‘*plasma post-irradiation grafting*’): het graften van Ar-plasma behandelt PCL met acrylzuur [51, 52]. Met andere woorden, plasma kan als precursor voor andere modificatietechnieken dienen (bv. plasma - UV - polymerisatie). Aangezien plasma radicalen creëert dichtbij het oppervlak, is *plasmapolymerisatie* gelimiteerd tot het oppervlak. Belangrijk is de inhibitie van dit proces indien zuurstof aanwezig is in de monomeerdamp of -oplossing. [4, 18, 50]

Het is essentieel het onderscheid te maken tussen plasmabehandeling, plasmapolymerisatie², en plasma ‘etching’. Om dit onderscheid te begrijpen is het belangrijk in te zien dat plasma vrije radicalen genereert op zowel het oppervlak als in de dampfase. Het plasma op zich kan op die manier als initiator fungeren indien monomeren aanwezig zijn in de dampfase. Bij een plasmabehandeling wordt gebruik gemaakt van inert gas (i.e. een gas dat niet polymeriseert), met de introductie van vrije radicalen of functionele groepen op het oppervlak als resultaat. Deze vrije radicalen kunnen benut worden voor ‘cross-linking’ of oppervlakte grafting. ‘Post-irradiation grafting’ is een indirecte radicalaire graftmethode waarbij het substraat een plasmabehandeling ondergaat, gevolgd door een blootstelling aan lucht of zuurstof. Deze blootstelling leidt tot peroxide- en hydroperoxide vorming op het oppervlak, die via UV belichting, temperatuur of redox-initiatie kunnen fungeren als initiatoren voor verdere graftpolymerisatie [53]. ‘Plasma syn-grafting’ daarentegen is een plasmapolymerisatie. Bij deze methode bevindt zich doorgaans een monomeer in de dampfase. De monomeren worden door het plasma reactief gemaakt en kunnen in dampfase polymeriseren (‘*plasma state polymerisatie*’). Het plasma introduceert in dit geval evenzeer reactieve bindingsplaatsen op het oppervlak, waarmee de gevormde polymeren uit de dampfase een binding kunnen aangaan (‘plasma syn-grafting’ - directe radicalaire graftmethode). Plasma ‘etching’ is het proces waarbij een oppervlakte wordt gesteriliseerd of waarbij ruwheid wordt gecreëerd [43].

De vele voordelen van een plasmabehandeling maken deze uitermate interessant voor onderzoek: promotie van adhesie; verbeterde bevochtigbaarheid, celspreiding, en biocompatibiliteit; functionalisatie van het oppervlak; verminderde oppervlaktefrictie en ‘*tackiness*’; moleculaire immobilisatie; ‘*anti-fouling*’ coatings, of oppervlaktecoatings als barrière; betrouwbare, reproduceerbare opschaling is relatief gemakkelijk, en; relatief goedkoop. Nadelen van plasma zijn de werking onder vacuüm (dat een continue operatie bemoeilijkt), en de vele parameters die hun effect tonen op de optimale condities (tijd, temperatuur vermogen, gassenstelling, debiet, druk, oriëntatie in de reactor, afstand tot de bron). Hedendaags gebeurt veel onderzoek op atmosferisch niet-thermaal plasma. [4, 18, 50]

²Er bestaat plasma state en plasma geïnduceerde polymerisatie

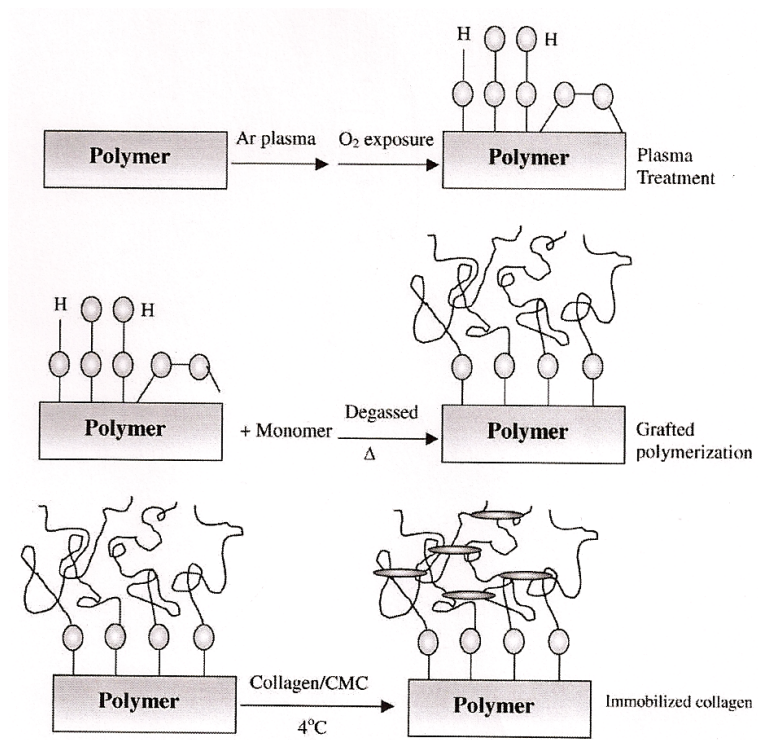
‘Tether molecules in bioconjugation’. Indien de initiële functionalisatie onvoldoende reactieve groepen genereert, of indien de bioactieve component activiteit verliest door directe binding op het hydrofobe polymeerooppervlak, kan het nodig zijn om een intermediair te graften tussen oppervlak en bioactieve component. Een belangrijk voorbeeld is het graften van acrylzuur voor de introductie van carboxylgroepen. Figuur 4.1 geeft de gedachtengang grafisch weer. [49, 18]



Figuur 4.1: Effect van ‘tether molecule’ op de bioactiviteit: (a) verhoogde immobilisatie door vertakte ‘spacer’; (b) verlaagde immobilisatie door overfunctionalisering; (c) verminderde bioactiviteit door overbevolking van bioactieve componenten; (d) oppervlakte geïnduceerde denaturatie; (e) verlaagde niet-specifieke adsorptie van proteïnes door het gebruik van een hydrofiele ‘spacer’; (f) verhoogde beweeglijkheid door de ‘spacer’ [18]

4.2.2 Immobilisatie van bioactieve componenten

De modificatie van een oppervlak met introductie van chemische functionaliteit laat toe fysische eigenschappen te variëren. Daarnaast maakt de functionalisatie van oppervlakken het mogelijk om biologische componenten chemisch te binden aan een oppervlak. In hoofdstuk 2 werd dit reeds aangehaald, nl. immobilisatie van ECM proteïnes of kleine peptide sequenties teneinde een verbeterde celadhesie te bekomen. De geïntroduceerde, specifieke, functionaliteiten op het oppervlak dienen dan compatibel te zijn met de reactieve sites op de covalent te koppelen component. Klassieke functionaliteiten zijn: thiolen, aldehydes, carboxylgroepen, hydroxylgroepen, en primaire amines. Veelal is het gebruik van een ‘cross-linker’ gewenst/noodzakelijk. Een ‘cross-linker’ kan de bioactieve component direct linken aan het substraat, of een ‘spacer’ van enkele angstroms introduceren. Goddard en Hotchkiss [18] verschaften een tabel met ‘cross-linkers’ gecatalogeerd per te ‘cross-linken’ functionaliteiten. Een veel gebruikte strategie is carbodiimide koppeling met EDC als ‘cross-linking agent’ voor carboxylgroepen en primaire amines [18, 54]. Een interessante sequentie van processtappen wordt weergegeven in figuur 4.2.



Figuur 4.2: Immobilisatie van een (ECM) proteïne via (boven) plasmabehandeling; (midden) graft copolymerisatie, en; (onder) immobilisatie van een proteïne [4]

Hoofdstuk 5

Vooropgestelde Strategie en Doelstelling

De ontwikkeling van een geschikt biodegradeerbaar biomateriaal (polymeer), inclusief een geschikte oppervlaktemodificatie, voor de creatie van scaffolds via 3D-Biplotting is de doelstelling die wordt vooropgesteld in deze masterthesis. Met het oog op dit doel, wordt een strategie gehandhaafd die kan onderverdeeld worden in drie grote luiken. Het eerste luik is de synthese van een geschikt biomateriaal voor 3D-Biplotting toepassingen, het tweede de oppervlaktemodificatie, en tot slot het toepassen van de 3D-Biplotter techniek. In wat volgt wordt bondig stap voor stap de strategie uiteengezet. Uiteraard zal elk luik gepaard gaan met een karakterisatie en evaluatie. Technieken die hierbij worden aangewend zijn kleuringen, differentiële scanning calorimetrie (DSC) [8], thermogravimetrische analyse (TGA) [8], gel permeatie chromatografie (GPC) [8, 55], confocale fluorescentie microscopie (CFM) [56, 57], UV-VIS spectroscopie [58], statische contacthoekmetingen (SCA) [18, 49, 58], infrarood spectroscopie (FT-IR) [2, 18], ‘*atomic force microscopy*’ (AFM) [2, 58, 18], ‘*X-ray photoelectric spectroscopy*’ (XPS) [2, 58, 18], ‘*scanning electron microscopy*’ (SEM) [18, 59], proton-nucleaire magnetische resonantie ($^1\text{H-NMR}$) [55], en profilometrie.

5.1 Ontwerp van Biodegradeerbare Elastische Poly(D,L-LA-co- ϵ -CL) Copolymeren

Polyesters van D,L-lactide, glycolide, en ϵ -caprolacton zijn veelvuldig bestudeerd als synthetisch scaffoldmateriaal. Het ‘FDA approved’ label dat deze synthetische polyesters dragen ligt hiervan aan de basis. [60]

5.1.1 Synthese van PCL - PLA - PLA/PCL

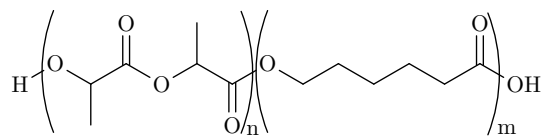
PCL is een polymeer met een lange degradatietijd. Verder is onbehandeld PCL zeer hydrofoob met gelimiteerd potentieel betreffende celadhesie en proliferatie [51]. PLA daarentegen is een hydrofieler polymeer, met bijgevolg een snellere degradatie [19]. De T_g van PCL, respectievelijk PLA, bedraagt -60°C en $+50^\circ\text{C}$ [55]. De T_m van PCL, respectievelijk PLA, bedraagt 62°C en 180°C [61]. Lichte variaties met betrekking tot T_g en T_m kunnen optreden naargelang het moleculaire gewicht.

Met andere woorden, PLA is hydrofieler (gewenst) en heeft een grotere mechanische stijfheid dan PCL. Beiden zijn in vaste fase bij kamertemperatuur. Een visceus polymeer is gewenst voor processing met de 3D-Biplotter, zodanig dat het mogelijk wordt gemaakt om onder

de 37°C te blijven tijdens de verwerking. Dit vermijdt een gedeeltelijke degradatie. PCL heeft een T_g van -60°C wat gunstig is in dit aspect, doch is hydrofoob en semi-kristallijn. De copolymerisatie van beide monomeren is een mogelijke oplossing om structuren te bekomen met de gewenste eigenschappen.

Verscheidene studies demonstreerden de rol van mechanische signalen in tissue engineering [55, 61]. Mechanische stimuli verhogen collageen productie en induceren een meer consistent, contractiel, en gedifferentieerd fenotype van SMCs ('*smooth muscle cells*'). Om verschillende soorten weefsel te kunnen engineeren onder cyclische mechanische condities ('*mechano-active tissue engineering*') is er een noodzaak aan zachte, maar elastische scaffolds [55]. Scaffolds gebaseerd op PLA50/PCL50 degraderen zeer traag ($t_{1/2}$ = 135 dagen, *in vivo*), en vertonen goede resultaten betreffende toxiciteit (gebaseerd op de ISO normen) en compatibiliteit voor beenmergcellen [60]. De degradatiesnelheid *in vivo* overtreft de degradatietijd *in vitro*, en vertoont uitstekende compatibiliteit voor SMCs [55].

Door Jeong *et al.* [55] werd vastgesteld dat p(CL-co-LA) random copolymeren (met een 50/50 samenstelling) wellicht bestaan uit zachte (voornamelijk ϵ -caprolacton) en harde (voornamelijk lactide) domeinen. De grondgedachte is de snellere copolymerisatiesnelheid van LA dan deze van CL. Het bestaan van een soort faseseparatie werd bevestigd door de observatie van twee T_g 's (bij -38°C en -11°C). Er werd geen kristallisatiepiek geobserveerd, wat een indicatie is voor een amorfe structuur, een verwacht resultaat voor een random copolymeer. Het resultaat is een rubberachtige elasticiteit. Deze morfologie heeft ook zijn weerslag op het degradatiegedrag. De zachte regio's degraderen sneller dan de harde domeinen. Een tegenstrijdige vaststelling als wordt gekeken naar het hydrofielere karakter van de domeinen. Dit werd verklaard door een gemakkelijkere penetratie van watermoleculen in de zachte domeinen. De vaststelling betreffende het degradatiegedrag wordt bevestigd door een studie van PCL/PLA blok-copolymeren door Cohn en Salomon [61]. In deze studie werd vastgesteld dat de lengte van de PLA blokken de degradatietijd beïnvloedt (langere PLA blokken leiden tot tragere degradatie). Variatie van de samenstelling aan copolymeren beïnvloedt de mechanische sterkte enerzijds, het degradatiegedrag anderzijds. De degradatiesnelheid van het copolymeer is sneller dan deze van de afzonderlijke homopolymeren.



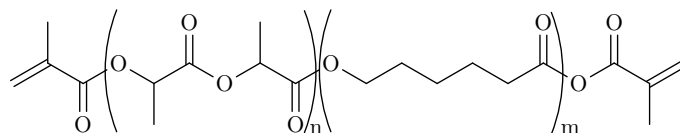
Figuur 5.1: Structuurformule van p(D,L-LA-co- ϵ -CL) random copolymeren

5.1.2 Eindgroepmodificatie van de uitgangspolymeren

Het copolymeer is een zeer visceuze vloeistof bij kamertemperatuur wat gewenst is voor processing met de bioplotter. Doch is het noodzakelijk dat een vaste structuur wordt gevormd tijdens het plotten, zodanig dat enerzijds geen verzakking van de scaffold wordt bekomen, en anderzijds er voldoende mechanische sterkte voor weefselregeneratie is.

Als oplossing wordt gekozen voor een eindgroepmodificatie van het copolymeer met methacrylaat groepen. De eindgroepgemodificeerde copolymeren kunnen dan als prepolymeer dienen, die via belichting met zichtbaar licht (UV met $\lambda = 365$ nm) een vast netwerk vor-

men. Deze fotopolymerisatie kan geïnitieerd worden door een D,L-camphorquinone/ethyl-4-dimethylaminobenzoaat systeem. [60]



Figuur 5.2: Structuurformule van p(D,L-LA-co-ε-CL) bismethacrylaat random copolymeren

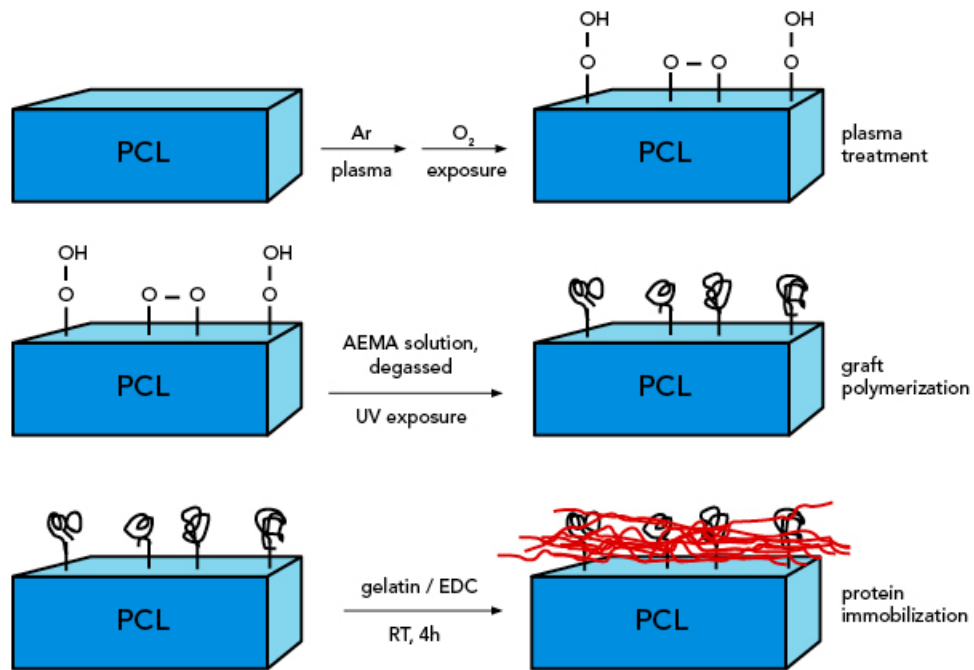
5.2 Selectie van een geschikte Modificatietechniek

De oppervlaktemodificatie zal worden uitgevoerd in twee fasen. In de eerste fase wordt een technologie voor de oppervlaktemodificatie ontwikkeld op PCL-films. Deze fase is een optimalisatie en uitbreiding van het werk gepresenteerd door Desmet *et al.* [62]. In de tweede fase wordt getracht de resultaten en verworven kennis uit de eerste fase toe te passen op 3D structuren van polyesters. De modificatie van de (co)polymeren is nodig omwille van de hydrofobiciteit en de afwezigheid van bioactieve domeinen [58, 63]. Door Zhu *et al.* [63] werd fibronectine en collageen geïmmobiliseerd op gelijkaardige random copolymeren om de interactie van epitheelcellen te onderzoeken. De methode die zij hanteerden was aminolyse gevolgd door proteïnebinding. In deze masterthesis zal gebruik worden gemaakt van plasma voor de introductie van radicalen, gevolgd door een graft polymerisatie van AEMA en covalente immobilisatie van gelatine (zie Hoofdstuk 7: *Post-plasma Grafting van AEMA op PCL en aansluitende Immobilisatie van Biomolecules*). Met uitzondering van de plasmatechniek is deze methode gelijklopend met de methode van Zhu *et al.* [58] waar PCL gemodificeerd werd door graft polymerisatie van een methacrylaat onder UV, gevolgd door immobilisatie met gelatine. Grafting van collageen op PCL-films creëert een biomimetische structuur, die o.a. geschikt blijkt te zijn voor vasculaire tissue engineering [51].

De strategie uit de eerste fase wordt schematisch voorgesteld in figuur 5.1. Hierbij zullen optimale procesparameters worden gezocht (plasmatijd, UV temperatuur, concentratie graft-oplossing, UV tijd).

5.3 Toepassing van de 3D-Biplotter Techniek

Finaal is het de bedoeling het eindgroepgemodificeerde copolymeer te plotten, te vernetten tijdens het plotten, en het ontwikkelde oppervlaktemodificatieproces van de PCL-films over te zetten op de geplotte 3D scaffolds. Daarbij zal onder andere aandacht moeten worden besteed aan het gebruik van een plotting medium om een gravitateitscompensatie te bekomen.



Figuur 5.3: Processchema voor de oppervlaktemodificatie via (boven) plasmabehandeling; (midden) UV graft polymerisatie met een methacrylaat, en; (onder) immobilisatie van gelatine

Deel II

MATERIALEN EN METHODEN

Hoofdstuk 6

Synthese van Poly(_{D,L}-LA-co- ϵ -CL) en Poly(_{D,L}-LA-co- ϵ -CL) BMA

In dit hoofdstuk worden de theoretische benaderingen, gebruikte materialen, en toegepaste methoden/technieken uiteengezet met betrekking tot de synthese van random copolymeren van LA en CL.

6.1 Ontwerp van Biodegradeerbare Elastische Poly(_{D,L}-LA-co- ϵ -CL) Copolymeren

De ringopeningpolymerisatie (ROP) van D,L-lactide (Polysciences, LA) en ϵ -caprolacton (Alfa Aesar, CL) werd in bulk uitgevoerd op een 20-30 g schaal. CL werd gedroogd over calciumhydride (CaH_2) en gedistilleerd onder verlaagde druk. LA werd enkele dagen gedroogd over P_2O_5 onder vacuüm bij kamertemperatuur. Equivalente hoeveelheden LA ($M_w = 144,12$ g/mol) en CL ($M_w = 114,14$ g/mol) werden samengevoegd met 1,6-hexaandiol (HXD, $M_w = 118,17$ g/mol; 20:1 molaire verhouding monomeren:alcoholen) en zinkacetaat (Aldrich, $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, $M_w = 183,48$ g/mol; 1 mol % per totale hoeveelheid hydroxylgroepen van het HXD) in 'home-made' polymerisatie tubes. HXD en $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ werden eveneens gedroogd over P_2O_5 onder vacuüm gedurende enkele dagen bij kamertemperatuur. De polymerisatie tubes werden overnacht gereinigd in geconcentreerde H_2SO_4 en de daaropvolgende nacht gesilaniseerd in een 10 % w/w oplossing van dichloromethylsilaan (Aldrich, $\text{CH}_3\text{Cl}_2\text{Si}$) in toluen. CL werd als laatste component toegevoegd. [55, 60, 63]

Aangezien geweten is dat vocht en/of andere hydroxyl-bevattende onzuiverheden (cfr. onzuiverheden van de monomeren) een invloed kunnen hebben op het moleculaire gewicht van het uiteindelijke product (mogelijks als co-initiator of hydrolyse/alcohololyse agentia) [64], werd erop toegezien dat de gebruikte reagenten zuiver waren, en het gebruikte glaswerk droog bij aanvang van de polymerisatie. Alle producten werden op zuiverheid gecontroleerd met $^1\text{H-NMR}$.

De polymerisatie tube werd bevroren in vloeibare stikstof, ontgast aan een vacuümpomp, en ontdooid bij kamertemperatuur. Deze cyclus werd 3 x herhaald. Daarna werd de tube in een 'shaking bed' geplaatst bij 140°C . Na 48 uren werd de polymerisatie beëindigd door afkoelen in een koelkast. [60]

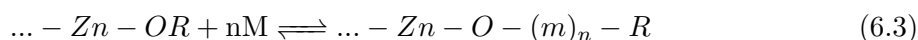
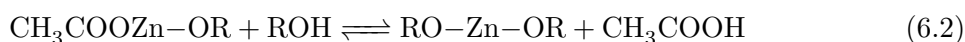
6.1.1 Reactiemechanisme

PLA en PCL kunnen geproduceerd worden door een polycondensatie, of door een ROP. De ROP is gemakkelijker te controleren en polymeren met een hoger moleculair gewicht kunnen worden geproduceerd¹. [66]

Twee grote algemene polymerisatie mechanismen bestaan voor de ROP, afhankelijk van de gebruikte organometalen: (i) Sommige organometalen fungeren als katalysatoren, en activeren het monomeer door complexatie met de carbonyl groep. De polymerisatie wordt in dit geval geïnitieerd door een nucleofiel (cfr. water of alcohol, aanwezig in het polymerisatie medium/als onzuiverheden/als toegevoegde component). (ii) In het tweede mechanisme vertolkt het organometaal de rol van initiator en de polymerisatie verloopt via een *insertie-coördinatie* mechanisme. Typische voorbeelden zijn metaal alkoxiden, die eerst de carbonyl van het monomeer coördineren, gevolgd door een splitsing van de ester-zuurstof binding van het monomeer en de simultane insertie tot een metaal alkoxide binding. [65]

Eén van de meest gebruikte organometaal verbindingen voor de ROP van cyclische polyesters via het *insertie-coördinatie* mechanisme is tin(II) bis-(2-ethylhexanoaat) (tin octoaat, Sn(Oct)₂) [64, 65, 67, 68, 69, 70, 71]. Kowalski *et al.* [67] leverden kinetisch bewijs dat het reactiemechanisme van Zn(OAc)₂ analoog is als dit van Sn(Oct)₂. In dit mechanisme wordt de polymerisatie (van LA en CL) geïnitieerd, enkel nadat de organometaal verbinding *in situ* geconverteerd is naar hun alkoxide derivaat. De resultaten van Kowalski *et al.*, nl. dat Zn(OAc)₂ noch zuivere katalysator noch zuivere initiator is, werden bevestigd in een studie van Rokicki *et al.* [71].

In de ROP met Zn(OAc)₂ en 1,6-hexaandiol wordt de echte initiator gevormd door conversie van Zn(OAc)₂ naar zink alkoxide door reactie met een alcohol. Reacties (6.1) en (6.2) geven dit weer. De reacties zijn reversibel, maar shiften geleidelijk naar rechts wanneer de alkoxide producten worden geconsumeerd in reactie (6.2) en in de polymerisatie reactie (6.3). Reactie (6.3) is een evenwichtsreactie, aflopend naar rechts. Eens gevormd, is het uiteindelijke Zn(OR)₂ de *echte initiator* in de ROP van het cyclische ester monomeer. [64, 65, 67]



R is een H-atoom of een alkyl groep, M staat voor een LA of CL monomeer, m staat voor de polyester herhaaleenheid, en n voor de polymerisatiegraad.

De opzettelijke toevoeging van een gekende hoeveelheid alcohol in het polymerisatie medium is een effectieve manier om het moleculaire gewicht te controleren aan de hand van de monomeer-alcohol molaire verhouding [64, 65]. De alcohol co-initiator vervult een duale rol [64, 67]. Primair reageert het alcohol met het organometaal ter vorming van de echte initiator. Indien echter het alcohol in een stoichiometrische overmaat, nodig voor reactie met het organometaal, wordt toegevoegd, kan de overmaat aan alcohol reageren als een ‘*chain transfer agent*’. Deze tweede rol wordt voorgesteld in reactie (6.4) en heeft een terminatie van de groeiende keten als gevolg door het afsplitsen van het -O-Zn-OR keteneinde. Zelfs indien het vrijgekomen zink

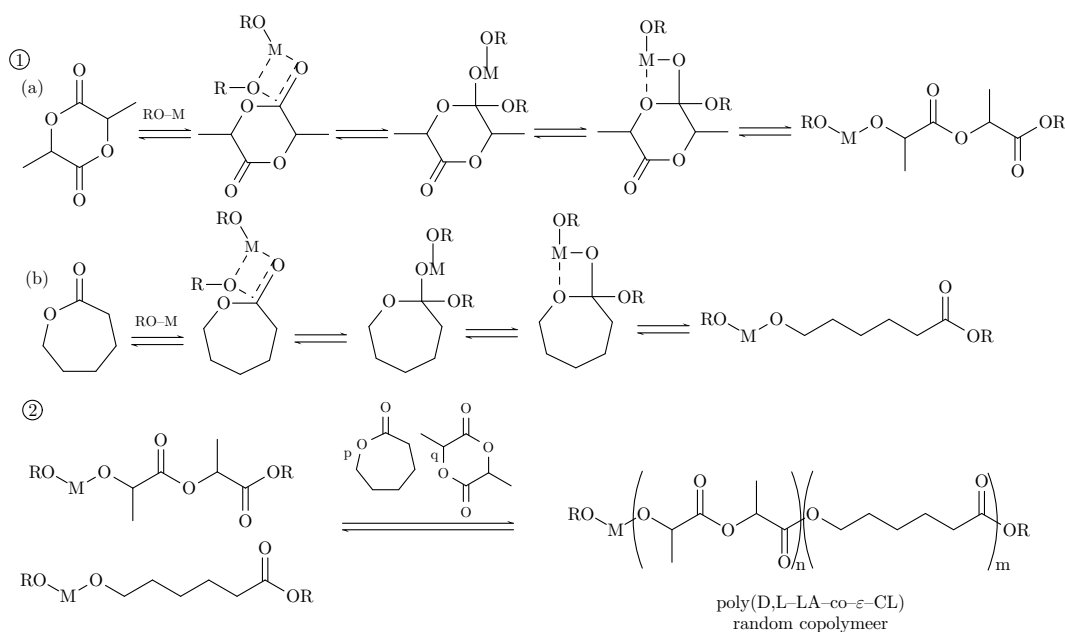
¹De ROP van lactonen en lactides is een levend/gecontroleerd proces dat leidt tot polyesters met een nauwe moleculaire gewichtsverdeling, afhankelijk van de monomeer-tot-initiator verhouding [65]

alkoxide een nieuwe keten kan initiëren, verhoogt de keten transfer reactie het aantal ketens, resulterend in een lager gemiddeld moleculair gewicht. Additioneel kan de overmaat aan alcohol fungeren als een transesterificatie agent via alcoholyse van de esterbinding langsheen de keten. Dit leidt eveneens tot een daling van het gemiddeld moleculair gewicht.

De hoeveelheid $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ heeft zijn weerslag op de polymerisatiesnelheid, aangezien het de bron is van de actieve Zn-O bindingen. Een tweede rol is zijn rol als transesterificatie katalysator. Deze tweede rol heeft zijn weerslag op de randomisatie van de copolymeren (hoe meer $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, hoe meer randomisatie). [64]



De ringopening wordt voorgesteld in figuur 6.1 voor D,L-lactide (1a) en ϵ -caprolacton (1b). In het tweede deel van de figuur wordt de propagatie ter vorming van poly((D,L-lactide-co- ϵ -caprolacton) copolymeren voorgesteld.



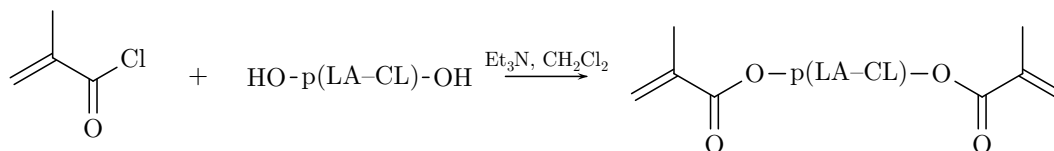
Figuur 6.1: ROP tot poly(D,L-LA-co- ϵ -CL) copolymeren: (1) ringopeningstap van respectievelijk D,L-lactide en ϵ -caprolacton met het alkoxide (a,b); (2) propagatiestap tot vorming van de random copolymeren. M stelt een metaal voor. [64, 65, 67, 68]

De aanwezigheid van een diol of water onderdrukt de vorming van macrocycles en polymeren getermineerd met hydroxyl groepen kunnen worden bekomen [71]. De meeste ketens van de gevormde copolymer populatie zijn hydroxyl getermineerd en van de vorm $\text{HO}-(\text{m})_n-\text{OH}$ (m staat voor een LA of CL monomeer, n voor het aantal eenheden). Naast deze gewenste macromoleculen zijn er andere veel kleinere populaties met verschillende eindgroepen, zoals $\text{HO}-(\text{m})_n-\text{COOH}$, $\text{HO}-(\text{m})_n-\text{OOCCH}_3$ en $\text{HOOC}-(\text{m})_n-\text{OOCCH}_3$ [68].

De hydroxyl eindgroepen kunnen verder getransformeerd worden naar andere eindgroepen, cfr. stabielere eindgroepen, of vernetbare eindgroepen. De volgende paragraaf behandelt de transformatie van hydroxyl naar vernetbare methacrylaat eindgroepen.

6.2 Eindgroepmodificatie met Methacrylaten

Het poly(D,L-lactide-co-ε-caprolacton) diol werd gemodificeerd met vorming van methacrylaat eindgroepen volgens figuur 6.2. De reactie is een additie/eliminatie aan een zuurhalogenide.



Figuur 6.2: Eindgroepmodificatie van poly(D,L-LA-co-ε-CL) copolymeren met methacrylaat functies

Een toevoegtrechter werd gemonteerd op een 3-nek kolf. Het geheel werd achtereenvolgens vacuüm gezogen, droog gevlamd met een bunzenbrander, en gevuld met stikstofgas. Na afkoelen werd de kolf geïncubeerd in een ijsbad. In de 3-nek kolf werd een gekende hoeveelheid copolymeer (20-30 g) overgebracht, samen met triethylamine (Et_3N ; 1.5 molaire overmaat ten opzichte van de hoeveelheid $\text{C}_4\text{H}_5\text{ClO}$) en droge CH_2Cl_2 (2:1 volume ratio). De toevoegtrechter werd gevuld met een overmaat aan methacryloyl chloride (Fluka, $\text{C}_4\text{H}_5\text{ClO}$; tweevoudige overmaat ten opzichte van het totale aantal hydroxyl groepen van het oligomeer) en 5 ml droge dichloormethaan (CH_2Cl_2 ; gedroogd over CaH_2). Het $\text{C}_4\text{H}_5\text{ClO}$ werd druppelgewijze toegevoegd aan de kolf en de reactie werd overnacht uitgevoerd. Na reactie werd het neergeslagen triethylamine hydrochloride verwijderd via filtratie over een glasfilter. De overgebleven oplossing werd ingedampt (rotavapor) en gedurende 1 uur gekoeld in een koelkast. Opnieuw werd het witte neerslag gefiltreerd. De resterende oplossing werd 2 dagen gedialyseerd (Spectra/Por[®] Membrane - MWCO: 1000 -, Spectrum Laboratories) in droge aceton. De aceton werd 3x ververs. Finaal werd de gedialyseerde oplossing ingedampt aan een rotavapor en vervolgens vacuüm getrokken (\pm 2-3 uren) aan een oliepomp. Het product werd afgeschermd van het licht bewaard in een koelkast bij 4°C . [60]

6.3 Karakterisatie van de Polymeren

6.3.1 Proton - nucleaire magnetische resonantie

De zuiverheden van producten en karakterisatie van de gesynthetiseerde copolymeren werd uitgevoerd op een Bruker WH 300 MHz ^1H -NMR. De chemische shift werd uitgedrukt in ppm met tetramethylsilaan (TMS) als interne standaard. Metingen werden uitgevoerd in gedeutereerd water (Aldrich, D_2O) of chloroform (Aldrich, CDCl_3). Uit de ^1H -NMR spectra werd de copolymeer samenstelling bepaald, alsook het percentage eindgroepmodificatie en de theoretische T_g (Fox vergelijking).

^1H -NMR is de toepassing van nucleaire magnetische resonantie in NMR spectroscopie op ^1H -kernen in molecules, voor de bepaling van structuren. Eenvoudige NMR spectra worden opgenomen in een solvent. Er dient op te worden gelet dat solvent protonen niet interfereren (gebruik van gedeutereerde solventen). Voor de calibratie van de chemische shifts wordt een kleine hoeveelheid TMS gebruikt. TMS is een molecule waarvan alle protonen chemisch equivalent zijn, resulterend in een enkel signaal (per conventie $\delta = 0$ ppm). De exacte chemische

shift van een proton hangt af van de moleculaire structuur en van het gebruikte solvent in dewelke het spectrum is opgenomen. Waterstofkernen zijn gevoelig voor de hybridisatie van het atoom waaraan het proton is gekoppeld en aan elektronische effecten. De kernen worden ontdaan van hun afscherming door elektronegatieve groepen. Voorbeelden van dergelijke groepen zijn -OH, -OCOR, -OR, -NO₂ en halogenen. Meer ontschermde kernen resoneren aan hogere δ -waarden. Hoe groter de ontscherming van de kern, hoe groter de chemische shift. Het resultaat is een spectrum van chemische shifts uitgedrukt in ppm.

6.3.2 Gel permeatie chromatografie

De bepaling van het moleculaire gewicht van de copolymeren werd uitgevoerd via *gel permeatie chromatografie* (GPC). De GPC maakt gebruik van Styragel HR3, HR4 en HR5 kolommen (5 μ m partikels) met chloroform als mobiele fase. Een oplossing van ± 10 mg/ml copolymeer werd gemaakt in chloroform en 20 μ l werd geïnjecteerd op de kolom (Gilson 234 'Autosampler'). De stalen liepen 25 min met een 'flow' van 1,5 ml/min (Waters 1515 'Isocratic pump'). Calibratie gebeurde met 12 polystyreen (PS) standaarden (van 250 g/mol tot 1930000 g/mol). De temperatuur van de kolom bedroeg 35°C. Detectie gebeurde met een Waters 2410 'Refractive Index detector' en een Waters 2487 UV detector en analyse werd uitgevoerd met Breeze software.

GPC scheidt een mengsel op basis van de grootte van de analyten. De scheiding gebeurt aan de hand van poreuze korrels, gepakt in een kolom (stationaire fase). De kleinere analyten kunnen makkelijker binnendringen in de poriën, spenderen bijgevolg meer tijd in de poriën, en, verhogen bijgevolg hun retentietijd. Als een analyt te klein of te groot is zal het ofwel volledig of niet worden vertraagd. Een kolom heeft met andere woorden een gelimiteerde range aan moleculaire gewichten dat ze kan scheiden.

6.3.3 Thermogravimetrische analyse

Thermogravimetrische analyses (TGA) werden uitgevoerd op een Hi-Res TGA 2950 'Thermogravimetric Analyser' (TA Instruments). Een kleine hoeveelheid copolymeer, eindgroep gemodificeerd copolymeer, en vernet copolymeer werden in een platinum houdertje opgewarmd van kamertemperatuur tot 600°C aan een snelheid van 10°C/min. Tijdens de metingen werd de oven continu doorstroomd met stikstofgas. Het systeem werd bestuurd door Instrument Waters LLC software (Thermal Advantage versie 13.0.205). Uit de metingen werden solventgehalten en degradatietemperaturen van de samples bepaald.

Een TGA apparaat bestaat uit een hoge-precisie balans met een pan (meestal uit platinum) waarin het staal zich bevindt. De pan wordt geplaatst in een elektrisch verwarmde oven met een thermokoppel om een accurate uitlezing van de temperatuur mogelijk te maken. De oven kan doorstroomd worden met een inert gas indien men oxidatie en ongewenste reacties wenst te vermijden. De temperatuur in de oven wordt gradueel verhoogd en het 'sample' gewicht wordt geplot ten opzichte van de temperatuur. Bij Hi-Res TGA vertraagt de temperatuursstijging indien gewichtsverlies wordt gedetecteerd. Dit heeft als gevolg dat de accuraatheid van de meting zal worden verhoogd.

6.3.4 Differentiële scanning calorimetrie

Differentiële scanning calorimetrie (DSC) werd uitgevoerd op 5-10 mg copolymeer, eindgroep gemodificeerd copolymeer, en vernet copolymeer. Het systeem werd bestuurd door hetzelfde software programma als van het TGA apparaat. De stalen werden een eerste cyclus opgewarmd tot 80°C, afgekoeld tot -90°C, en een tweede maal opgewarmd tot 80°C. De opwarmen en afkoelsnelheid bedroeg 10°C/min. De eerste opwarmcyclus wist de thermische voorgeschiedenis van het 'sample'. Uit de tweede opwarmcyclus werden T_g 's bepaald en vergeleken met de theoretische verwachte waarden (Fox vergelijking).

DSC is een thermo-analytische techniek waarbij het verschil in de hoeveelheid warmte nodig om de temperatuur van een monster en een referentie te doen toenemen wordt gemeten als een functie van de temperatuur. Tijdens een experiment worden zowel monster als referentie op nagenoeg dezelfde temperatuur gehouden. De referentie dient een goed gedefinieerde warmtecapaciteit te bezitten over de range van temperaturen die tijdens een meting worden doorlopen. Via de techniek worden uit de *'heat flow'* in functie van de temperatuur voornamelijk fase transitie bestudeerd.

Hoofdstuk 7

Post-plasma Grafting van AEMA op PCL en aansluitende Immobilisatie van Biomolecules

Een stapsgewijze gedetailleerde uiteenzetting met betrekking tot de onderzochte modificatie techniek wordt in dit hoofdstuk weergegeven. Aandacht wordt ook besteed aan de gebruikte technieken voor het screenen van de oppervlakken, met inbegrip van de theoretische beschouwingen.

7.1 Vervaardigen van dunne PCL Films

PCL pellets (Sigma Aldrich, $M_n = 80000$ g/mol) werden opgelost in tetrahydrofuran (THF) tot 4 % w/w. Ronde dekglasjes ($\emptyset = 25$ mm) werden grondig gedesinfecteerd (desinfectol) en gespinoat met de PCL oplossing. Hiertoe werd 200 μ l oplossing gedurende 60 sec aan ± 3000 tpm bij kamertemperatuur gespinoat op de ronde dekglasjes in een ‘home-made’ spincoater [72, 73].

De PCL films werden overgebracht in 6-well platen en overnacht gedroogd in een vacuümoven bij 40°C. De 6-well platen werden vervolgens bewaard in een excicator tot gebruik. Een analoge procedure werd gebruikt voor het spincoaten van dekglasjes met 200 μ l van een 5 % w/w gelatine B (Rousselot, Gent) oplossing (in gedeïoniseerd water), het spincoaten van ronde dekglasjes ($\emptyset = 14$ mm) met 70 μ l van een 4 % w/w PCL oplossing (in THF), en het spincoaten van rechthoekige gouden SPR chips (SIA Au Kit, Biacore) met 50 μ l van een 0,33 % w/w PCL oplossing (in THF).

7.2 Voorafgaande Ar-plasmabehandeling van de PCL Films

De eerste stap in het graftproces van PCL films met 2-aminoethyl methacrylaat (AEMA) is de introductie van reactieve groepen op de PCL oppervlakken. (Hydro)Peroxides op de PCL oppervlakken werden geïntroduceerd door een Ar-plasmabehandeling¹ in een cilindrische diëlektrische ontladings plasmareactor (Model Femto, versie 3, Diener Electronic, Duitsland) voor 30 sec, gevolgd door een reactie met O₂ (via een atmosferische blootstelling) gedurende

¹Argon is een edelgas en is chemisch inert. Ar-plasma veroorzaakt geen chemische reacties met het substraat, maar vormt radicalen op organische polymeren

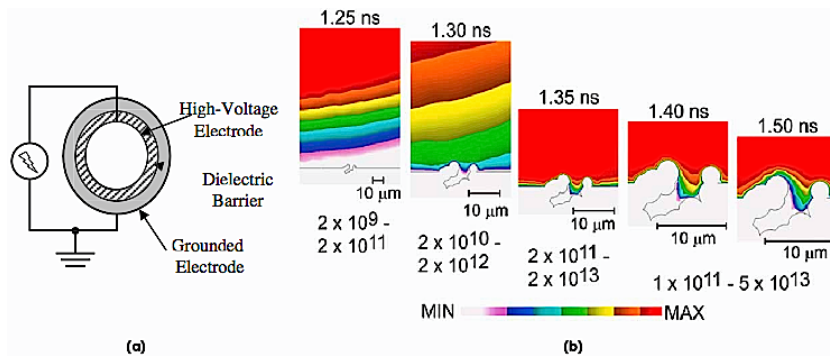
10 min. De vrije radicalen aan het oppervlak, geïntroduceerd tijdens de plasmabehandeling, reageren, tijdens de atmosferische blootstelling, met zuurstof en vormen (hydro)peroxiden. De Argon druk in de plasmakamer werd afgeregeld op 0,8 mbar, met een opgelegd vermogen van 100 W (40 kHz). Via deze methodiek werden (hydro)peroxide functionaliteiten geïntroduceerd die naderhand kunnen fungeren als initiatoren voor de UV-geïnduceerde graft polymerisatie. [51, 52, 74]

Figuur 7.1 geeft de gebruikte procedure weer.



Figuur 7.1: Illustratie van de voorafgaande Ar-plasmabehandeling

In figuur 7.2 (a) wordt schematisch het principe van een cilindrische ‘dielectric barrier discharge (DBD) reactor’ weergegeven [75]. Figuur 7.2 (b) toont een model van de interactie plasma-polymeer in een DBD [76].



Figuur 7.2: (a) Schematische illustratie van een cilindrische DBD [75]; (b) Elektronen progressie tijdens een enkele puls in een atmosferische druk DBD (log schaal, cm⁻³): de *elektronen lawine* wordt geïnitieerd aan de tip van de kathode en progresseert naar het polymeeroppervlak. Plasma penetreert het oppervlak tot een gelimiteerde diepte [76]

7.2.1 Ontladingsmechanisme van een DBD

DBDs (~ ‘barrier discharges’, ‘silent discharges’) vallen onder de categorie ‘cold plasmas’ (‘non-equilibrium plasma’; ‘non-thermal plasma’)². ‘Cold plasmas’ zijn samengesteld uit deeltjes (geladen en neutrale moleculen en atomen) met een lage temperatuur, en elektronen op relatief hoge temperatuur. Ze worden geassocieerd met lage ionisatiegraden (10⁻⁴ - 10 %). [77]

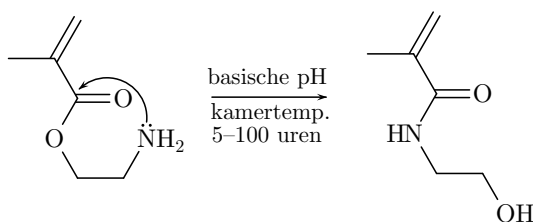
²Daarnaast bestaan ook nog ‘hot plasmas’, gekarakteriseerd door heel hoge temperaturen van de elektronen en zware deeltjes, zowel geladen als neutraal, dewelke heel dicht bij maximale ionisatiegraden zijn [77]

Er bestaan 3 types DBDs: ‘*volume discharges*’ (VD), ‘*surface discharges*’ en ‘*coplanaire discharges*’. Het gebruikte type is in ons geval een cilindrische VD. Een karakteristiek facet van een DBD is dat ten minste één van de elektrodes omgeven wordt door een diëlektrische laag. Typische materialen voor de diëlektrische barriers zijn glas, kwarts en keramiek (plastic folies, teflon platen en andere isolerende materialen kunnen eveneens worden gebruikt). De afstand tussen de elektroden (incl. de diëlektrische laag) varieert van 100 μm tot enkele cm. Na ionisatie op een zekere locatie in de ontladingsruimte verzamelt de getransporteerde lading zich aan de diëlektrische oppervlakte. Deze geaccumuleerde lading genereert een elektrisch veld dat het veld in de ‘*gap*’ verlaagt. Op deze manier wordt de ‘*current flow*’ na enkele nanoseconden³ onderbroken. DBD ontladingen worden geïnitieerd wanneer de lokale elektrische veldsterkte in de gasruimte de ‘*breakdown*’ sterkte bereikt (\sim opleggen van een AC spanning met voldoende amplitude). De ‘*breakdown*’ start op vele plaatsen, gevolgd door de ontwikkeling van filamenten, genaamd micro-ontladingen. Een essentieel onderdeel van de ontlading is de diëlektrische laag: (i) ze controleert de hoeveelheid lading en energie van de micro-ontladingen, en; (ii) verdeelt de micro-ontladingen over de gehele oppervlakte van de elektrode. [75, 77, 78]

Recent werd PCL behandeld met DBD plasma waarna osteoblasten, afkomstig van muizen, werden gecultiveerd op deze oppervlaktes. Een verhoogde initiële celadhesie en proliferatie werd vastgesteld. [79]

7.3 Plasma-post Irradiation grafting van AEMA vanaf de PCL Filmoppervlakken

De plasma geactiveerde PCL films werden na 10 min atmosferische blootstelling ondergedompeld in een waterige 2-aminoethyl methacrylaat (Polysciences, AEMA) oplossing. Oplossingen van 1M, 0.5M en 0.1M werden bereid om de invloed van de monomeer concentratie op het graftproces na te gaan. De oplossingen werden altijd vers bereid (aangezien bekend is dat amidatie van de esterbinding kan voorkomen in de monomeer oplossing [80]; figuur 7.3), bij gebruik van gedeïoniseerd en ontgast water. Het ontgassen geschiedde onder vacuüm gedurende 1 uur vóór het bereiden van de AEMA oplossing.

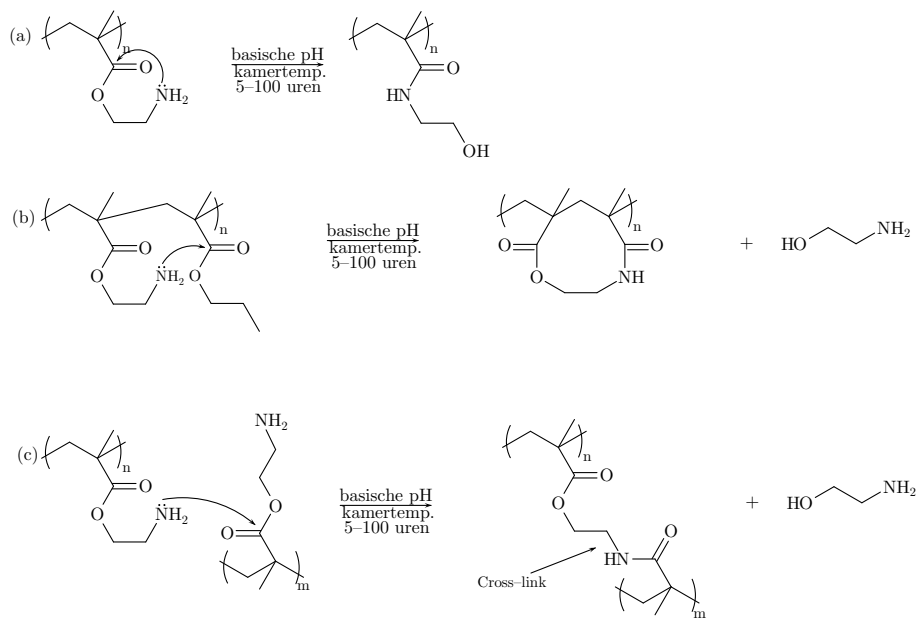


Figuur 7.3: Intramoleculaire amidatie van 2-aminoethyl methacrylaat

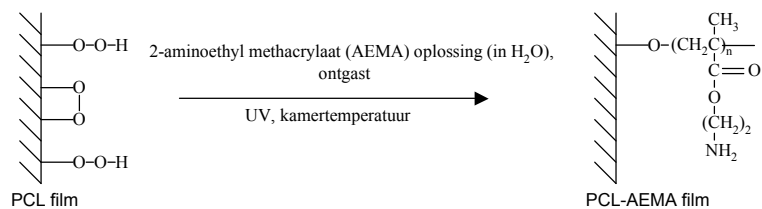
Reeksen van 6 films werden overgebracht in een ‘custom-made’ (glasblazerij) 6-well plaat met een dekplaat van kwarts. Het geheel van films en AEMA oplossing werd vervolgens in de afgedekte 6-well plaat gepositioneerd onder een ‘home-made’ UV apparaat (centrale werkplaats), uitgerust met 4 UV lampen (Sylvania, F14W/350), voor tijden variërend tussen

³De exacte duur hangt af van de druk, gassamenstelling en diëlektrische eigenschappen

5 min en 60 min. De afstand van de 6-well plaat tot de lampen was steeds 10 cm, wat overeenkomt met een opgemeten intensiteit van 5 mW/cm². De temperatuur van de oplossing waarin de films waren ingebed, bleef beneden de 30°C. Om de invloed van de temperatuur na te gaan werd in één serie experimenten een analoge procedure uitgevoerd, maar waarbij de temperatuur in de 6-well platen (tijdens het graftproces) op 37±2°C werd gehouden. Na de graft polymerisatie gedurende de vooropgestelde tijd werden de films overgebracht in normale 6-well platen, 3x gespoeld met gedeïoniseerd water, en overnacht geplaatst in gedeïoniseerd water. De volgende morgen werden de films gedroogd in een vacuümoven bij 40°C en bewaard in een excicator tot verder gebruik (het is gekend dat ook amidatie van de esterbinding van het polymeer kan plaatsgrijpen [80]; figuur 7.4; alsook, en dit is in basische omstandigheden meer waarschijnlijk, hydrolyse van de esterbinding). Figuur 7.5 illustreert de gebruikte graftprocedure.



Figuur 7.4: Amidatie van poly-(2-aminoethyl methacrylaat): (a,b) intramoleculaire amidatie en (c) intermoleculaire amidatie

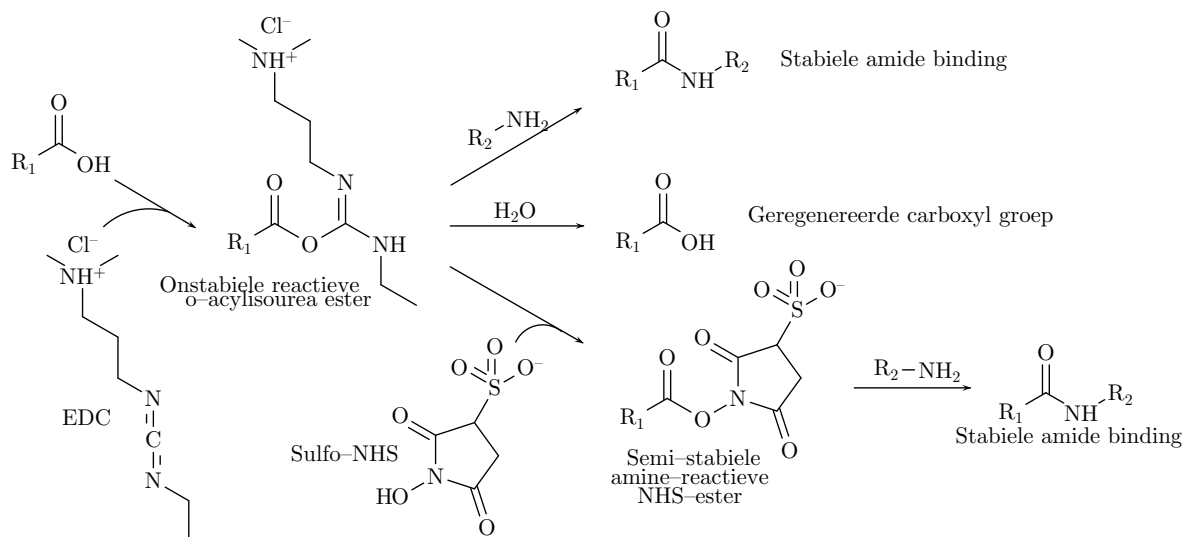


Figuur 7.5: Illustratie van de graft polymerisatie van AEMA op PCL films

Yu *et al.* [81] beschreven de UV geïnduceerde graft polymerisatie van AEMA op polypropyleen membranen.

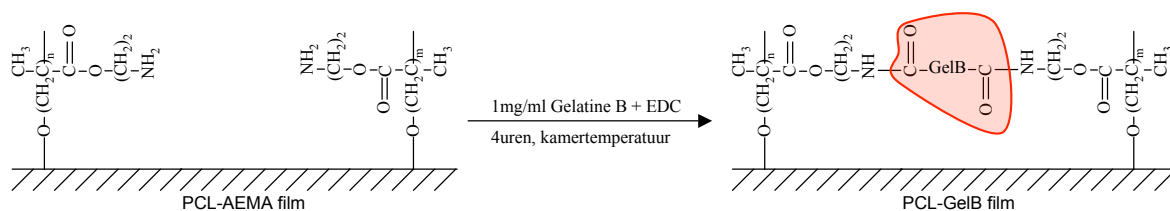
7.4 Covalente Immobilisatie van Gelatine B op de PCL Films

Door Rousselot (Gent) werd gelatine type B, geïsoleerd uit runderhuid via een basisch proces, toegeleverd. Het isoëlektrisch punt van de gebruikte gelatine B was bij benadering 5. Een GelB oplossing van 1 mg/ml in gedistilleerd water werd aangemaakt voor de covalente immobilisatie van GelB op PCL-AEMA films. Voor elke serie immobilisaties werd een verse oplossing bereid. De 6-well platen met de PCL-AEMA films werden uit de excicator gehaald en in elke well werd 2 ml GelB oplossing aangebracht. Nadat het proteïne ruim een uur de tijd kreeg om fysisch aan de PCL-AEMA film te adsorberen werd 100 μl van een 1 mg/ml wateroplosbaar carbodiimide (WSC), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (Aldrich, EDC), toegevoegd. Het EDC genereert een willekeurige ‘cross-linking’ tussen de vrije amines op het oppervlak en de carboxyl groepen van het geadsorbeerde proteïne (figuur 7.6) [18, 54]. Sulfo-NHS (Sulfo-N-hydroxysuccinimide) wordt veelvuldig gebruikt ter stabilisatie van het amine reactieve intermediair (verhogen van de efficiëntie), doch in ons geval wordt de gelatine eerst fysisch geadsorbeerd op het oppervlak en dan pas gecross-linked met EDC. De EDC oplossing werd aangemaakt en onmiddellijk toegevoegd.



Figuur 7.6: EDC als ‘cross-linker’ tussen carboxyl- en amine groepen. EDC komt vrij als een wateroplosbaar urea derivaat. Bij aanwezigheid van water wordt de carboxyl groep geregenereerd.

M.a.w. EDC staat in voor de covalente immobilisatie van gelB op de PCL-AEMA films. ‘Cross-linking’ tussen de vrije amines en carboxyl groepen van het proteïne zelf treedt eveneens op. De reactie met EDC ging door op kamertemperatuur voor een tijdsbestek van 4 uren, waarna de films werden gespoeld met gedeïoniseerd water. Ten einde het niet covalent gebonden proteïne te verwijderen werden de wells met de PCL-GelB films gevuld met water. Deze platen werden geïncubeerd in een schudbad op 37°C (\pm 12 uren). De volgende morgen werden de films opnieuw gespoeld, gedroogd aan de lucht, en bewaard in een koelkast bij 4°C. In figuur 7.7 wordt de covalente immobilisatie van GelB weergegeven.



Figuur 7.7: Illustratie van de covalente immobilisatie van GelB op PCL-AEMA films

7.5 Oppervlaktekarakterisatie

7.5.1 Kleuringen

Een kwalitatieve bepaling van het graftproces en het immobilisatieproces werd nagegaan door PCL-AEMA, en PCL-GelB films te kleuren met respectievelijk eosine en Coomassie Brilliant Blue. Blanco's werden bepaald door kleuring van niet behandelde PCL films. Een vergelijking werd visueel uitgevoerd.

Het protocol voor de kleuring met eosine was als volgt: het 'sample' werd gedurende 60 sec ondergedompeld in 2 ml van een 2M CH_2I_2 oplossing in tertiair butylmethylester. Dit werd gevolgd door achtereenvolgens 60 sec kleuring in een 0,2 % w/w eosine oplossing (in ethanol, EtOH) en een spoeling met EtOH. Finaal werd het 'sample' 60 sec geweekt in EtOH.

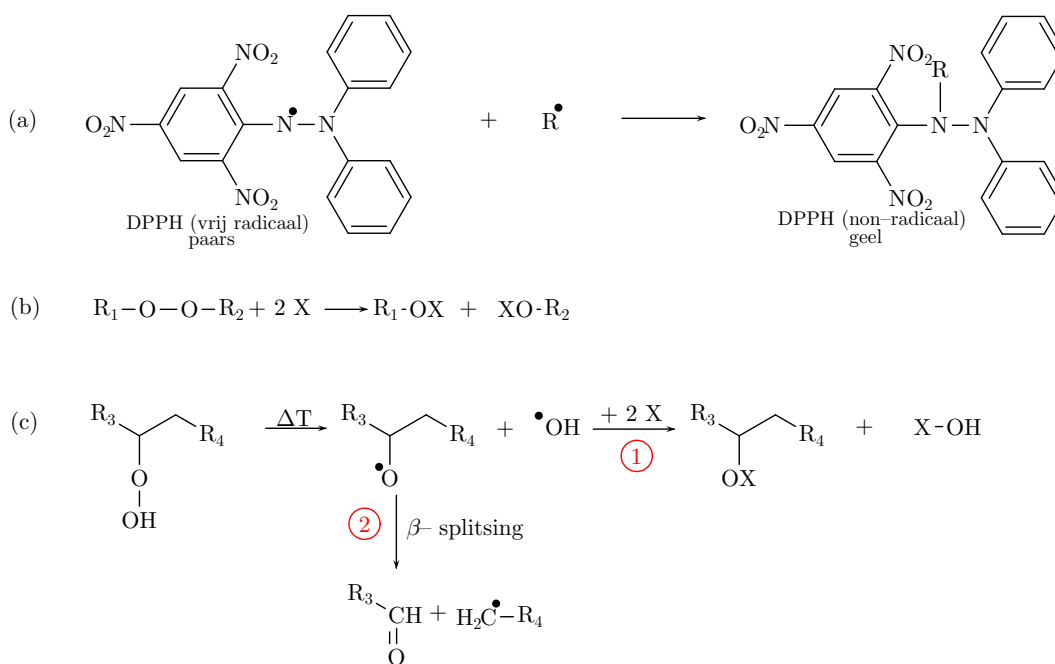
Voor de Coomassie kleuring werden de 'samples' gedurende 37 min bij kamertemperatuur geïncubeerd in een 0,05 % w/w Coomassie-oplossing in methanol (MeOH). Vervolgens werden de stalen ongeveer anderhalf uur ontkleurd met een MeOH/HAc mengsel. Tijdens het spoelproces werd het solvent verscheidene malen ververs.

7.5.2 DPPH metingen

Een bepaling van de hoeveelheid (hydro)peroxiden gegenereerd na 30 sec Ar-plasmabehandeling en 10 min atmosferische blootstelling werd uitgevoerd volgens de methode van Boutevin *et al.* [82]: *DPPH methode*. Een 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma, DPPH) oplossing werd bereid in droge toluen en 30 min doorborreld met Argon teneinde alle zuurstof te verwijderen. Per monster werd een kolf, waarin het monster werd overgebracht, met bolkoeler voorzien en werd alles afgesloten van de lucht. De stalen werden ondergedompeld in 5 ml van een 4 mg/ml DPPH oplossing en gedurende de hele procedure doorborreld met Argon. De kolf werd vervolgens opgewarmd tot 115°C (oliebad) voor een periode van 15 min. De absorptantie van de oplossing werd na afkoeling gemeten in een Biotek Uvikon XL UV-VIS spectrofotometer bij een golflengte van 520 nm. Blanco 's werden bepaald door niet behandelde stalen en een controle van de procedure werd uitgevoerd met de DPPH oplossing op zich en de oplossing met 1 druppel zuivere hydroperoxiden (Sigma). [82, 83]

DPPH is gekend als een stabiel, vrij radicaal door de delocalisatie van een elektron over de hele molecule. Door de delocalisatie treedt geen dimerisatie op, wat wel het geval zou zijn bij de meeste vrije radicalen. De delocalisatie is visueel waarneembaar onder de vorm van een donker violette kleur, gekarakteriseerd door een absorptiepiek bij 520 nm. Indien DPPH gemengd wordt met een substantie die waterstofatomen kan afstaan, wordt DPPH gereduceerd

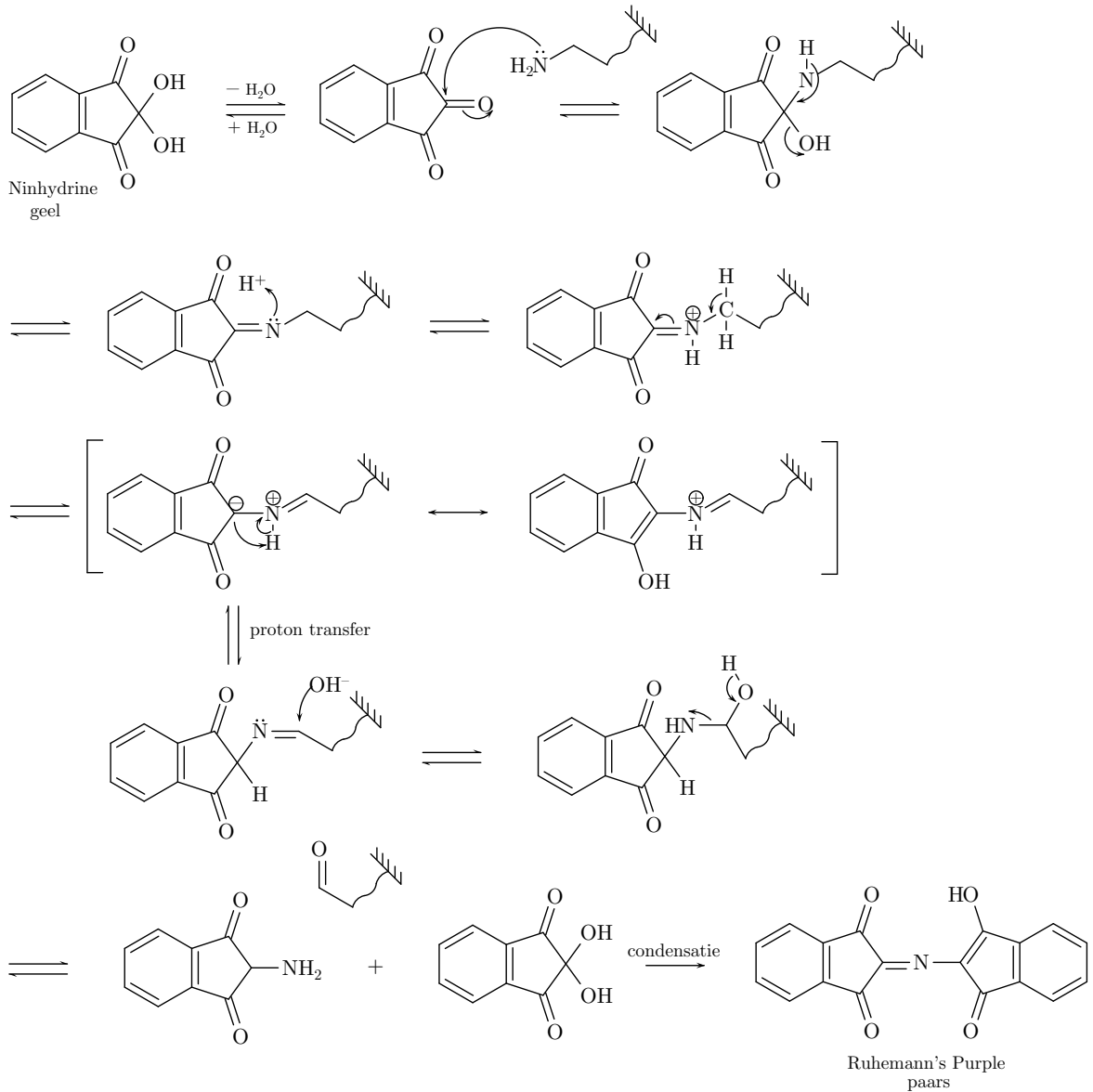
en verliest het zijn violette kleur (een residuele gele kleur wordt verwacht afkomstig van de picryl groep). In het geval van (hydro)peroxiden wordt een decompositie verkregen. In figuur 7.8 wordt het reactiemechanisme uitgelegd. De decompositie van peroxiden leidt altijd tot een ketensplitsing. De decompositie van hydroperoxiden is complexer daar er een β -splitsing (figuur 7.8 b, reactieweg 2) kan plaatsgrijpen. Een vrije radicaal inhibitor (cfr. DPPH) zal in dit geval ketensplitsing verhinderen (figuur 7.8 b, reactieweg 1). [82, 83, 84]



Figuur 7.8: Reactiemechanisme van DPPH (X) met (b) peroxiden, (c) hydroperoxiden. (a) Toont de omzetting van het vrije radicaal DPPH naar een non-radicaal

7.5.3 Ninhydrine assay metingen

Een kwantitatieve bepaling van het aantal vrije amines op de PCL-AEMA films gebeurde aan de hand van een reactie met ninhydrine [18, 85, 86, 87]. Een 1M ninhydrine (Aldrich) oplossing in ethanol werd bereid. Het opstellen van een calibratiecurve gebeurde aan de hand van verschillende standaarden gemaakt van zuivere, gedestilleerde aminoethanol in isopropanol. De PCL-AEMA films werden bedekt met 200 μ l ninhydrine-oplossing en verwarmd tot 80°C gedurende 15 min, in afgesloten druk tubes. Na afkoelen tot kamertemperatuur werden de stalen opgelost in 2 ml THF, onmiddellijk gevolgd door toevoeging van 2 ml isopropanol (ter stabilisatie van de ninhydrine). De absorbantie van de bekomen oplossingen werd opgemeten in een Biotek Uvikon XL UV-VIS spectrofotometer bij een golflengte van 560 nm, met als referentie isopropanol/THF (50/50 % vol.). Blanco's werden bepaald door gebruik te maken van niet-gegrafte PCL films, en de gemiddelde blanco waarde werd afgetrokken van de opgemeten absorbantiewaarden. Van elke serie werden drie stalen gemeten, en 1 serie werd in duplo uitgevoerd. Bijkomend werden, voor het nagaan van de reproduceerbaarheid en significantie, de verschillen tussen de reeksen aan een statistische analyse onderworpen. De reactie met ninhydrine wordt weergegeven in figuur 7.9.



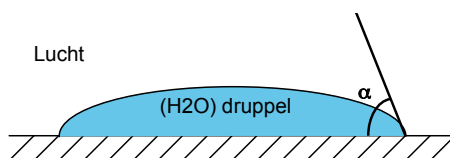
Figuur 7.9: Reactiemechanisme voor de bepaling van amines met behulp van de ninhydrine methode

7.5.4 Statische contacthoekmetingen

Statische contacthoekmetingen (OCA 20, Dataphysics) bij kamertemperatuur en in lucht werden uitgevoerd op blanco PCL, PCL-AEMA, PCL-GelB, en GelB films. Er werd getracht de invloed van de processtappen op de bevochtigbaarheid van de films na te gaan [18]. De gebruikte methode was de *'sessile drop' methode*. Per meting werd een druppel van 1 μ l op de film gedeponeerd (Hamilton 'micro-syringe'), en werd een video opgenomen over een tijdsbestek van ± 60 sec. De berekening van de contacthoeken gebeurde computergestuurd (Dataphysics SCA 202 versie 3.61.4 build 195) met de Laplace-Young fitting. De waarden

berekend over de eerste 5 sec werden uitgemiddeld en vergeleken. Van de PCL-AEMA films werden de contacthoeken na 30 sec eveneens vergeleken. [81]

Op elk staal werden 3 metingen uitgevoerd, van elke serie werden 2 stalen gemeten, en elke serie werd op zijn beurt gemeten in duplo. Bijkomend werd, voor het nagaan van de reproduceerbaarheid en het aantonen van significante verschillen tussen reeksen, een statistische analyse uitgevoerd. Figuur 7.6 geeft een schematische illustratie van de methode.



Figuur 7.10: Schematische illustratie van de contacthoekmeting

7.5.5 X-stralen foto-elektron spectroscopie

‘X-ray photoelectron spectroscopy’ (XPS) metingen werden uitgevoerd op een ESCA S-probe VG monochromatische spectrometer met een Al $K\alpha$ X-stralen bron (1486 eV). PCL-AEMA, PCL-GelB, en de GelB films werden geanalyseerd. De relatieve piekoppervlaktes werden bepaald via een ‘*survey scan spectrum*’ voor determinatie van de relatieve elementaire samenstelling van de buitenste laag. Het N 1s kernsignaal werd gebruikt als een indicator voor de covalente grafting van AEMA, en het verloop van de N/C verhoudingen werd gebruikt voor het aantonen van de covalente immobilisatie van GelB, op de PCL films.

XPS bepaalt de atomaire samenstelling van een vast oppervlak tot op enkele nanometer diepte. Tijdens blootstelling aan X-stralen fotonen, stoot het oppervlak foto-elektronen uit waarvan de bindingsenergiën kunnen vergeleken worden met gekende waarden van elementen. De bindingsenergie wordt gedefinieerd als het energieverval tussen het (n-1) elektron finale toestand en het n-elektron initiële toestand van een atoom. De bindingsenergie is een functie van het atoomtype, elektron positie en de omgeving. Als de energie van een atoom zijn initiële toestand wordt gewijzigd, (cfr. de vorming van chemische bindingen met andere atomen), zal de bindingsenergie van de elektronen van dat atoom ook worden gewijzigd. Deze verandering in bindingsenergie wordt een *chemische shift* genoemd. Door de mogelijkheid om de chemische omgeving van elk element te bepalen via de chemische shift en de bindingsenergie, kan gedetailleerde informatie van de chemische samenstelling worden verkregen. Op die manier kan een element geïdentificeerd worden en zijn oxidatie toestand worden bepaald. Het resulterende spectrum is een plot van de intensiteit (CPS) versus de bindingsenergie (eV). De intensiteit van de geëjecteerde foto-elektronen staat in direct verband met de atomaire samenstelling van het materiaal oppervlak en kan daarom gebruikt worden bij de kwantitatieve bepaling van de atomaire samenstelling en stoichiometrische verhoudingen. Omdat XPS gelimiteerd is tot op enkele nanometer diepte van een oppervlak, dienen de stalen zeer voorzichtig te worden behandeld daar zelfs de kleinste oppervlakte contaminatie zichtbaar wordt in het resulterende spectrum. [18, 81]

7.5.6 Infrarood spectroscopie

Infrarood (IR) metingen werden uitgevoerd op een BIO-RAD 575 C FT-IR spectrometer en infrarood mapping werd uitgevoerd op een Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR spectrometer in combinatie met een Perkin-Elmer Spotlight 400 FT-IR beeldvormingssysteem. De spectra van PCL, PCL-AEMA, en PCL-GelB films werden opgemeten, gebruik makend van een ‘golden gate’. In totaal werden 16 scans opgenomen met een resolutie van 4 cm^{-1} , waarbij een achtergrond subtractie ten opzichte van lucht steeds voorafgaand aan de metingen werd uitgevoerd.

FT-IR gebruikt infrarood bestraling om de chemische functionaliteiten in een staal te bepalen. Wanneer een IR bundel een ‘sample’ raakt ondergaan de chemische bindingen vibraties, waardoor ze de IR straling absorberen bij een bepaalde golflengte⁴. Bepaalde functionele groepen (cfr. esters, amides, ...) absorberen IR straling van een typische golflengte. De resulterende plot is een plot van de absorptie (of transmissie) versus de golflengte. De diepte waarop gemeten wordt is afhankelijk van het IR transmitterende kristal dat wordt gebruikt om de initiële IR bundel te reflecteren, alsook van de refractieve index van het kristal. De orde-grootte is microns. [18]

7.5.7 Atomic force microscopy

‘Atomic Force Microscopy’ (AFM) beelden van PCL-AEMA films werden onder wisselende condities opgenomen met een ‘Multimode scanning probe’ microscoop (Digital Instruments, USA) voorzien van een Nanoscope IIIa controller. De scans waren van de grootte-orde van $50 \mu\text{m}$ en zijn opgenomen in ‘tapping mode’ met een silicone cantilever (OTESPA, Veeco). Een analyse van de oppervlakteruwheid werd uitgevoerd, nadat de opgenomen beelden gemodificeerd waren met een X en Y ‘Plane Fit Autoprocedure’, met behulp van de software Nanoscope versie 4.43r8 [88]. Blanco’s werden bekomen door beeldopname van niet behandelde PCL films.

Bij AFM beweegt een tip, bevestigd aan een flexibele cantilever, over de oppervlakte van het staal om de morfologie van de oppervlakte op atomaire schaal te meten. Op de tip wordt een laserstraal gereflecteerd. De verandering in oppervlaktehoogte wordt gemeten door de mate van delocatie van de gereflecteerde laserbundel in een fotodetector. Bij het scannen over een oppervlak wordt een topografische kaart gegenereerd waaruit de oppervlakteruwheid kan berekend worden. AFM heeft een resolutie van 30 op minder dan 1 angstroms (lateraal op verticaal). De resolutie is dus op subnanometer schaal. [18]

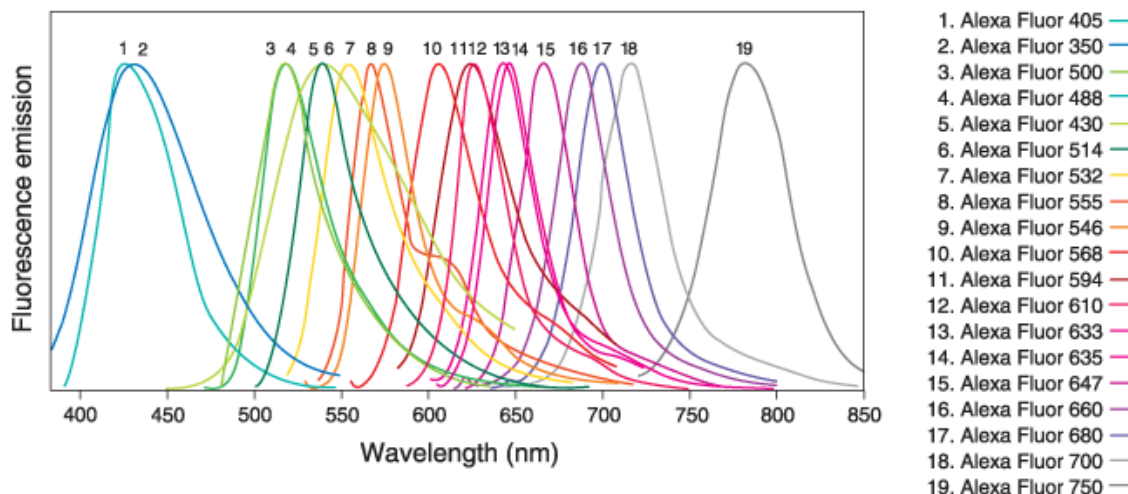
7.5.8 Confocale fluorescentie microscopie

Confocale fluorescentie microscopie (CFM) werd uitgevoerd op PCL, PCL-AEMA en GelB gedipcoatte PCL films, in natte condities, op een Leica SP5 laser scanning confocale microscoop met een 40X 1.25 objectief in olie-immersie. Fluorescente labelling van primaire amines gebeurde met Alexa Fluor 546 (Invitrogen). Software-matig (Velocity ‘image analysis software’) werd een 3D-reconstructie van de oppervlaktelaag bekomen.

⁴Bij geattenueerde totale reflexie (ATR) FT-IR, passeert de oorspronkelijke IR bundel eerst door een ZnSe, Ge, of diamant kristal. Hierdoor wordt de oppervlaktegevoeligheid van de techniek verbeterd

Een 2 mg/ml Alexa Fluor 546 oplossing in droge N,N-dimethylformamide (DMF) werd bereid. De kleuringsprocedure was als volgt: het staal werd 60 min geïncubeerd in 2 ml van een 0,1M NaHCO₃ buffer (pH = 8,3). Na incubatie werd 100 μl Alexa Fluor 546 oplossing toegedruppeld en gedurende 60 min geïncubeerd (kamertemperatuur) in een ‘shaking bed’. Na kleuring werd het sample 3x gespoeld met H₂O (milliQ), en werd vervolgens nog 2 uur in milliQ water geïncubeerd bij KT.

Een CFM is een microscoop die gebruikt wordt voor de studie van organische of anorganische componenten, gebruik makend van het fenomeen fluorescentie in plaats van (of in combinatie met) reflectie en absorptie. De te onderzoeken component wordt hierbij gelabeld met een fluorofor (cfr. Alexa Fluor 546). Het staal wordt daarna belicht met licht van een specifieke golflengte, die wordt geabsorbeerd door het fluorofor. Hierdoor zal licht met een grotere golflengte geëmitteerd worden. Met behulp van een emissie filter wordt het emissie spectrum gescheiden van het excitatie spectrum. Typische componenten zijn een lichtbron, excitatie filter, emissie filter, en een dichromatische ‘beam splitter’. Het emissie spectrum van de Alexa Fluor reeks wordt voorgesteld in figuur 7.11.



Figuur 7.11: Emissie spectra van de Alexa Fluor serie [89]

Nadelen van fluorescente labeling zijn de niet-specifieke adsorptie, inhomogene verdeling van de kleuring, en penetratie van de fluorescente molecules in het polymeer, alsook ‘dye-dye’ interacties die typisch leiden tot fluorescente ‘quenching’ en de negatieve invloed op de sensitiviteit van de spectroscopische eigenschappen van het fluorofor op zijn micro-omgeving [57].

7.5.9 Scanning electron microscope

‘Scanning electron microscope’ (SEM) analyse werd uitgevoerd op PCL, PCL-AEMA, en PCL-GelB films. De gebruikte microscoop is een JEOL JSM-5600, gelokaliseerd in de ‘clean room’ (Intec). Voor beeldopnames werd gebruik gemaakt van de ‘secondary electron mode’ (SEI). Zowel oppervlakte-beelden als doorsnede-beelden van de films werden opgenomen. De stalen werden vóór analyse gecoat met een goudlaag van ± 20 nm.

Als een staal wordt gebombardeerd met elektronen zendt het secundaire elektronen en X-stralen uit. De intensiteit van de secundaire elektronen wordt bij SEM gedetecteerd om een hoge resolutie 3D-beeld te maken van een oppervlak. De X-stralen kunnen worden gedetecteerd voor het uitvoeren van een elementen analyse (EDAX). SEM is minder sensitief dan andere technieken, en niet-geleidende polymeren moeten worden bedekt met een goud of grafietlaag voorafgaand aan de analyse. [18]

7.5.10 Profilometrie

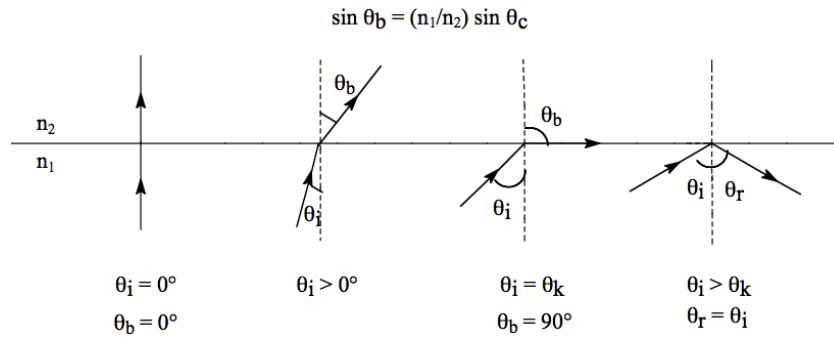
Bij wijze van extra controle werd 1 PCL-AEMA staal geanalyseerd in een Wyko NT3300 non-contact optische profiler (*'clean room'*, Intec). De verticale scanning mode, gebruikt in het experiment, is gebaseerd op een Mirau interferentie microscoop. Het principe is het volgende: een witte lichtstraal wordt opgesplitst door een 'beam splitter' die de ene helft van de straal reflecteert naar een referentie oppervlakte, en de andere helft doorlaat op het staal. Het gereflecteerde licht van zowel staal als referentie wordt vervolgens gerecombineerd aan de 'beam splitter' en vormt *'interference fringes'*. Een detector meet de graad van 'fringe' modulatie of het 'fringe' contrast. Tijdens een meting beweegt de referentie arm, die het interferometrische objectief bevat, verticaal om het oppervlak op variërende hoogten af te scannen. Hierbij moet de afstand tot het oppervlak voortdurend worden bijgesteld om een scherpe spot te behouden. Die bijsturing gebeurt aan de hand van het detectorsignaal en wordt nauwkeurig gecontroleerd door een gelineariseerde piëzo-elektrische transducer. Tijdens het verticale afschannen wordt voor elk punt van het oppervlak een interferentie-sig-naal opgemeten en opgeslaan. Een serie van geavanceerde computer algoritmes wordt vervolgens gebruikt om het signaal te demoduleren en de oppervlakte-informatie te extraheren. Op die manier kan het hoogteprofiel van het sample worden opgemeten. [90]

7.5.11 Surface plasmon resonance

'Surface Plasmon Resonance' (SPR) werd opgemeten met een Biacore-X (GE Healthcare Europe) uitgerust met een interne 500 μl spuit. Metingen op PCL, Ar-plasma behandelde PCL en PCL-AEMA gecoate gouden SPR chips (zie 7.1: *Vervaardigen van dunne PCL films*) werden uitgevoerd. De 'flow rate' bedroeg 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. De experimenten werden uitgevoerd in een 10mM PBS buffer (pH = 7,4). Na stabilisatie werd 70 μl van een proteïne oplossing geïnjecteerd. De onderzochte proteïnes waren: GelB (0,1 en 0,5 mg/ml); GelMOD [91] (0,1 mg/ml), verstrekt door S. Van Vlierberghe; fibronectine (Sigma, 0,1 mg/ml), en; laminine (Sigma, 0,1 mg/ml). Proteïne-oplossingen werden bereid in bovenvermelde PBS buffer. Na injectie werd niet geadsorbeerd proteïne weggespoeld met buffer. De adsorptie van fibronectine werd nagegaan door een tweede injectie met 70 μl anti-fibronectine (DakoCytomation; 0,1 mg/ml) oplossing. Een kwalitatieve analyse van de hoeveelheid geadsorbeerd proteïne werd software-matig verstrekt aan de hand van relatieve eenheden (RU).

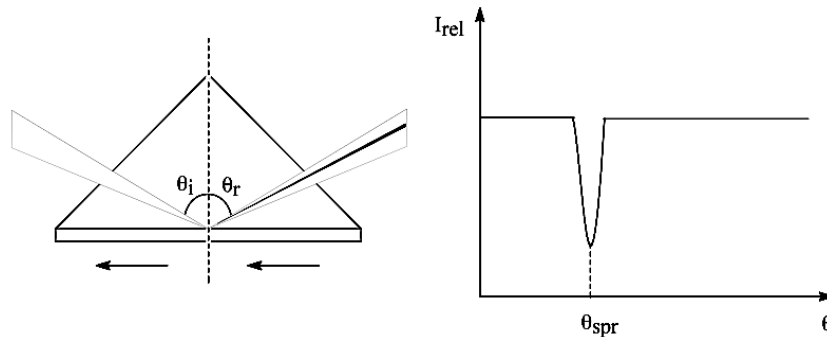
Werkingsprincipe van Surface Plasmon Resonance

Een invallende lichtbundel op de interfase van twee optisch transparant media met een verschillende refractieve index wordt gereflecteerd in het medium met de hoogste refractieve index. Dit fenomeen treedt enkel op indien de hoek van de invallende lichtbundel een zekere kritische waarde (θ_k) overschrijdt, en wordt *totale interne reflectie* (TIR) genoemd (figuur 7.12, met $n_1 > n_2$).



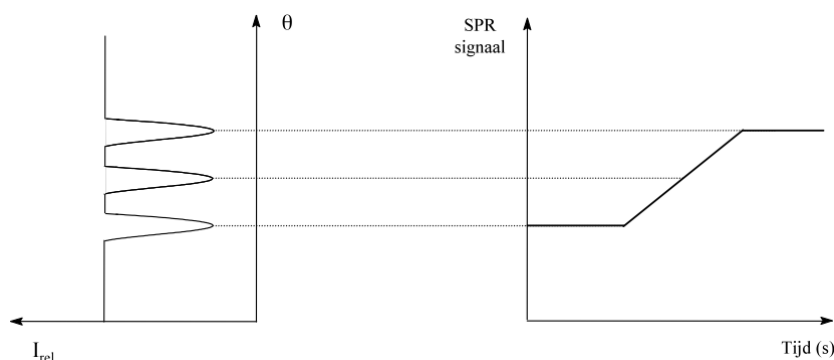
Figuur 7.12: TIR grafisch voorgesteld, met θ_i de invalshoek, θ_b de brekingshoek, θ_k de kritische invalshoek voor TIR, θ_r de reflectiehoek, en n_1 en n_2 de respectievelijke brekingsindices

Ondanks dat de invallende bundel totaal wordt gereflecteerd, penetreert een elektromagnetische veldcomponent van de lichtbundel (*‘the evanescent wave’*) over een kleine afstand in het medium met de lagere refractieve index. Over die kleine gepenetreerde afstand kan deze elektromagnetische veldcomponent moleculen exciteren (resonantie). ‘Surface Plasmon Resonance’ (SPR) is het fenomeen waarbij een minimum verschijnt in het gereflecteerde licht bij een specifieke invalshoek, als gevolg van een monochromatische en p-gepolarizeerde invallende bundel op een interfase, gecoat met een dunne laag vrije-elektron metaal (cfr. goud). Dit wordt voorgesteld in figuur 7.13. [91]



Figuur 7.13: Het principe van SPR

De hoek waarbij resonantie optreedt is zeer gevoelig voor variaties in de refractieve index van de oppervlaktelaag op het metaaloppervlak. In ons geval worden variaties verkregen door de fysische adsorptie van proteïnes op een PCL(-AEMA) film, geïmmobiliseerd op een sensor chip. De adhesie zal de resonantie hoek verschuiven naar een hogere waarde (figuur 7.14). De respons van een SPR hangt af van de gemiddelde refractieve index variatie, als een gevolg van de interactie tussen de geïnjecteerde molecules en het substraat. Het daaruit voortvloeiende resonantie signaal wordt uitgedrukt in relatieve eenheden (RU) (figuur 7.13). De verandering in RU is een maat voor de hoeveelheid geadsorbeerd proteïne en verschaft bijgevolg informatie over de affiniteit van het oppervlak voor het proteïne. [91]



Figuur 7.14: Uitgaande van variaties in de reflexie hoek wordt een SPR sensogram opgesteld

7.6 Celculturen

PCL films werden bereid zoals vermeld in 7.1: *Vervaardigen van dunne PCL films*, spincoaten op ronde dekglasjes ($\emptyset = 14$ mm). PCL-AEMA en PCL-GelB films werden bereid volgens bovenvermeld protocol. PCL-Fn films werden bereid door fysisorptie van fibronectine op PCL-GelB films. Hiervoor werden PCL-GelB films gedurende 60 sec ondergedompeld in een 1 mg/ml fibronectine oplossing. De films werden overgebracht in 24-well suspensieplaten waarin per plaat 3 PCL films, 3 PCL-AEMA films, 3 PCL-GelB films, en 3 PCL-Fn films werden ondergebracht.

Elke 24-well plaat werd afgesloten met parafilm en koud gesteriliseerd met ethyleenoxide (UZ Gent, dienst Sterilisatie). De stalen werden geproduceerd ten hoogste 1 week voor het uitvoeren van celcultuur testen.

Celcultivatie werd uitgevoerd met ‘*green fluorescent protein*’ (GFP) getransfecteerde osteosarcoma cellen (ECACC), kwaadaardige bot tumor cellen, afkomstig van een rat. Het GFP is zichtbaar onder een fluorescentie microscoop. Het gebruikte medium is een samenstelling bestaande uit:

- DMEM (GIBCO Invitrogen);
- 10 % feutaal kalf serum (FCS, GIBCO Invitrogen);
- 2mM glutamine (Sigma Aldrich);
- P/S (10 U/ml penicilline en 10 mg/ml streptomycine, GIBCO Invitrogen);
- 0,025 mg/ml fungizone (GIBCO Invitrogen);

Cellen werden gecultiveerd in normale ‘*tissue culture plates*’ (TCPS) in het hierboven beschreven medium, in een incubator bij 37°C en 5 % CO₂.

Per ‘well’ werden 20 000 cellen uitgezaaid. Het gebruik van suspensieplaten garandeert celadhesie aan de films en niet aan de platen. De cellen werden om de 2 dagen verversen en bekeken onder een IX81 fase contrast microscoop (Olympus). Zowel fluorescente als fase contrast beelden werden opgenomen en vergeleken. Beeldopnames gebeurden door gebruik van Cell M imaging en software system (Olympus BioSystems). Een positieve en negatieve controle

werd ingebouwd. Als positieve controle werd een 24-well ‘*culture plate*’, en als negatieve controle een 24-well ‘*suspension plate*’, in afwezigheid van stalen, gebruikt waarin cellen werden uitgezaaid.

Hoofdstuk 8

3D-Biplotter Toepassingen

In een laatste deel van de thesis werd de Biplotter techniek toegepast voor de productie van poreuze scaffolds. De interne structuur van de geprinte scaffolds werd vervolgens onderzocht via SEM.

8.1 Introductie in de 3D-Biplotter Techniek

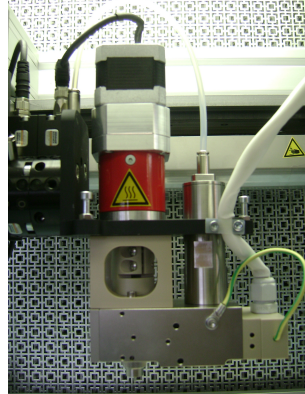
Aangezien het toestel vrij recent geïnstalleerd werd, was het aangewezen om met een standaard polymeer de mogelijkheden van het toestel te verkennen. De training gebeurde met commercieel beschikbaar PCL (Sigma Aldrich, $M_n = 80000$ g/mol). De bioscaffolder (figuur 8.1) bestaat ruwweg uit een ruimte waarin een hoge temperatuur extrusiekop met Auger schroef (medium en hoge viscositeit materialen) en een lage temperatuur dispensiekop met een lineaire, op druk gedreven pomp voorhanden zijn. Figuren 8.2 en 8.3 tonen respectievelijk een foto van de extrusie- en dispensiekop.



Figuur 8.1: Foto van de bioscaffolder

De bioscaffolder heeft een maximale werkoppervlakte van $150 \times 200 \times 90$ mm³ (XYZ). De extrusiekop is vervaardigd uit ‘medical grade stainless steel’ met een naald uit ‘medical grade

stainless steel', en is aangesloten op een temperatuurscontrole systeem waarmee de temperatuur tot 250°C kan geregeld worden.



Figuur 8.2: Foto van de extrusiekop

De dispensiekop mondt uit in een Luer-Lock naald, en is aangesloten op een 'solid state' koelsysteem (Peltier elementen) met temperatuurscontrole van 5°C tot 50°C.



Figuur 8.3: Foto van de dispensiekop

Het hele systeem wordt computergestuurd via de *Bioscaffolder versie 3.0* software.

8.2 Plotten van Scaffolds

In eerste instantie wordt getracht eenvoudige structuren te plotten uit commercieel beschikbaar PCL (Sigma Aldrich, $M_n = 80000$ g/mol). Hiervoor worden optimale parameters gezocht. De te plotten structuren worden onder de vorm van een *.stl* file ingeladen in het software programma. Vervolgens berekent het programma uit de naald diameter, de ingestelde afstand tussen de struts, en het plotpatroon (cfr. 90° , 45° , ...) het aantal lagen, het aantal struts per laag, en het patroon van de struts. Dit kan visueel worden gecontroleerd. Ten slotte wordt een NC code gegenereerd die een codering voorstelt voor de besturing van het systeem.

In tweede instantie is het de bedoeling een dergelijk proces uit te werken voor de gesynthetiseerde copolymeren. Hierbij zal aandacht worden geschonken aan een initiator systeem voor de vernetting van de geplote struts, alsook aan een inhibitor systeem om vernetting in de extrusiekop te vermijden.

8.3 Scanning Electron Microscope

SEM beeldopnames worden uitgevoerd op de geplote scaffolds om een kwalitatief beeld te krijgen van de structuren. De methode is analoog aan de methode uit *2.5.9 Scanning electron microscope*.

Deel III

RESULTATEN EN BESPREKING

Hoofdstuk 9

Evaluatie van de gesynthetiseerde Random Copolymeren

In dit hoofdstuk wordt de synthese en karakterisatie van random copolymeren, uitgaande van CL en LA monomeren, besproken. Hierbij wordt de chronologische volgorde uit deel 2: Materialen en Methoden gerespecteerd.

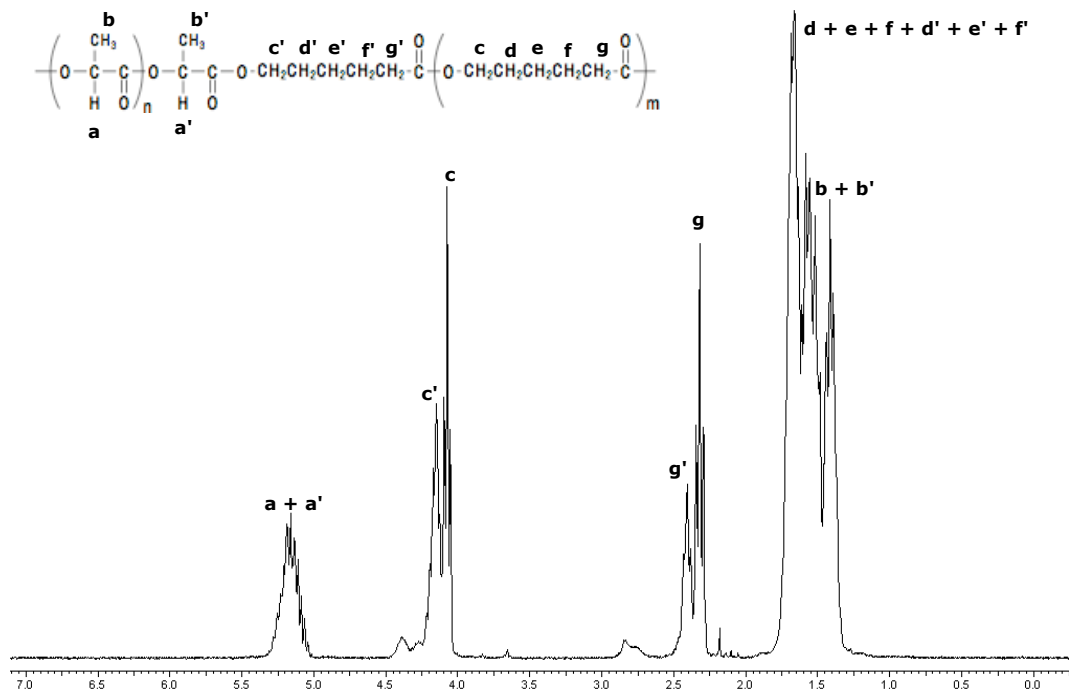
9.1 Proton - Nucleaire Magnetische Resonantie

Drie batchen p(D,L-LA-co- ϵ -CL) werden gesynthetiseerd, en eindgroep gemodificeerd volgens het protocol beschreven in hoofdstuk 6: *Synthese van p(D,L-LA-co- ϵ -CL) en p(D,L-LA-co- ϵ -CL) BMA*. Zowel van de gewone random copolymeren als van de eindgroep gemodificeerde random copolymeren werden (van elke batch) $^1\text{H-NMR}$ spectra opgenomen. Voorbeelden van typische spectra die werden bekomen worden weergegeven in figuren 9.1 en 9.2. De spectra zijn vergelijkbaar met spectra van analoge copolymeren die vroeger werden gerapporteerd in de literatuur [55, 61, 64].

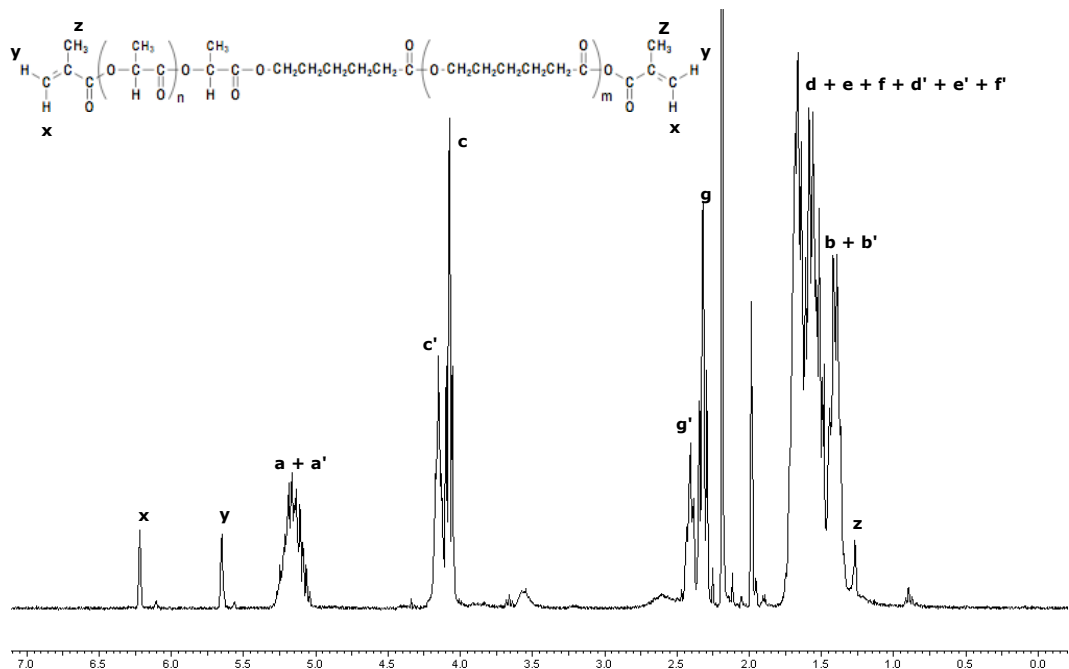
De spectra laten toe om de procentuele moleculaire samenstelling te bepalen door identificatie en integratie van protonensignalen afkomstig van ϵ -CL en D,L-LA ‘repeating units’. (Een opsplitsing kan gemaakt worden in de pieken afkomstig van protonen uit een CL eenheid gekoppeld aan een LA eenheid, een LA eenheid gekoppeld aan een andere LA eenheid, of een CL eenheid gekoppeld aan een andere CL eenheid) In tabel 9.1 worden de aangewende moleculaire procentuele samenstellingen in het oorspronkelijke comonomeren mengsel ($f_{\text{CL}}/f_{\text{LA}}$), alsook de experimenteel bekomen moleculaire procentuele samenstellingen ($F_{\text{CL}}/F_{\text{LA}}$) weergegeven. Daarnaast wordt per batch de opbrengst na dialyse, en het rendement van de eindgroepmodificatie vermeld. De berekening voor het rendement steunt ook op de integratie van pieken uit de $^1\text{H-NMR}$ spectra.

Tabel 9.1: Samenstellingen, opbrengsten, en rendementen van de gesynthetiseerde copolymeren via $^1\text{H-NMR}$

| Batch | $f_{\text{CL}}/f_{\text{LA}}$ (% / %) | $F_{\text{CL}}/F_{\text{LA}}$ (% / %) | Opbrengst polymerisatie (%) | Rendement eindgroepmodificatie (%) |
|-------|--|--|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 50/50 | 46/54 | 57 | 100 |
| 2 | 50/50 | 47/53 | 53 | 99 |
| 3 | 50/50 | 49/51 | 68 | 100 |



Figuur 9.1: ^1H -NMR spectrum van poly(D,L-LA-co- ϵ -CL) random copolymeren, opgenomen in CDCl_3 op 300 MHz



Figuur 9.2: ^1H -NMR spectrum van poly(D,L-LA-co- ϵ -CL) bismethacrylaat random copolymeren opgenomen in CDCl_3 op 300 MHz

Voor de berekening van de experimentele procentuele samenstelling worden in de literatuur 2 methoden aangehaald. Jeong *et al.* [55] voeren hun berekeningen uit aan de hand van de geïntegreerde pieken bij $\delta = 4,0 - 4,3$ (methyleen protonen van de ϵ -caproyl eenheid naast het ester zuurstof atoom; $c + c'$) en $\delta = 2,3 - 2,5$ (CH_2 protonen naast de carbonyl groep; $g + g'$). Hun berekening baseert zich op de opsplitsing van de afzonderlijke pieken (c , c' , g , en g'), waarbij c'/g' de CH_2 voorstelt van een CL eenheid gekoppeld aan een LA eenheid, en c/g de CH_2 gekoppeld aan een andere CL eenheid. Aangezien in ons geval de scheiding van de afzonderlijke pieken niet goed is, kan deze methode niet worden aangewend. Een tweede methode wordt vermeld door Cohn en Salomon [61], en Baimark en Molloy [64]: hun berekening baseert zich op de integratie van de ϵ -CL CH_2 protonen van de ϵ -caproyl eenheid naast het ester zuurstof atoom ($\delta = 3,9 - 4,2$; $c + c'$) en de D,L-LA CH protonen ($\delta = 5,0 - 5,3$; $a + a'$).

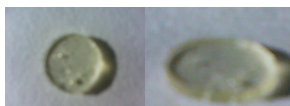
In dit werk wordt een combinatie van beide methoden gebruikt. Voor de berekening van de procentuele samenstelling worden de signalen gebruikt, afkomstig van de CH protonen van de LA eenheden ($\delta = 4,9 - 5,3$; $a + a'$) en de CH_2 protonen naast de ϵ -caproyl eenheid naast het ester zuurstof atoom van de CL eenheden ($\delta = 3,9 - 4,2$; $c + c'$). Ter controle wordt het signaal van de CH_2 protonen naast de carbonyl groepen uit de CL eenheden ($\delta = 2,1 - 2,5$; $g + g'$) afgewogen tegenover het signaal bij $\delta = 3,9 - 4,2$ ($c + c'$). Deze verhouding moet theoretisch 1 zijn, en praktisch zo dicht mogelijk de waarde 1 benaderen. Voor de 3 afzonderlijke batchen was dit het geval.

De experimenteel vastgestelde procentuele samenstellingen benaderen een equivalente verhouding, hetgeen theoretisch werd verwacht. De resultaten komen overeen met waarden die worden weergevonden in de literatuur [55, 64].

De berekening van het rendement van de eindgroepmodificatie steunt op de toevoeging van trichloro acetyl isocyanaat (TAIC) aan de $^1\text{H-NMR}$ oplossing van het gemodificeerde copolymeer. TAIC bindt de resterende hydroxyl eindgroepen, waardoor de shift van de naburige CH_2 protonen naar $\delta = 4,2 - 4,4$ verschuift. De integratie van deze piek wordt vervolgens afgewogen tegen de pieken, afkomstig van de vinylische protonen uit de methacrylaat eindgroepen ($\delta = 6,1 - 6,3$ (x) en $\delta = 5,6 - 5,7$ (y)). Theoretisch moeten de signalen afkomstig van x en y een identieke integratiewaarde vertonen. Dit werd bevestigd in de praktijk. Formule (9.1) werd gebruikt voor de berekening:

$$\text{Rendement}(\%) = \frac{\sum_{i=x,y} \text{oppervlakte}_i}{\sum_{j=x,y,t} \text{oppervlakte}_j} \quad (9.1)$$

met t het signaal van de CH_2 protonen naast de niet gemodificeerde OH eindgroepen, en x/y de signalen van de CH_2 protonen van de methacrylaat eindgroepen. De eindgroepmodificatie stelt ons in staat een chemische vernetting van de random copolymeren te verwezenlijken (figuur 9.3) met een D,L-camphorquinone/ethyl-4-dimethylamino-benzoaat systeem [60]. Vernetting gebeurt bij kamertemperatuur onder invloed van licht.



Figuur 9.3: Chemisch vernette poly(D,L-LA-co- ϵ -CL) bismethacrylaat random copolymeren

In conclusie kan gesteld worden dat de synthese van p(D,L-LA-co-ε-CL) random copolymeren met een equivalente verhouding LA/CL succesvol was. De gemiddelde opbrengst bedroeg 59 %¹. De modificatie van hydroxyl getermineerde p(D,L-LA-co-ε-CL) random copolymeren naar methacrylaat getermineerde p(D,L-LA-co-ε-CL) random copolymeren was mogelijk met een rendement van quasi 100%. De modificatie stelde ons in staat de polymeren chemisch te vernetten bij kamertemperatuur.

9.2 Gel Permeatie Chromatografie

Van elke batch werd het moleculair gewicht (M_n) en de polydispersiteit (PD) bepaald via GPC. De waarden worden weergegeven in tabel 9.2. Aan de hand van de moleculaire gewichten en de moleculaire procentuele samenstelling, bepaald via ¹H-NMR, is het mogelijk om een indicatie te vormen met betrekking tot het aantal eenheden van de afzonderlijke herhaaleenheden, per polymeerketen. I.e. het # CL eenheden per keten en het # LA eenheden per keten. Voor de berekening van deze waarden dienen eerst de gewichtsfracties van de afzonderlijke monomeren per batch te worden berekend. W_{CL} en W_{LA} stellen de gewichtsfracties aan respectievelijk CL en LA herhaaleenheden voor. De berekening van de gewichtsfracties en het # herhaaleenheden per polymeerketen gebeuren aan de hand van formules (9.2) en (9.3):

$$W_X = \frac{F_X M_X}{\sum_{i=CL,LA} F_i M_i} \quad (9.2)$$

$$\# X \text{ eenheden/keten} = \frac{W_X M_n}{M_X} \quad (9.3)$$

waarbij de index X staat voor CL of LA. M_{CL} bedraagt 114,14 g/mol ($-O(CH_2)_5CO-$ herhaaleenheden) en M_{LA} bedraagt 72,06 g/mol ($-OCH(CH_3)CO-$ herhaaleenheden).

Tabel 9.2: Moleculaire massa's, en afgeleide grootheden, van de gesynthetiseerde copolymeren

| Batch | F_{CL}/F_{LA} (% / %) | W_{CL} | W_{LA} | M_n (g/mol) | PD | # CL eenheden/keten | # LA eenheden/keten |
|-------|----------------------------|----------|----------|------------------|------|------------------------|------------------------|
| 1 | 46/54 | 0,57 | 0,43 | 3473 | 1,65 | 17 | 21 |
| 2 | 47/53 | 0,58 | 0,42 | 3578 | 1,59 | 18 | 21 |
| 3 | 49/51 | 0,60 | 0,40 | 4306 | 1,38 | 23 | 24 |

Uit tabel 9.2 blijkt dat batch 3 het hoogste moleculaire gewicht bezit, met de laagste polydispersiteit. Batch 1 en 2 zijn vergelijkbaar, zowel op vlak van moleculair gewicht, als op vlak van hun polydispersiteit. In de bespreking van het werkingsmechanisme van de copolymerisatie met een $Mt(OOCR)_x/R'OH$ systeem (hoofdstuk 6: *Synthese van p(D,L-LA-co-ε-CL) en p(D,L-LA-co-ε-CL) BMA*) werd de invloed van de alcohol en organometaal concentratie op het moleculair gewicht en de polydispersiteit besproken. Hogere concentraties aan alcohol leiden tot een merkbaar lager moleculair gewicht, terwijl hogere concentraties aan organometaal de polymerisatiesnelheid laten toenemen en theoretisch het moleculair gewicht verlagen [64]. In de praktijk werd echter geen invloed van de organometaal concentratie op het moleculair gewicht waargenomen, doch werd een lagere waarde voor de polydispersiteit genoteerd

¹Declercq *et al.* [60] rapporteerden een opbrengst van 62 procent

bij lagere organometaal concentraties. De monomeer / alcohol verhoudingen en de mol % organometaal per totale hoeveelheid HXD worden weergegeven in tabel 9.3.

Tabel 9.3: Exacte initiële synthese condities

| Batch | monomeren / alcoholen (molaire verhouding) | mol % per totale hoeveelheid hydroxylgroep van het HXD |
|-------|---|---|
| 1 | 18 / 1 | 1,02 |
| 2 | 18 / 1 | 1,03 |
| 3 | 18 / 1 | 1,00 |

Uit de exacte initiële systeemverhoudingen is het moeilijk om conclusies te trekken met betrekking tot batch 1 en 2. Het verschil met batch 3 is groter (op het vlak van de organometaal concentratie), doch is het niet verantwoord te stellen dat de lagere concentratie aan $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ de oorzaak is voor het hogere moleculaire gewicht. Andere oorzaken kunnen ook gevolg geven aan een hoger moleculair gewicht, cfr. het gebruik van beter gedroogde uitgangsubstanten en/of glaswerk [64]. Vanuit dit opzicht is het belangrijk de experimentele opbrengst van de synthese in rekening te brengen, en de theoretisch te verwachten moleculaire gewichten voor een equivalente verhouding aan monomeren uit te rekenen:

$$M_{n,theoretisch} = (M_{LA} + M_{CL}) (\text{monomeren/alcoholen}) \frac{\text{opbrengst}}{100} \quad (9.4)$$

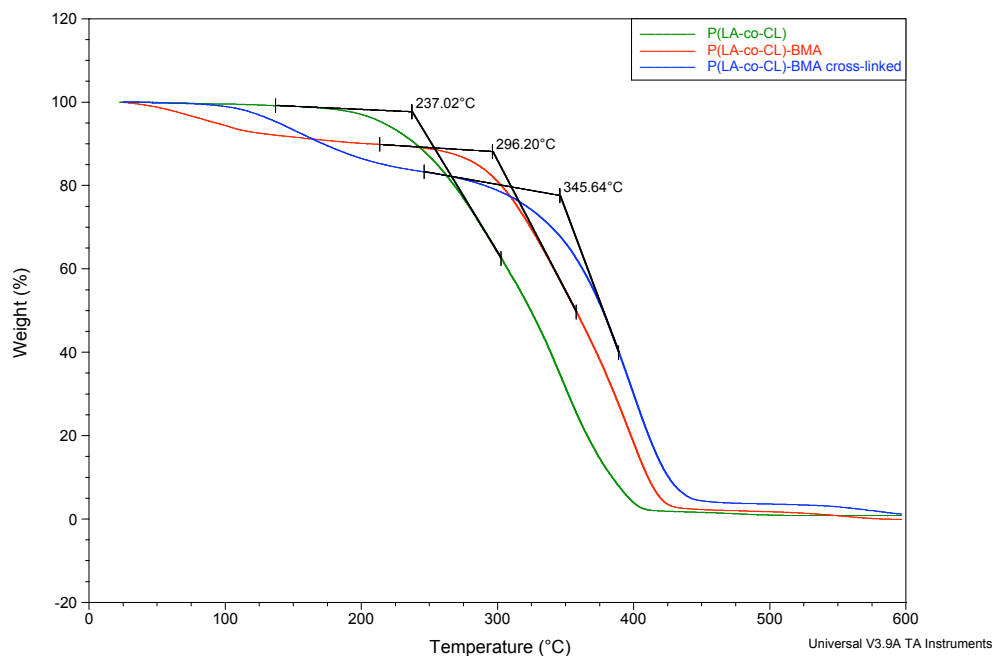
De theoretisch te verwachten M_n 's bedragen respectievelijk 2644, 2459 en 3163. Het is dus meer waarschijnlijk dat randcondities hebben geleid tot het gevoelig hogere moleculaire gewicht. Daarnaast is het wel zo dat de invloed van de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ concentratie eerder zichtbaar is in de PD, overeenkomstig Baimark en Molloy [64].

9.3 Thermogravimetrische Analyse

Degradatiestudies van poly(LA-co-CL) random copolymeren en poly(LA-co-CL) blok-copolymeren *in vitro* en *in vivo* zijn reeds veelvuldig beschreven in de literatuur [55, 61, 64, 70]. Voor de *in vitro* en *in vivo* studies geldt dat de degradatie van de copolymeren zich sneller voltrekt dan van de afzonderlijke homopolymeren. Meer bepaald vindt er in het geval van random copolymeren (met een verhouding van 50/50) een soort faseseparatie plaats waardoor zachte regio's van CL eenheden en harde LA domeinen ontstaan. In het geval van blok-copolymeren is er inherent al een opsplitsing. Er werd vastgesteld dat de zachte domeinen sneller degraderen dan de harde domeinen (een vaststelling die in contradictie is met de degradatie van de homopolymeren). Dit werd verklaard door een eenvoudigere penetratie van watermoleculen in de zachte gebieden. De degradatie *in vivo* overtreft op zijn beurt de degradatiesnelheid *in vitro*. De degradatie halfwaardetijd ($t_{1/2}$) van random poly(LA-co-CL) copolymeren bedraagt 135 dagen *in vivo*.

In eerste instantie is het voor ons niet interessant om het degradatiegedrag *in vitro* noch *in vivo* te onderzoeken. Daarentegen zou het degradatiegedrag onder invloed van de temperatuur een interessant gegeven zijn daar het de bedoeling is deze materialen finaal te extruderen via de 3D-Biplotter techniek voor de productie van cel-interactieve scaffolds.

Om een indicatie te krijgen van het degradatiegedrag onder invloed van de temperatuur werden van de random copolymeren, de eindgroep gemodificeerde random copolymeren, en de vernette eindgroep gemodificeerde random copolymeren TGA thermogrammen opgenomen. Een overlay van de drie verschillende types wordt weergegeven in figuur 9.4.



Figuur 9.4: TGA thermogram van de poly(D,L-LA-co- ϵ -CL) random copolymeren

Nakayama *et al.* [70] onderzochten de degradatie van multi-blok poly(L-LA-co- ϵ -CL) copolymeren, en vermeldden 250°C als de begintemperatuur van de degradatie. Uit figuur 9.4 wordt opgemerkt dat de begintemperatuur van degradatie in het geval van poly(D,L-LA-co- ϵ -CL) in dezelfde grootte-orde ligt. Voorts wordt vastgesteld dat de degradatietemperatuur van de eindgroep gemodificeerde, en de vernette random copolymeren opschuift naar hogere waarden, met de hoogste waarde voor de vernette copolymeren. De shift in degradatietemperatuur is van de grootte-orde van 100°C.

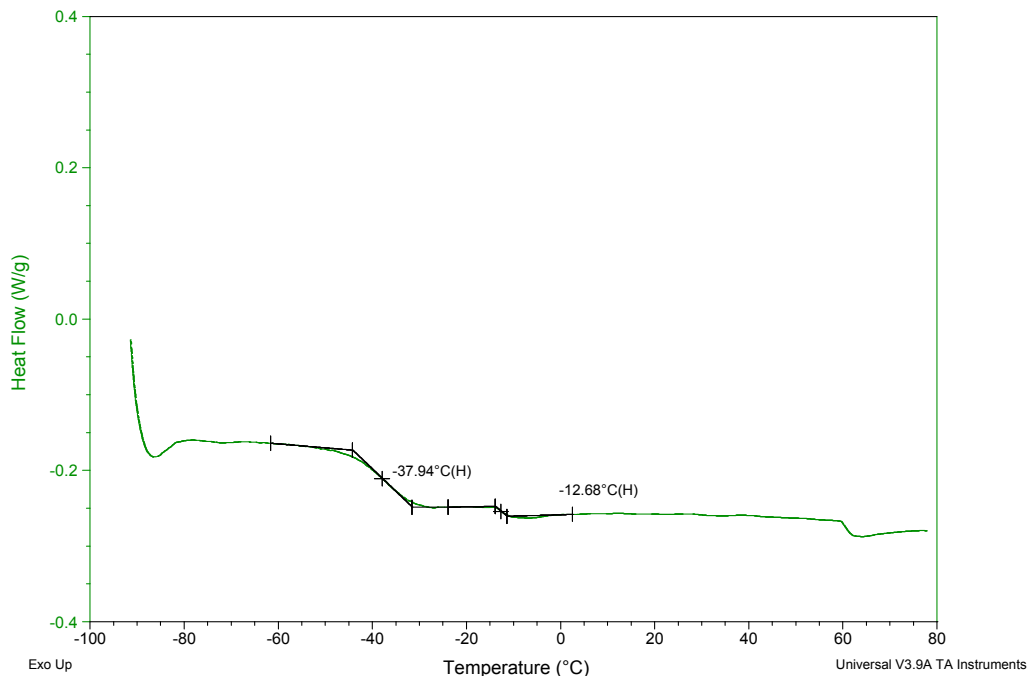
In tweede instantie is het nuttig om een idee te hebben over mogelijke resten van solvent die tijdens de opzuivering niet geheel werden verwijderd. Het is immers bekend dat solventen toxisch kunnen zijn voor cellen. Het is zichtbaar dat resten aceton en resten van initiator systeem (en triacetine als plasticizer) aanwezig zijn in de respectievelijk eindgroep gemodificeerde en vernette copolymeren. In appendix A worden enkele typisch verkregen TGA thermogrammen weergegeven, incl. hun afgeleiden naar de temperatuur. Het gewichtsverlies aan solventen bedraagt $\pm 7,9\%$ en $\pm 16,1\%$.

Uit de afgeleide TGA curves van appendix A wordt bijkomstig opgemerkt dat de degradatie in twee stappen plaatsgrijpt, cfr. de degradatie van de twee aanwezige domeinen. Het beginpunt van de degradatie van de LA en CL gebieden is gelokaliseerd bij verschillende temperaturen, doch vertonen ze een groot stuk overlapping. Door deze overlapping is het niet mogelijk de afzonderlijke degradatietemperaturen te bepalen.

9.4 Differentiële Scanning Calorimetrie

Voor de bepaling van de kristalliniteit, en de T_g 's werd DSC uitgevoerd op de drie types random copolymeren (gewone, gemodificeerde, vernette). DSC analyse van de gewone random copolymeren werd beschreven door Jeong *et al.* [55] en Baimark en Molloy [64]. Een bespreking van een DSC analyse van multi-blok copolymeren werd uitgevoerd door Cohn en Salomon [61]. De belangrijkste conclusie is deze van Jeong *et al.* die een eerste beschrijving van de hierboven beschreven fase-separatie uitwerkten. De fase-separatie vertolkte zich in de DSC thermogrammen door de aanwezigheid van twee T_g 's. Eén bij -38°C (afkomstig van PCL rijke gebieden) en één bij -11°C (afkomstig van LA rijke gebieden).

Figuur 9.5 is representatief voor de opgenomen DSC thermogrammen. De bepaling van de T_g 's gebeurt via de *halve hoogte* methode.



Figuur 9.5: DSC thermogram van een vernet random copolymeer

In tabel 9.4 worden de $T_{g,DSC}$'s afgewogen tegen de theoretische $T_{g,Fox}$'s. De berekening van de theoretisch verwachte T_g 's gebeurt aan de hand van de Fox vergelijking (9.5), met de veronderstelling dat de copolymerisatie random geschiedde.

$$\frac{1}{T_{g,Fox}} = \frac{W_{LA}}{T_{g,LA}} + \frac{W_{CL}}{T_{g,CL}} \quad (9.5)$$

Naar analogie met de literatuur werden bij de drie types copolymeren twee glastransitie temperaturen, en geen smelttemperaturen teruggevonden. Het gegeven dat geen smelttemperaturen worden weergevonden, is een bevestiging dat we niet te maken hebben met blok-copolymeren, maar voor het bekomen van een amorfe structuur. Voor de gewone en de vernette copolymeren worden gelijkaardige T_g 's geobserveerd, nl. rond de -37°C en de -12°C . Aangezien voor de homopolymeren de T_g van PCL -60°C bedraagt, en deze van PLA $+60^\circ\text{C}$, kan de waargenomen T_g van -37°C toegeschreven worden aan een fase die voornamelijk uit CL eenheden bestaat, en de T_g van -12°C aan een fase die voornamelijk is opgebouwd uit LA eenheden.

Tabel 9.4: Theoretische en geobserveerde glastransitie temperaturen

| Copolymeer | W_{CL} | W_{LA} | $T_{g,\text{Fox}} (^\circ\text{C})$ | $T_{g,\text{DSC}} (^\circ\text{C})$ | |
|--|-----------------|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| p(DL-LA-co- ϵ -CL) (n=3) | 0,58 | 0,42 | -22,01 | $-36,87 \pm 0,39$ | $-11,82 \pm 4,94$ |
| p(DL-LA-co- ϵ -CL) BMA (n=2) | 0,58 | 0,42 | -22,01 | $-42,41 \pm 0,62$ | $-15,51 \pm 4,08$ |
| vernet p(DL-LA-co- ϵ -CL) BMA (n=2) | 0,60 | 0,40 | -24,13 | $-38,49 \pm 0,77$ | $-11,7 \pm 1,39$ |

De afwijking van de T_g waarde die kan berekend worden met de Fox vergelijking voor een random copolymeer met een gekende samenstelling, bevestigt de gedeeltelijke faseseparatie van de CL en LA eenheden. Er kan worden geconcludeerd dat amorfe semi-random copolymeren werden gesynthetiseerd.

Opmerking: De bepaling van de T_g waarden gebeurde in de tweede opwarmingscyclus. Uit de thermogrammen van de eerste opwarmingscyclus werd vastgesteld dat bij de gemodificeerde copolymeren een vernetting gebeurde vanaf ruwweg 50°C , en bij de vernette copolymeren het voltooiën van de 'cross-linking'. Dit brengt met zich mee dat voor het extrusieproces temperaturen boven 50°C dienen te worden vermeden.

Hoofdstuk 10

Ontwikkeling van een geschikte Oppervlaktemodificatie

De inhoud van dit hoofdstuk is onder verwerking voor een A1 publicatie in een wetenschappelijk tijdschrift. Het hoofdstuk kan onderverdeeld worden in drie grote secties. In een eerste sectie wordt een beschrijving van de redenen weergegeven voor de ontwikkeling van een geschikte oppervlaktemodificatie. Een tweede sectie behandelt een uitgebreide kwalitatieve en kwantitatieve evaluatie van het procédé. Ten slotte wordt de oppervlaktemodificatie geëvalueerd met behulp van celculturen.

10.1 Post-plasma Grafting van AEMA op PCL Films en aansluitende Immobilisatie met GelB

PCL is een alifatisch biodegradeerbaar polyester dat reeds veelvuldig bestudeerd werd voor tissue engineering toepassingen [9, 25, 42, 47, 48, 51, 52, 58, 72, 85, 88, 92, 93, 94]. PCL heeft een glastransitie temperatuur rond de -60°C , een relatief lage smeltemperatuur rond de $+60^{\circ}\text{C}$, is bioresorbeerbaar en biocompatibel, en vertoont goede mechanische eigenschappen met het oog op botweefsel toepassingen [2, 95].

Een van de grote inherente nadelen van PCL is zijn sterk uitgesproken hydrofobe karakter. De hydrofobiciteit versterkt de niet-specifieke adsorptie van proteïnes en bijgevolg de inflammatoire respons van het lichaam. Dit uit zich in een slechte celhechting en proliferatie [52]. Teneinde deze problematiek aan te pakken kan geopteerd worden een oppervlaktemodificatie van het materiaal toe te passen voor het verbeteren van de celadhesie en de biocompatibiliteit. Verscheidene modificatietechnieken, in het concrete geval van PCL, worden weergevonden in de literatuur [52, 58, 72, 73, 85].

In hoofdstuk 4: *Oppervlaktemodificatie* werden een paar mogelijke manieren van oppervlaktemodificatie besproken. Enkele veelgebruikte methoden zijn hydrolyse, aminolyse, ozon behandeling, 'ion-beam irradiatie', UV behandeling en PSM. In dit werk wordt een 'plasma-post irradiation' grafting strategie geselecteerd teneinde de nadelen¹ van 'wet chemical' en plasma-polymerisatie methoden te omzeilen.

Veel onderzoek werd uitgevoerd naar de covalente grafting van AAc via een 'post-plasma irradiation' [51, 52, 96, 97, 98]. Enkele problemen die worden beschreven zijn de hydrolyse van

¹Verlies van mechanische sterkte en de niet-specifieke introductie van functionele groepen

polyesters als een ongewenste nevenreactie [85] en de competitie tussen de homopolymerisatie en de grafting [96]. Daarnaast introduceert de grafting van AAC negatieve ladingen (carboxyl functionaliteiten), maar bevatten de meeste proteïnes (net als de celmembraan) eveneens een negatieve lading. Het zou dus interessanter kunnen zijn om positieve ladingen te introduceren op een oppervlak. De differentiatie van hMSCs in functie van kleine functionaliteiten werd beschreven door Benoit *et al.* [44].

AEMA is een gekend methacrylaat en bevat positieve primaire amine groepen. De grafting van AEMA met als doelstelling de verbetering van ‘*anti-fouling*’ eigenschappen werd eerder opgetekend door Yu *et al.* [81]. Een recente degradatiestudie van AEMA en pAEMA demonstreerde de relatieve stabiliteit bij $\text{pH} = 7,4$ [80]. De primaire amines die worden geïntroduceerd, creëren de mogelijkheid om biomoleculen covalent/fysisch te immobiliseren. Immobilisatie van proteïnes is een algemeen gekende strategie voor het verbeteren van de biocompatibiliteit en cel viabiliteit van biomaterialen [18]. In dit werk wordt gelatine als een niet-toxisch, biodegradeerbaar, goedkoop en niet-immunogeen proteïne geselecteerd. De immobilisatie van gelatine geeft gevolg aan een betere cytocompatibiliteit [58, 85] en een verbeterde celadhesie, spreiding en proliferatie [99].

10.2 Evaluatie van de Modificatie Techniek

Een gedetailleerde beschrijving van de toegepaste oppervlaktemodificatie wordt gegeven in hoofdstuk 7: *Post-plasma Grafting van AEMA op PCL en aansluitende Immobilisatie van Biomoleculen*. Samengevat wordt een 4-staps protocol uitgevoerd op gespinoatte PCL films. Een eerste stap bestaat uit een plasmabehandeling en introductie van (hydro)peroxiden op PCL films. In stap 2 worden de (hydro)peroxiden gebruikt als initiatoren voor de UV geïnduceerde graft polymerisatie van AEMA. Het graften van AEMA laat toe om een laag GelB te adsorberen aan het PCL-AEMA oppervlak, stap 3. Gelatine is een gehydrolyseerde vorm van collageen. Indien het wordt verkregen na een zure behandeling wordt het uiteindelijke product gelatine type A genoemd. Gelatine type B is gelatine die wordt bekomen na basische behandeling van het uitgangsmateriaal. Finaal wordt in stap 4 een chemische ‘cross-linking’ tussen de primaire amines op het oppervlak, en de carboxyl groepen van het proteïne bewerkstelligd aan de hand van een carbodiimide koppeling met EDC.

10.2.1 Visuele controle van de modificatie techniek

Vooraleer een gedetailleerde evaluatie van de techniek wordt uitgevoerd, is het nuttig om een eerste indicatie te krijgen of het toegepaste protocol wel degelijk succesvol is. Deze indicatie kan verschaft worden aan de hand van eenvoudige ‘staining’ procedures. Kleuring van PCL-AEMA films met eosine demonstreerde de aanwezigheid van vrije amines op het oppervlak, en is een eerste kwalitatieve controle van het ‘post-plasma’ grafting proces. Daarnaast bevestigde kleuring van PCL-GelB films met Coomassie Brilliant Blue de aanwezigheid van GelB op de films, een kwalitatieve controle van het immobilisatie procédé. Een negatieve controle werd ingebouwd door visuele vergelijking met onbehandelde PCL films. In beide gevallen werd, na spoeling, de kleurstof afgewassen van de PCL films.

De bevestiging van het succes van het procédé verrechtvaardigt diepgaander onderzoek. In de volgende secties wordt besproken wat de invloed is van de verschillende processtappen. Zowel kwalitatieve als kwantitatieve methoden worden aangewend.

10.2.2 Bepaling van het aantal (hydro)peroxiden

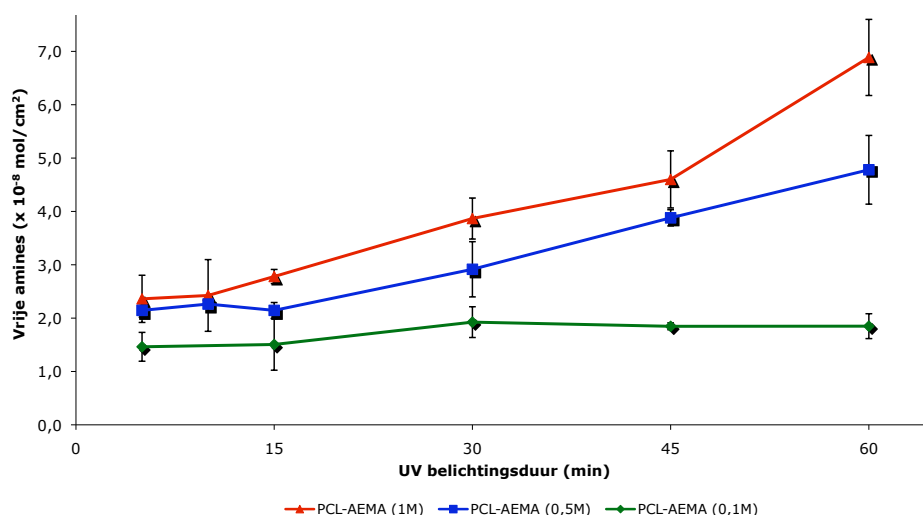
Een kwantitatieve bepaling van het aantal (hydro)peroxiden, geïntroduceerd op de PCL films door achtereenvolgens plasmabehandeling en reactie met zuurstof, is mogelijk via de reactie met DPPH. Toepassing van de DPPH methode (Boutevin *et al.* [82]) verschaft kwantitatieve informatie met betrekking tot de Ar-plasmabehandeling van PCL films. De absorbanties van 3 onbehandelde en 3 plasmabehandelde PCL films werden bepaald na reactie met DPPH bij 520 nm. Een negatieve controle werd ingebouwd door het meten van de absorbantie van de DPPH oplossing zonder sample (3x), en een positieve controle door het bepalen van de absorbantie na toevoegen van zuivere (hydro)peroxiden (3x). Er wordt verwacht dat de absorbantie bij 520 nm daalt in functie van de hoeveelheid (hydro)peroxiden.

De absorbanties die werden opgemeten waren, voor de 2 types stalen, de negatieve controle, en de positieve controle, reproduceerbaar. De positieve controle en negatieve controle geven een validatie van het protocol. Er werd vastgesteld dat de gebruikte methodiek valabel was, doch kon uit de waarden van de stalen geen correcte informatie geëxtraheerd worden. Bij herhaling werden dezelfde trends weergevonden. Het lijkt erop dat het poly(ϵ -caprolacton) (of ongekende 'boundary conditions') interraageert tijdens de reactie waardoor geen correcte informatie omtrent het aantal (hydro)peroxiden op de PCL films kan worden bekomen.

30 sec Ar-plasmabehandeling van de films werd geselecteerd. De keuze van de behandelingsduur steunt op contacthoekmetingen (zie verder).

10.2.3 Kwantitatieve bepaling van het aantal vrije amines

Het effect van enkele paramaters van het graftproces op de introductie van vrije amines op het oppervlak, werden kwantitatief onderzocht via ninhydrine assay. De invloed van de (i) de UV belichtingsduur, (ii) de monomeer (AEMA) concentratie, en (iii) de grafttemperatuur werd bestudeerd. De resultaten worden samengevat in figuur 10.1, exclusief de resultaten met betrekking tot de grafttemperatuur.

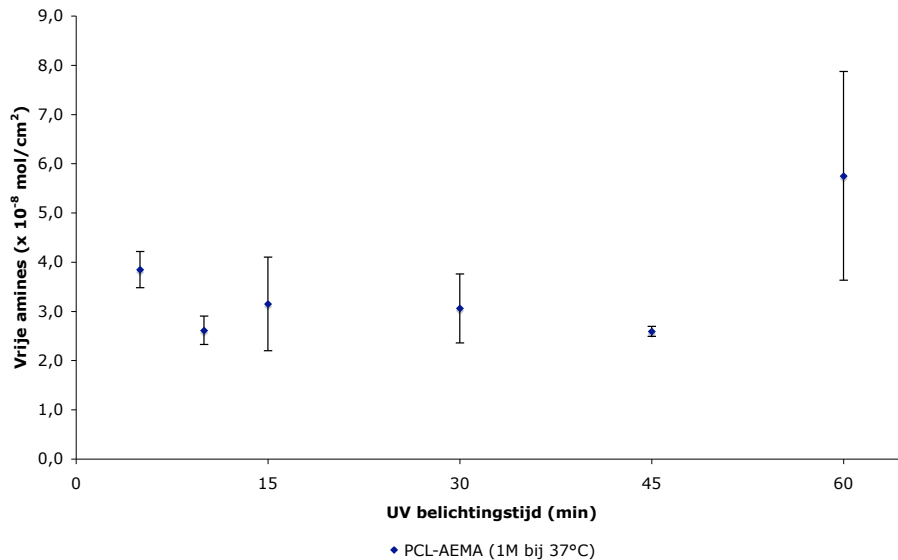


Figuur 10.1: Ninhydrine bepaling van het aantal vrije amines op PCL-AEMA films (grafting bij KT) bij verschillende UV grafttijden en variërende concentraties

Zowel kwalitatief als kwantitatief werd de aanwezigheid van vrije amines op de PCL-AEMA oppervlaktes bevestigd (figuur 10.1). Zes variaties in UV grafting tijd werden onderzocht: 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, en 60 min. De variaties in grafting tijd werden uitgevoerd voor drie variaties in de monomeer concentratie. In de 1M en 0,5M curves is een duidelijke stijging van het aantal vrije amines in functie van de grafttijd merkbaar. Daarnaast neemt bij stijgende monomeer concentraties de hoeveelheid vrije amines ook zichtbaar toe vanaf een grafttijd van 30 min. De curves uit figuur 10.1 zijn opgemeten voor grafting bij kamertemperatuur.

In figuur 10.2 wordt de curve weergegeven voor het graften van AEMA (1M) op PCL bij een grafttemperatuur van $37 \pm 2^\circ\text{C}$, in functie van de UV grafttijd. Er kan worden geconcludeerd dat graften bij een constante verhoogde temperatuur geen meerwaarde inhoud voor de procedure.

De bekomen waarden voor de concentraties aan vrije amines zijn vergelijkbaar met waarden die kunnen weergevonden worden voor aminolyse [85].



Figuur 10.2: Ninhydrine bepaling van het aantal vrije amines op PCL-AEMA films (grafting bij 37°C) als een functie van de grafttijd

Met behulp van de *student t-test* werden statistische verschillen aangetoond ($p < 0,01$), met als H_0 hypothese:

$$H_0: \text{Er is geen statistisch significant verschil tussen de gemiddelde meetwaarden van populatie } x \text{ en populatie } y$$

x en y representeren hierbij alle opgemeten absorpties gebruikt bij het berekenen van een gemiddelde waarde, of met andere woorden twee populaties van absorptiewaarden. Elk meetpunt (gemiddelde waarden uit de curves) is een weergave van ten minste 3 metingen. De curve van 1M uit figuur 10.1 bestaat uit meetpunten uitgevoerd in duplo voor het aantonen van de statistische reproduceerbaarheid van de meetprocedure.

Tabellen met betrekking tot statistische berekeningen worden in appendix B verschaft. Drie types statistiek werden uitgevoerd. Een korte bespreking met de belangrijkste conclusies is hieronder weergegeven:

1. In een eerste reeks statistische berekeningen wordt de reproduceerbaarheid van de gebruikte methode nagegaan. Hiertoe werd eenzelfde curve in duplo opgesteld en data van beide curves werden aan de student t-test onderworpen. De reproduceerbaarheid van de ninhydrine methode kon worden aangetoond op een significantieniveau $\alpha = 0,01$.
2. Het tweede type statistische verwerking heeft betrekking op het aantonen van significante verschillen tussen de onderlinge meetpunten van eenzelfde curve. Om statistische uitspraken te kunnen doen over een bepaald meetpunt (of meetpunten), dient eerst en vooral aangetoond te worden dat er een significant verschil is tussen een blanco waarde en dat meetpunt. De blanco waarde is technisch gezien de detectielimiet van de methode. Er werd vastgesteld dat de eerste meetpunten uit de curves van 0,5M en 0,1M statistisch heel dicht naderen tot de detectielimiet. Komt daarbij dat aangetoond werd dat geen significante verschillen zichtbaar zijn tussen alle onderlinge meetpunten in de curve 0,1M. Omwille van deze reden werd deze laagste monomeer concentratie niet verder onderzocht. De curves van 0,5M en 1M stijgen bij toenemende graftijd. Dit is statistisch aantoonbaar. Een kleine opmerking: voor de 1M curve is tussen de waarden bij 5 min, 10 min en 15 min geen significant verschil aantoonbaar, voor de curve 0,5M komt daar het punt bij 30 min bij. Deze bevindingen kunnen erop wijzen dat bij een bepaalde graft concentratie een zekere incubatieperiode nodig is.
3. Ter vervollediging werden ook student t-testen uitgevoerd tussen de onderlinge meetpunten van de verschillende curves. Daaruit bleek dat curve 1M zich het duidelijkst onderscheidt van beide andere curves.

10.2.4 Evolutie van de bevochtigbaarheid

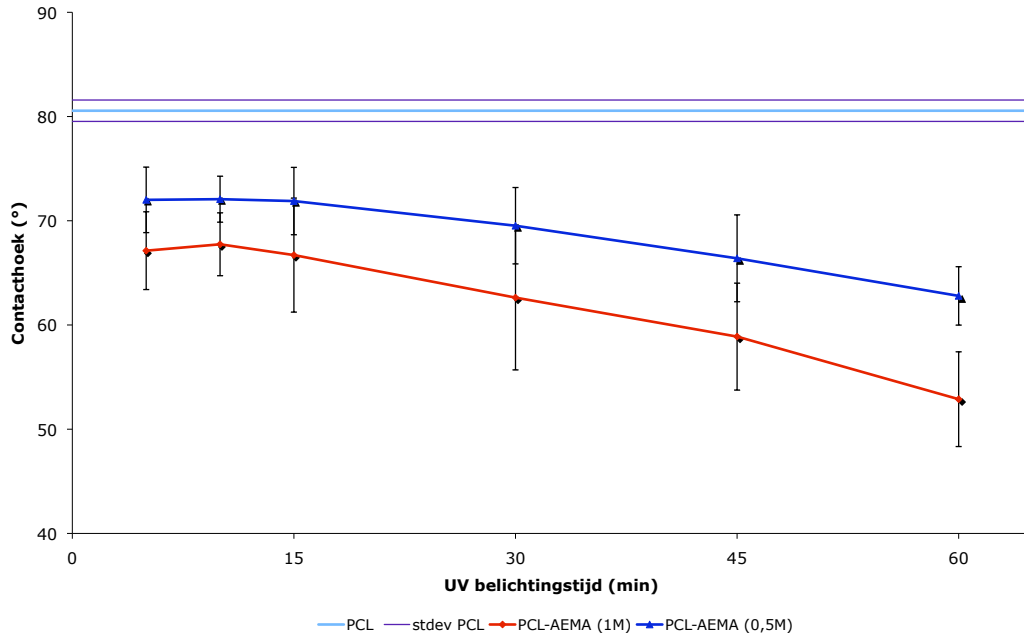
In de voorafgaande studie werden de contacthoeken van PCL films na verschillende behandelingstijden met Ar-plasma bepaald [62]. Hierin werd de contacthoek opgemeten in functie van de plasmabehandeling. De resultaten uit deze reeks statische contacthoekmetingen (SCA) demonstreerden een efficiënte bevochtiging, om een goed contact met de waterige monomeer oplossing te kunnen garanderen, van de PCL films na 30 sec plasmabehandeling.

In een tweede serie metingen werd de invloed van het grafting- en immobilisatie proces op de bevochtigbaarheid nagegaan. De UV graftijden werden gevarieerd tussen 5 min en 60 min, voor 2 monomeer concentraties (1M en 0,5M). Analooq als bij de ninhydrine metingen werd een extra curve opgesteld van een 1M reeks bij een grafttemperatuur van $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Op elk staal werden 3 metingen uitgevoerd, per serie werden 2 stalen gemeten. De 1M serie werd in duplo uitgevoerd. Per meetpunt werden dus 6 waarden (voor de 1M curve 12 waarden) opgetekend.

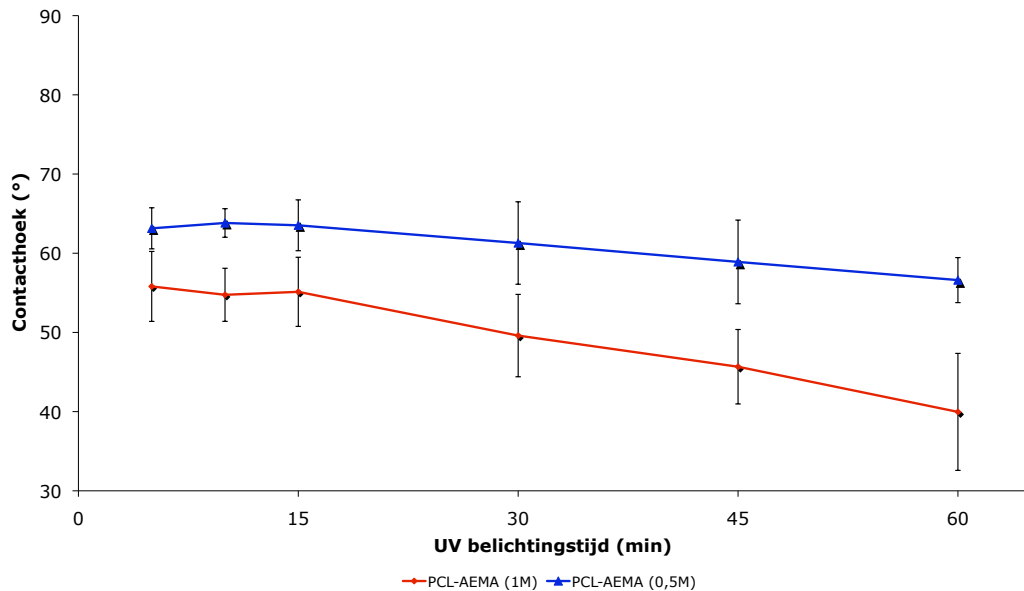
De berekening van de contacthoek gebeurde software-matig, via de Laplace-Young fitting, aan de hand van de opgenomen filmpjes. Voor de verwerking werden de waarden over de eerste 5 sec uitgemiddeld, en eveneens werden de waarden na 30 sec opgetekend.

Een negatieve controle werd ingebouwd onder de vorm van onbehandelde PCL films, en een positieve controle onder de vorm van zuivere GelB films. De zuivere GelB films werden

verkregen door spincoaten vanuit een 5 % w/w oplossing. In figuren 10.3 en 10.4 worden de resultaten voor respectievelijk uitmiddeling over 5 sec en de waarde na 30 sec weergegeven voor graften bij kamertemperatuur.



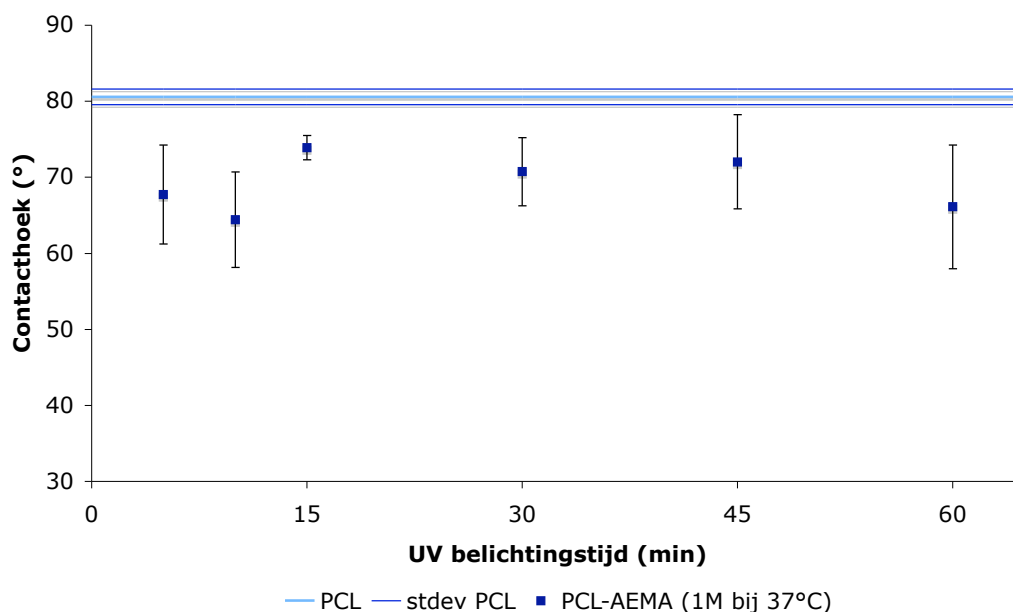
Figuur 10.3: Statistische contacthoekmeting van PCL-AEMA films (uitmiddeling over eerste 5 sec) in functie van variërende grafftijden en monomeer concentraties



Figuur 10.4: Statistische contacthoekmetingen na 30 sec in functie van variërende grafftijden en monomeer concentraties

Een statistische studie, analoog aan deze toegepast op de ninhydrine metingen werd uitgevoerd op de meetwaarden. Tabellen met betrekking tot de statistiek worden weergevonden in appendix C. De reproduceerbaarheid van de methode ($p < 0,01$) werd aangetoond voor de curve PCL-AEMA 1M (uitmiddeling over de eerste 5 sec). De aanwezigheid van pAEMA op de PCL films doet de contacthoek significant ($p < 0,01$) dalen in vergelijking met de gemiddelde waarde van onbehandelde PCL films. De contacthoek voor onbehandelde PCL films bedraagt $81^\circ \pm 1^\circ$. De bevochtigbaarheid kan gecontroleerd worden door variatie van de graftijd en de monomeer concentratie. Opnieuw was geen significant verschil aantoonbaar tussen 5 min, 10 min en 15 min graftijd bij de 1M reeks. Bij de 0,5M reeks kwam daar het punt 30 min bij. Voor beide concentraties was het verschil voor langere graftijden wel significant verschillend. De hoogste bevochtigbaarheid werd gevonden bij 60 min graften met een 1M AEMA oplossing, en bedroeg $53^\circ \pm 5^\circ$. Na 30 sec daalde die waarde tot $40^\circ \pm 7^\circ$. Dit wijst erop dat de bevochtigbaarheid van het oppervlak, op een gecontroleerde wijze, permanent werd verbeterd. De verschillen tussen de contacthoeken van onderlinge reeksen was eveneens statistisch significant.

In figuur 10.5 wordt de curve weergegeven voor het graften bij een constante verhoogde temperatuur. Analoog aan figuur 10.2 zijn de resultaten niet reproduceerbaar en draagt het graften bij een verhoogde temperatuur niet bij tot het verbeteren van de bevochtigbaarheid.



Figuur 10.5: Statistische contacthoekmetingen van PCL-AEMA films (1M, grafting bij 37°C) in functie van de graftijd

Deze resultaten bevestigen de resultaten van de ninhydrine experimenten. Hoe meer vrije amines op het oppervlak, hoe hydrofieler het oppervlak wordt, hoe beter de bevochtigbaarheid en bijgevolg hoe lager de contacthoek. SCA en ninhydrine experimenten wijzen erop dat het waarschijnlijk is dat voor het *grafting-vanaf* een oppervlak een zekere incubatieperiode noodzakelijk is. Twee mogelijke verklaringen zouden kunnen zijn: (i) initiatie van (hydro)peroxiden neemt een zekere tijd in beslag, en; (ii) mogelijk een diffusie gelimiteerd proces.

Wanneer GelB werd geïmmobiliseerd, werd vastgesteld dat statistisch niet te onderscheiden waarden werden bekomen. Met andere woorden, er wordt één gemiddelde waarde bekomen voor alle grafttijden, nl. $36^\circ \pm 7^\circ$ ($n = 36$). Deze waarde is een uitgemiddelde waarde over de eerste 5 sec. Dat eenzelfde waarde wordt bekomen voor alle films impliceert de aanwezigheid van een oppervlaktelaag met een gelijkaardige chemische samenstelling. Een positief gegeven aangezien dit erop wijst dat immobilisatie van gelB op alle films succesvol is, ongeacht de grafttijd. Immobilisatie van het proteïne verhoogt de bevochtigbaarheid van de PCL films verder. Een positieve controle voor de immobilisatie gebeurde door de bepaling van de contacthoek van zuivere GelB films. De contacthoek die werd bekomen bij zuivere GelB films bedroeg $42^\circ \pm 4^\circ$, en valt binnen de range van de waarde voor PCL-GelB films.

Zhu *et al.* [63] rapporteerde contacthoekwaarden bekomen voor p(L-LA-co- ϵ -CL). Een contacthoek van $83,4^\circ \pm 1,1^\circ$ werd bekomen voor het gewone copolymeer. Deze waarde is analoog aan onze waarde voor onbehandeld PCL. Aminolyse van het oppervlak liet de contacthoek in geringe mate dalen tot $78,5^\circ \pm 1,4^\circ$, en immobilisatie met fibronectine/collageen zette de daling verder tot $66,5^\circ \pm 2,3^\circ/69,2^\circ \pm 1,3^\circ$. Met behulp van onze methodiek daalt de contacthoek drastischer in vergelijking met de methodiek gehanteerd door Zhu *et al.* Cheng en Teoh [52] voerden contacthoekmetingen uit op PCL, PCL-AAc en PCL-Col films. De geobserveerde waarden zijn vergelijkbaar met de waarden die wij bekomen. Gelijkaardige resultaten worden eveneens teruggevonden in de literatuur voor de contacthoeken van PCL, en PCL-PMMA films [58]. Er wordt met andere woorden vastgesteld dat de gebruikte methodiek evenwaardig is met betrekking tot het verlagen van de contacthoekwaarden.

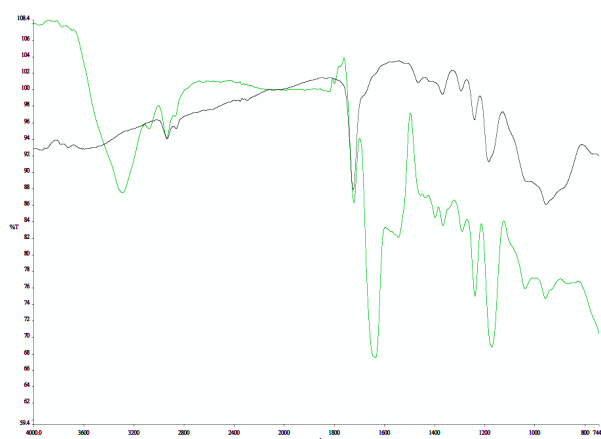
10.2.5 Morfologie van de films

Nu min of meer het effect gekend is van het post-plasma grafting proces op de bevochtigbaarheid enerzijds, anderzijds op de hoeveelheid vrije amines die worden geïntroduceerd op de oppervlakken, is het nuttig de morfologie van de films te bestuderen. Vragen die ons interesseren zijn: Wat is het effect van de ‘grafting-from’ procedure op de samenstelling van de films? Wat is de grootte van de gegrafte pAEMA clusters? Hoe is hun spreiding over het oppervlak? Is de proteïnelaag homogeen? Wat zijn de diktes van de lagen?

Deze sectie focusteert zich op PCL, PCL-AEMA (1M graftoplossing) en PCL-GelB films.

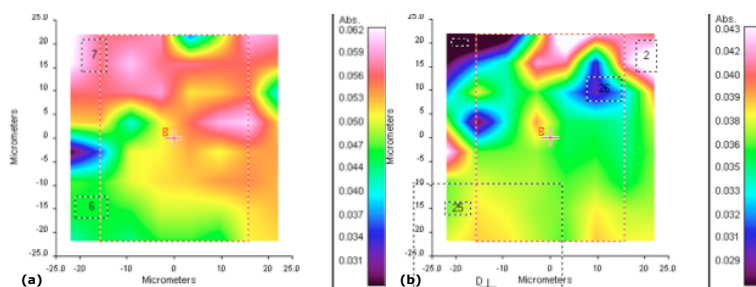
De samenstelling van de toplaag van de films werd bestudeerd met behulp van FT-IR, FT-IR mapping, en XPS. Via FT-IR werden de functionele groepen, aanwezig op het oppervlak, bestudeerd. Figuur 10.6 geeft de spectra van een onbehandelde PCL film, PCL-AEMA film en PCL-GelB film. De carboxyl functionele groep van het polyester PCL is bij de drie types films duidelijk zichtbaar bij 1725 cm^{-1} . De aanwezigheid van pAEMA in de PCL-AEMA films liet geen nieuwe absorpties waarnemen. Het is meer dan waarschijnlijk dat de hoeveelheid gegraft materiaal te klein is om gedetecteerd te kunnen worden ten opzichte van de PCL achtergrond, rekening houdende met het feit dat FT-IR een penetratiediepte van in de grootte-orde van $100\ \mu\text{m}$ heeft. Daarnaast zullen sommige signalen van het pAEMA overlappen met de signalen van het PCL, cfr. carboxyl functionaliteiten. In het spectrum van de PCL-GelB film worden nieuwe absorpties geobserveerd bij 1545 cm^{-1} en 1630 cm^{-1} . Deze zijn te wijten aan de amidebindingen in het proteïne. Immobilisatie van GelB vanuit een 1 mg/ml oplossing was niet detecteerbaar, vandaar dat werd geopteerd voor immobilisatie vanuit een hogere concentratie (i.e. 4 mg/ml), dewelke wel zichtbaar werd in de IR spectra

(figuur 10.6). In de overlay van de IR spectra wordt het spectrum van PCL en PCL-AEMA films door één en hetzelfde spectrum weergegeven. Dit teneinde het overzicht goed te kunnen bewaren, met in acht name dat geen fundamentele verschillen tussen beide spectra zichtbaar waren.



Figuur 10.6: Overlay van de IR spectra van PCL (zwart) en PCL-GelB (groen) films

FT-IR mapping (figuur 10.7) toonde de aanwezigheid van de piek bij 1725 cm^{-1} voor het complete geobserveerde oppervlak (links). De PCL-AEMA film vertoonde geen merkbaar duidelijke verschillen met de onbehandelde PCL films. De pieken bij 1545 cm^{-1} en 1630 cm^{-1} , die verschijnen bij de PCL-GelB films, waren eveneens aanwezig over het gehele geanalyseerde oppervlak (rechts).

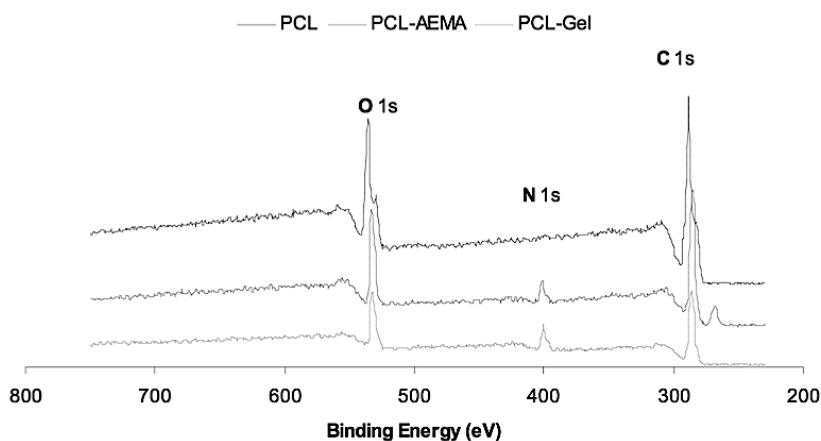


Figuur 10.7: FT-IR mapping van (links) PCL (1725 cm^{-1}) en (rechts) PCL-GelB (1545 cm^{-1}) films

Met behulp van XPS werd de atomaire samenstelling van de films bestudeerd. De XPS spectra van PCL, PCL-AEMA en PCL-GelB films wordt voorgesteld in figuur 10.8. Een graftijd van 60 min werd geselecteerd, met een monomeer concentratie van 1M. In het spectrum van de PCL films is de aanwezigheid van koolstof en zuurstof zichtbaar. Een nieuwe piek bij 400 eV doet zijn intrede in de spectra van de PCL-AEMA en PCL-GelB films. Deze piek kan worden toegekend aan de N 1s elektronen. Doordat XPS de samenstelling kan opmeten van de bovenste 5-10 nm van de oppervlaktelaag, is het mogelijk om een N 1s piek te detecteren na

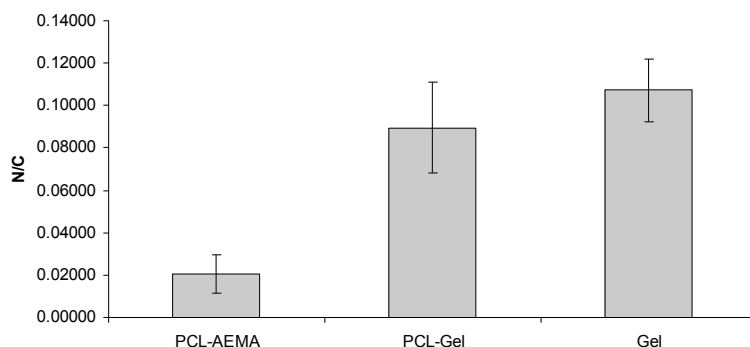
het graften van AEMA. De detectie van deze piek bevestigt de covalente binding van AEMA op het substraat (PCL).

Teneinde de spoelprocedure te evalueren werden 3 verschillende blanco's onderzocht met XPS. De blanco's waren: Ar-plasma behandelde PCL films; Ar-plasma, 60 min geïncubeerd in water en met UV licht behandelde PCL films, en; Ar-plasma, 60 min in een 1M AEMA oplossing zonder UV licht behandelde PCL films. Bij geen enkel van de vermelde blanco films was een N 1s piek zichtbaar bij 400 eV. Dit leidt tot de conclusie dat de spoelprocedure niet gegrift AEMA verwijderd, en het geobserveerde N 1s signaal afkomstig is van covalent gebonden pAEMA.



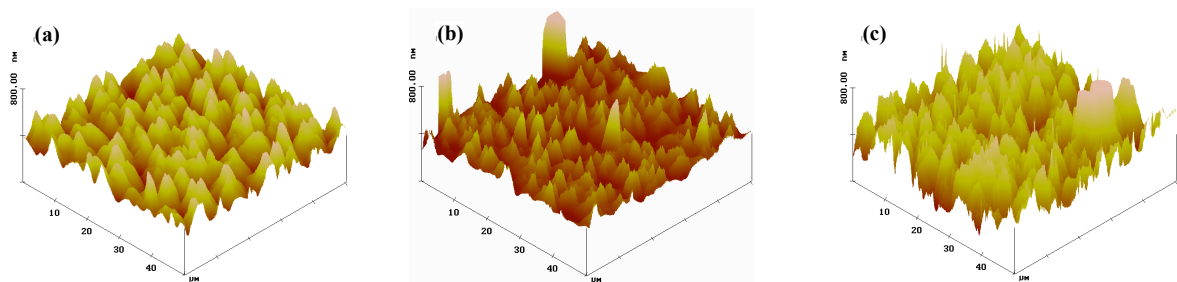
Figuur 10.8: XPS spectra van PCL, PCL-AEMA en PCL-GelB films

Het histogram uit figuur 10.9 demonstreert echter het verschil tussen de PCL-AEMA en PCL-GelB films aan de hand van de N/C verhoudingen. De N/C verhouding voor de PCL-GelB films is merkbaar groter dan voor de PCL-AEMA films, en neigt meer naar de N/C verhouding van zuivere GelB films (experimenteel = 0,0968). Deze vaststelling zou impliceren dat de PCL film homogeen wordt bedekt door een GelB laagje. (Dit wordt bevestigd door CFM en SEM (zie verder) onderzoek naar de morfologie van de films)

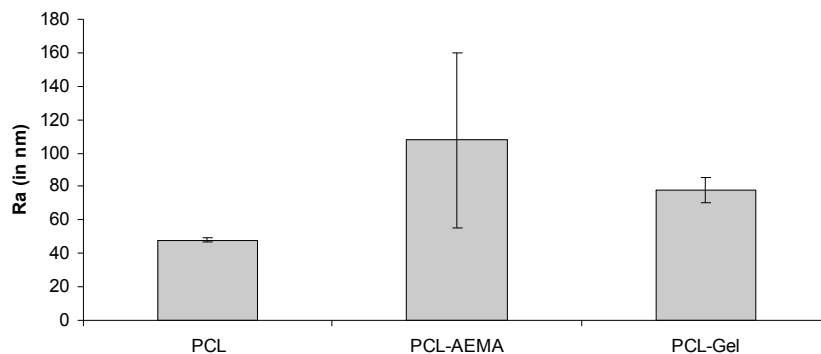


Figuur 10.9: N/C verhoudingen van PCL-AEMA, PCL-GelB en GelB films, bepaald via XPS

Topografische veranderingen, onder invloed van de modificatie techniek, van de films werden eerst en vooral onderzocht via AFM. AFM metingen toonden duidelijk de sferische kristallen van de onbehandelde PCL oppervlakten (figuur 10.10 (a)). Na grafting werden enkele clusters geobserveerd, gepaard gaande met een grotere oppervlakteruwheid (figuur 10.11). Drie stalen werden opgemeten voor en na grafting met een 1M AEMA oplossing en 60 min UV grafting. De oppervlakteruwheid van de ge-grafte stalen (figuur 10.10 (b)) vertoonde een grote standaardafwijking, omwille van de afhankelijkheid van hoeveel, de grootte, en de plaats van de clusters die werden geobserveerd. Dit verklaart de grote standaardafwijking op de gemiddelde waarden van de Ra na grafting (figuur 10.11). Deze vaststellingen wijzen erop dat de ge-grafte polymeren een grote polydispersiteit bezitten, wat wordt verwacht voor een vrije radicalaire graft polymerisatie. Het is waarschijnlijk dat de langere pAEMA ketens de neiging hebben om op te lossen met kleine waterhoeveelheden uit de lucht (of niet volledig verwijderd water van de procedure zelf). Zodoende worden hydrofiele clusters gevormd op het hydrofobe PCL substraat. Dit model is gekend uit de literatuur [100], waarin wordt geopperd dat grafting-vanaf strategieën (gebaseerd op een vrije radicalaire polymerisatie) meer in een ‘*semi-dilute regime*’ doorgaan. Na immobilisatie van GelB werd een gelijkaardig profiel verkregen als deze van de ge-grafte samples (figuur 10.10 (c)), doch werd een afname in de oppervlakteruwheid en standaardafwijking tussen de verschillende stalen weergevonden. Deze bevinding staft de hypothese van een homogene proteïnelaag op de oppervlaktes.



Figuur 10.10: Topografisch beeld van PCL (a), PCL-AEMA (b), en PCL-GelB (c) films



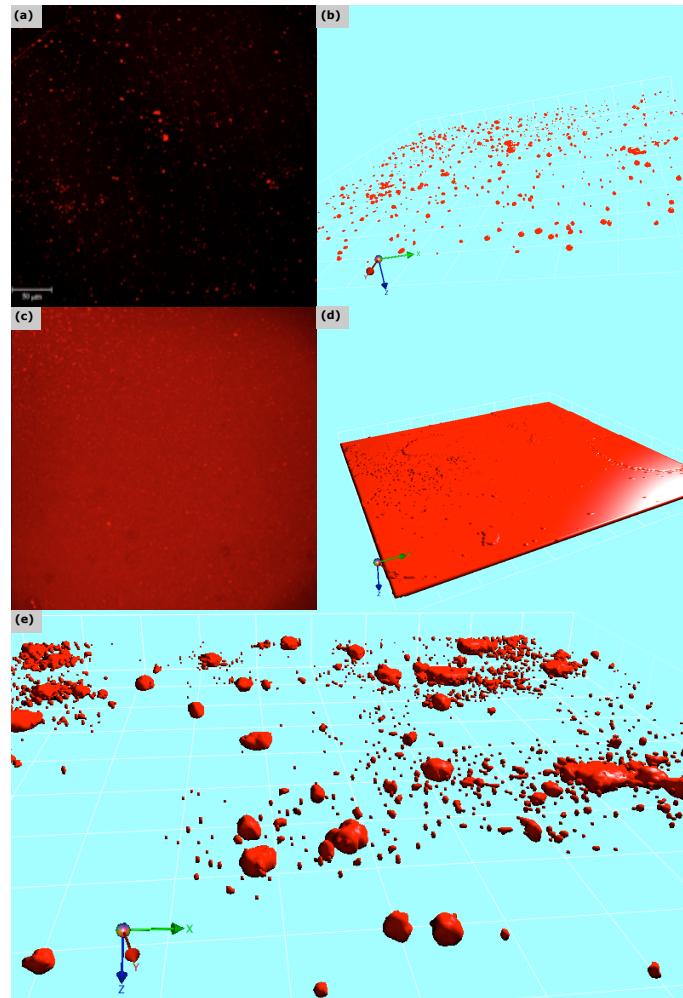
Figuur 10.11: Oppervlakteruwheid Ra (in nm) van PCL , PCL-AEMA, en PCL-GelB films

Nadelen van AFM zijn dat twee verschillende beelden nooit met identiek ingestelde parameters kunnen worden opgenomen, de substraten liefst perfect vlak worden geplaatst voor analyse, en dat een hoogteverschil een vervorming van het beeld kan teweegbrengen indien dit hoogteverschil bepaalde afmetingen bereikt. Vanuit deze perspectieven is het eenvoudiger reproduceerbare resultaten te bekomen met behulp van confocale fluorescentie microscopie (CFM). PCL, PCL-AEMA (5 min UV grafting), PCL-AEMA (30 min UV grafting), PCL-AEMA (60 min UV grafting), fysisch geïmmobiliseerde GelB op PCL, en covalent geïmmobiliseerde GelB op PCL films werden geanalyseerd met behulp van CFM, na kleuring van de primaire amine groepen met Alexa Fluor 546. Onbehandelde PCL films vertoonden geen affiniteit voor de kleurstof. Beelden van gegrachte stalen demonstreerden de aanwezigheid van clusters vrije amines op de oppervlaktes (figuur 10.12 (a,b)). Deze observatie werd gemaakt bij alle beeldopnames van gegrachte ‘samples’. In het geval van geïmmobiliseerde films werd naast de aanwezigheid van heldere clusters, een homogene gekleurde waas teruggevonden in de beelden (figuur 10.12 (c, d)). De homogene waas bedekte de gehele oppervlakte. Het gelatine vertoonde geen globulaire structuur, maar eerder een homogene ‘sheet-like’ structuur. De homogene bedekking impliceert onrechtstreeks dat eventueel een tweede proteïne homogeen op de oppervlakte kan worden geïmmobiliseerd (zie celculturen). Gedipcoatte PCL-AEMA films (60 min UV grafting) in een 1 mg/ml gelatine oplossing werden ook geanalyseerd (figuur 10.12 (e)). Er werd geconcludeerd dat fysische adsorptie van GelB geen confluentes homogene proteïne bedekking oplevert. Eerder wordt een globulaire structuur van het proteïne geobserveerd die minder goed adsorbeert of gemakkelijker wordt afgespoeld. Dit resultaat wordt bevestigd door de SPR metingen (zie verder).

De observaties met CFM zijn in overeenstemming met AFM analyses. CFM bevestigt dat de weergevonden clusters uit AFM vrije amines bevatten, en dus te wijten zijn aan gegracht pAEMA. Het is belangrijk om zich niet blind te staren op de zichtbare heldere spots. Het is immers goed mogelijk dat kleinere spots niet gedetecteerd worden omdat het signaal zich onder de detectielimiet van de CFM bevindt.

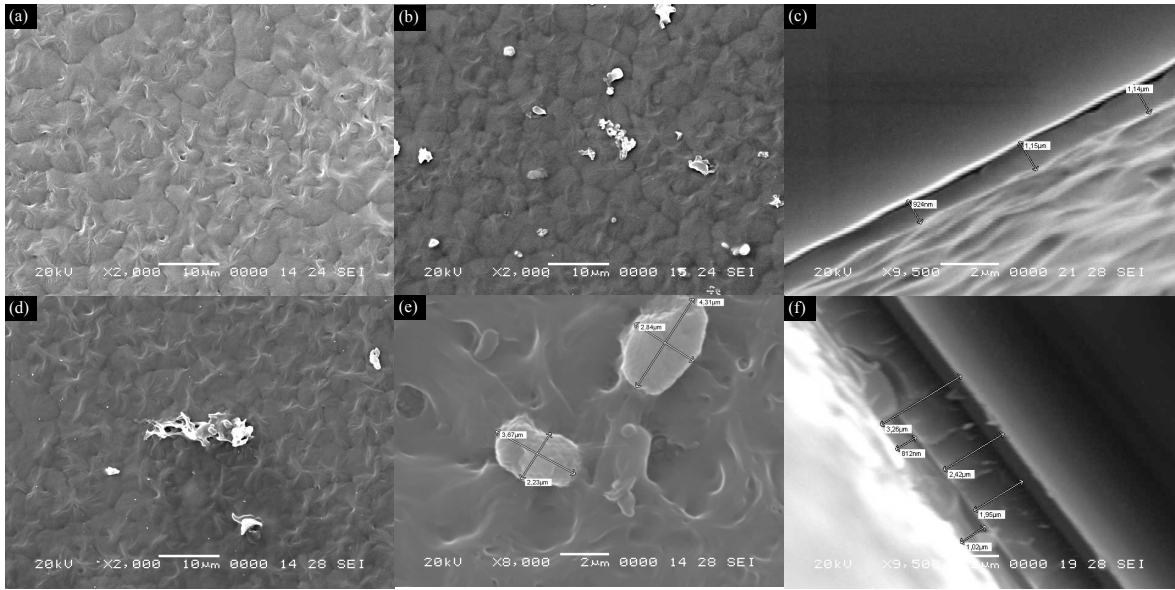
De waargenomen spots werden geteld en statistisch onderzocht (appendix D). Uit de resultaten blijkt dat langere grafftijden geen verhoging van het aantal spots induceert, maar wel de sterkte van het gemiddelde signaal van de spots. Of met andere woorden het aantal vrije amines per spot verhoogt. Informatie met betrekking tot de perimeter van de spots leert ons dat de diameter van de clusters bij langere grafftijden toeneemt, hoewel meer dan de helft van de clusters geen significante toename van de diameter ondervindt (vergelijking tussen 5 min grafting en 60 min grafting). Indien de diameter van de clusters wordt berekend, uitgaande van circulaire clusters, zou deze 0,96 μm bedragen voor de meeste clusters.

Uit de resultaten van CFM, de SCA metingen, en de ninhydrine metingen, wordt afgeleid dat de plasmabehandeling hoogst waarschijnlijk de densiteit aan clusters controleert via de introductie van (hydro)peroxiden. De ‘post-plasma UV irradiation grafting’ beïnvloedt op zijn beurt de grootte van de gegrachte pAEMA ketens op de PCL films. Dit betekent dat bij kleinere grafftijden diffusie limitatie aan de interfase een belangrijk gegeven is. Bij langere grafftijden wordt een diffusie gelimiteerd proces irrelevant, daar de ketens meer en meer in de oplossing zelf zullen groeien.



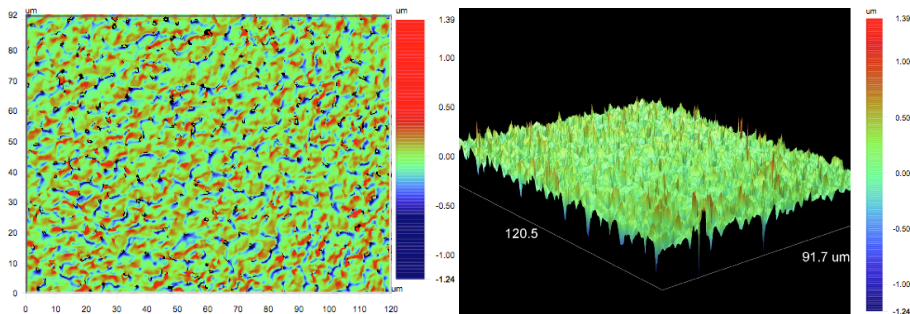
Figuur 10.12: CFM opnamen van PCL-AEMA ruw (a) en verwerkt (b), PCL-GelB ruw (c) en verwerkt (d), en PCL-GelB gedipcoatte (e) films

SEM beelden werden opgenomen van PCL (figuur 10.13 (a)) films, PCL-AEMA (60 min grafting; figuur 10.13 (b,c)) films, en PCL-GelB (figuur 10.13 (d,e,f)) films. Beeldopname van de onbehandelde PCL films is in goede overeenstemming met de AFM metingen. Er worden kristallijne domeinen gevisualiseerd, in afwezigheid van clusters. Analoog aan CFM werden clusters geobserveerd na grafting van PCL films. De clusters hebben een soort ‘mushroom-like’ vorm, die in overeenstemming is met de vorm van ge-grafte polymeren bekomen via een ‘post irradiation’ vrije radicaal grafting [100]. Aanhechting van de clusters kan eveneens worden waargenomen. Door de CFM analyse is geweten dat de geobserveerde clusters geen contaminatie van het oppervlak zijn. Opmeting van de diameter van een dergelijke cluster (10.13 (c)) geeft ons de waarde $1 \mu m$, een bevestiging van de waarde bekomen via CFM. De doorsnede van een, met GelB, geïmmobiliseerde film, leert ons dat de dikte van de GelB laag rond de $1 \mu m$ bedraagt, en de PCL laag rond de $1,5 - 2 \mu m$. De clusters blijven zichtbaar na immobilisatie van GelB. Door ‘cross-linking’ van de gelatine wordt een confluyente laag met een lage densiteit bekomen (combinatie van de resultaten uit SEM en CFM).



Figuur 10.13: SEM opnamen van PCL topview (a), PCL-AEMA met 60 min grafttijd topview (b), PCL-AEMA met 60 min grafttijd doorsnede (c), PCL-GelB cluster detail topview (d,e), en PCL-GelB doorsnede (f)

De resultaten behaald met AFM, CFM en SEM zijn complementair en bevestigen elkaar. Deze technieken zijn jammer genoeg tijdrovend en/of kostelijk. Profielmetrie is echter een techniek die noch duur, noch tijdrovend is. Deze techniek is geen conventionele techniek die wordt gebruikt voor dit soort toepassingen, maar kan een interessante aanvulling zijn van de bekomen resultaten. Eén staal werd geanalyseerd met behulp van profielmetrie (PCL-GelB film met een grafttijd van 10 min). Het opgemeten 3D-beeld wordt weergegeven in figuur 10.13 (rechts). De PCL laag met de gefrapte pAEMA clusters was zichtbaar, daarentegen kon de gelatine laag niet worden gevisualiseerd. Wellicht is het verschil in brekingsindex tussen het PCL en de gelatine niet groot genoeg om beide lagen afzonderlijk te kunnen opmeten. Het beeld van de clusters is analoog aan de beelden opgenomen met de conventionele technieken, en de opgemeten oppervlakteruwheid ligt in de grootte-orde van deze bepaald via AFM.



Figuur 10.14: Analyse van een PCL-AEMA film met behulp van profielmetrie: topview (links) en 3D-beeld (rechts). De beelden zijn opgenomen met een vergroting van 50x

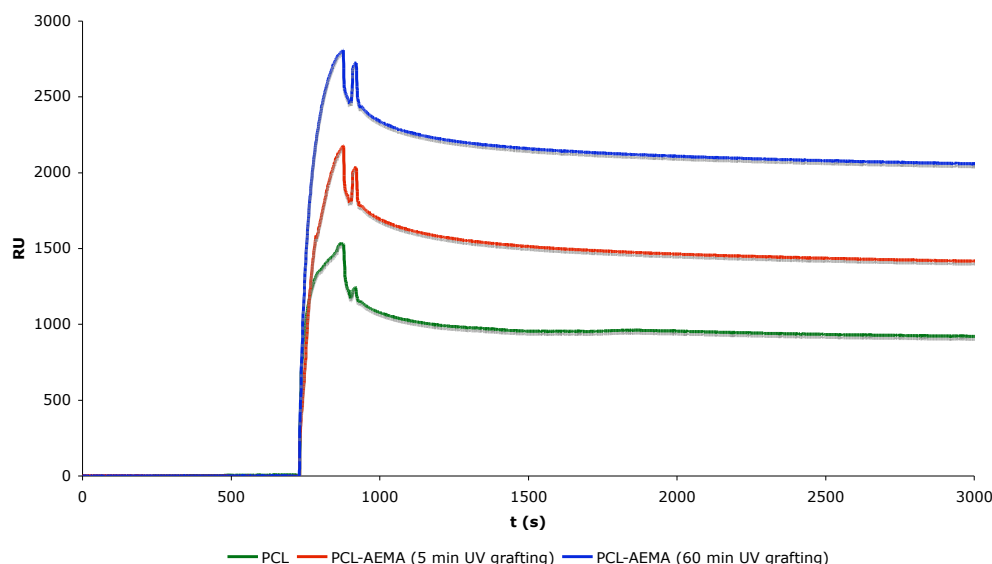
10.2.6 Kwalitatieve bepaling van de proteïne-affiniteit

Een kwalitatieve indicatie van de affiniteit van proteïnes voor PCL, PCL-AEMA en PCL-Ar films werd onderzocht met behulp van SPR. De affiniteit werd geanalyseerd voor de proteïnes laminine (Ln), fibronectine (Fn), GelB, en GelMOD. De invloed van de graftprocedure werd nagegaan door vergelijking van onbehandelde PCL films (~ negatieve controle) met PCL-AEMA films (5 min en 60 min UV grafting). De invloed van 30 sec plasma op de affiniteit voor GelB werd eveneens onderzocht. In tabel 10.1 worden de opgemeten RU waarden weergegeven.

Tabel 10.1: RU waarden bepaald via SPR

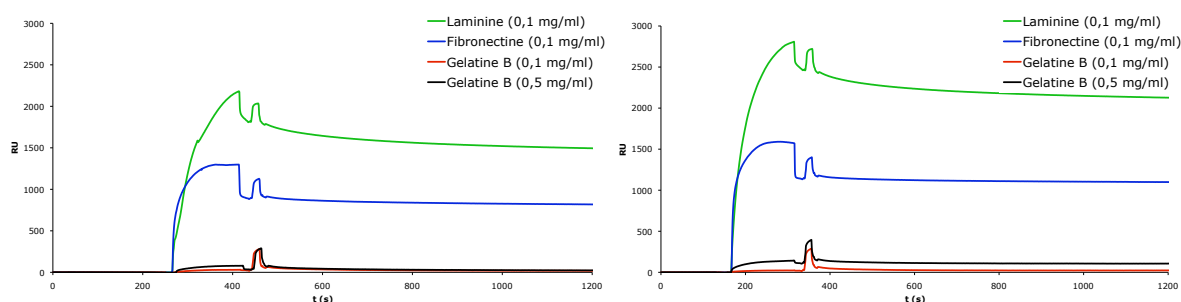
| | Gel B | | GelMOD | Fn | Ln |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 0,5 mg/ml | 0,1 mg/ml | 0,1 mg/ml | 0,1 mg/ml | 0,1 mg/ml |
| PCL | 42 | 21 | NA | 313 | 872 |
| | 60 | 19 | NA | 419 | 897 |
| PCL-Ar | 418 | NA | NA | NA | NA |
| | 425 | NA | NA | NA | NA |
| PCL AEMA 5min UV | 43 | 43 | 6 | 809 | 1405 |
| | 33 | NA | 10 | 1129 | NA |
| PCL AEMA 60 min UV | 108 | 33 | 21 | 1093 | 2158 |
| | 79 | NA | NA | 894 | 956 |

Uit de tabel blijkt dat de grootste affiniteit wordt vastgesteld voor laminine. Daarnaast kunnen ook stijgende affiniteiten bij stijgende grafftijden worden waargenomen. In vergelijking met de affiniteit van de oppervlaktes voor laminine en fibronectine, is de affiniteit voor GelB en GelMOD verwaarloosbaar. De affiniteit voor GelMOD wordt niet verder besproken. De invloeden zijn echter duidelijker zichtbaar indien ze visueel worden weergegeven aan de hand van grafieken. In figuur 10.15 wordt de affiniteit van verschillende oppervlakken voor het proteïne laminine afgebeeld.



Figuur 10.15: Sensogram voor 0,1 mg/ml laminine op PCL, PCL-AEMA (5 min grafftijd) en PCL-AEMA (10 min grafftijd)

In de figuur is duidelijk zichtbaar dat een grafting van 60 min een quasi verdubbeling van de affiniteit, in termen van RU, teweegbrengt ten opzichte van onbehandelde films. Een minimale grafttijd van 5 min veroorzaakt reeds een stijging van de affiniteit die ongeveer halweg tussen deze van gewone PCL films en 60 min gegrafte PCL-AEMA films is gesitueerd. Analoge figuren voor de andere proteïnes zijn weer te vinden in appendix E. Opmerkelijk is de vaststelling dat gelatine slecht adsorbeert op de oppervlakken en gemakkelijk wordt afgespoeld. In figuur 10.16 wordt nagegaan wat de affiniteit van de drie proteïnes is voor PCL-AEMA films.



Figuur 10.16: Proteïne affiniteiten voor: (links) PCL-AEMA films met 5 min UV grafting, en; (rechts) PCL-AEMA films met 60 min UV grafting

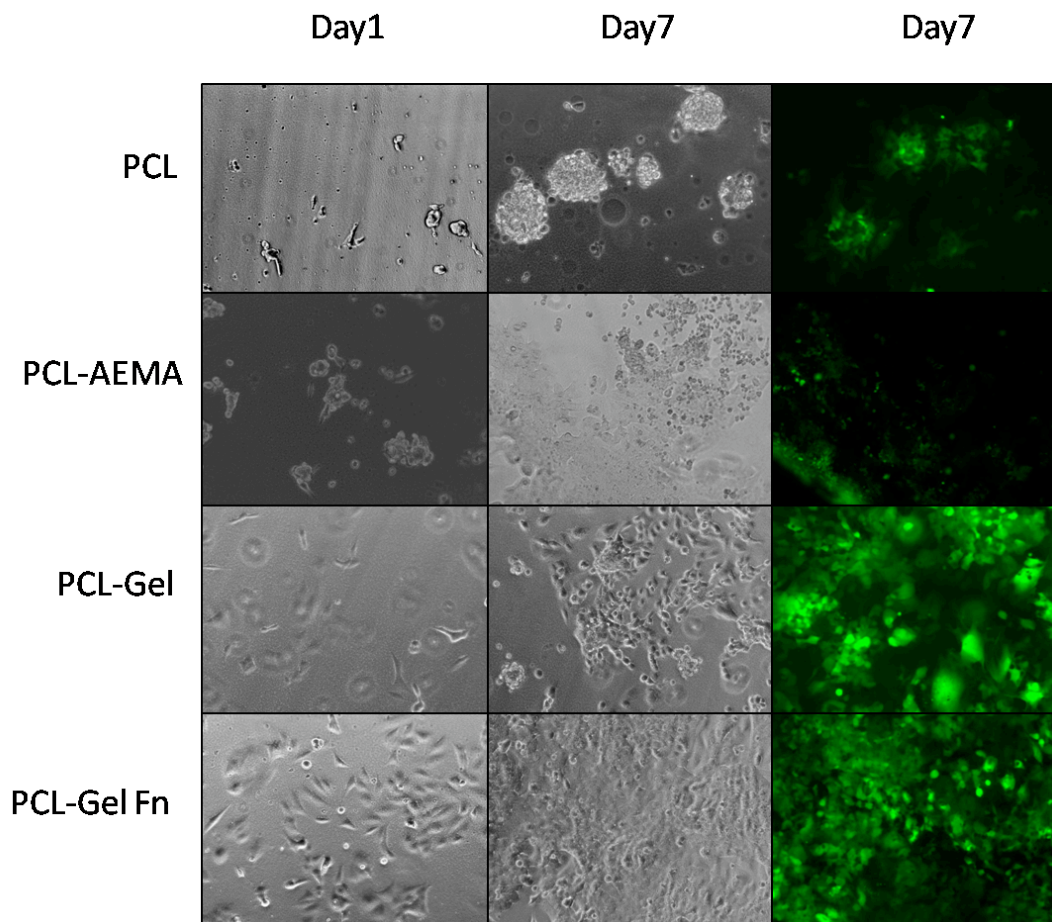
De grote affiniteit voor laminine en fibronectine is onmiskenbaar reeds waarneembaar na 5 min UV grafting. Daarentegen wordt de affiniteit van GelB voor de PCL-AEMA films pas zichtbaar na een grafting van 60 min bij een concentratie van 0,5 mg/ml (figuur 10.16). Dit kan een indicatie zijn dat voldoende positieve ladingen dienen aanwezig te zijn om het proteïne te kunnen binden. Meteen is dit de reden waarom in onze strategie gelatine covalent wordt geïmmobiliseerd en niet gewoon wordt aangebracht via dipcoaten. Uit CFM weten we dat via deze methodiek een homogene gelatine laag wordt bekomen. Het is daarentegen bekend dat fibronectine een grote affiniteit voor GelB vertoont [91]. Omwille van deze reden werd ervoor gekozen om fibronectine te dipcoaten op PCL-GelB films (zie verder: *Invloed van de Oppervlaktemodificatie op Celinteractiviteit*).

Een analoge figuur voor onbehandeld PCL wordt verschaft in appendix E. Hieruit blijkt dat onbehandeld PCL de kleinste affiniteit voor proteïnes bezit.

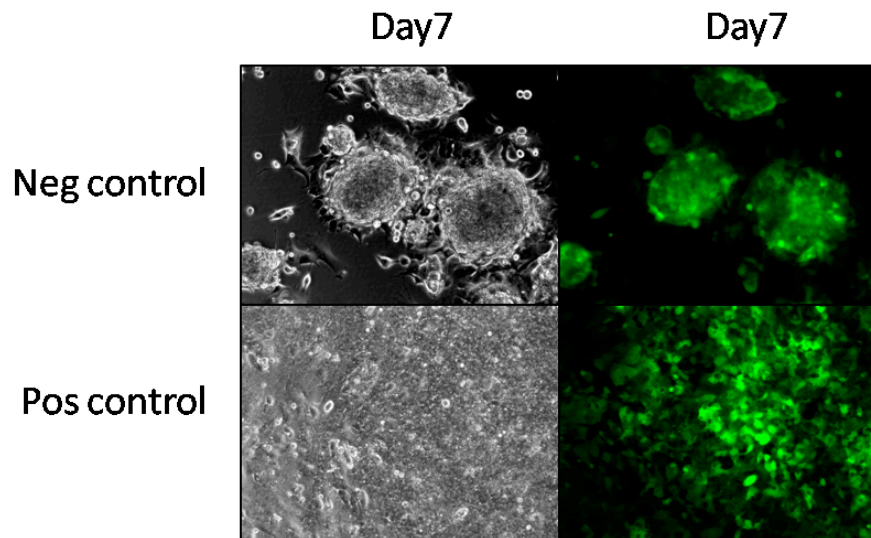
Deze data stellen dat de affiniteit voor proteïnes verbetert door het ‘post-plasma irradiation’ proces, waarbij de affiniteit voor laminine deze voor respectievelijk fibronectine en GelB overtreft.

10.3 Invloed van de Oppervlaktemodificatie op Celinteractiviteit

Celadhesie en proliferatie zijn complexe fenomenen die niet volledig begrepen worden [15, 35, 42]. De rol van de ECM in dit proces heeft geleid tot de ontwikkeling van biomimetische biomaterialen die een of meerdere van de ECM componenten bevatten. Teneinde finaal de invloed van de processtappen na te gaan op de celadhesie en proliferatie werden celculturen uitgezaaid op onbehandelde PCL films, PCL-AEMA films, PCL-GelB films, en PCL-Fn films. Er werd geopteerd voor een graftijd van 5 min, aangezien CFM demonstreerde dat reeds na 5 min graftijd een homogene proteïnelaag kon worden geïmmobiliseerd op de films. Fibronectine werd fysisch op PCL-GelB films geïmmobiliseerd door dipcoaten van de films in een 1 mg/ml fibronectine oplossing ($t = 60$ sec). De beelden die werden opgenomen met behulp van fase contrast microscopie en fluorescentie microscopie worden weergegeven in figuur 10.17 en in figuur 10.18 worden de beelden voor de negatieve en positieve controle weergegeven.



Figuur 10.17: Osteosarcoma cellen, fase contrast microscopie (PCLM) and fluorescentie microscopie van PCL, PCL-AEMA, PCL-Gel en PCL-Fn opgenomen op dag 1 en dag 7 (originele vergroting 10x)



Figuur 10.18: Osteosarcoma cellen, fase contrast microscopie (PCLM) and fluorescenctie microscopie van de negatieve controle (suspensie plaat) en positieve controle (normale TCPS) op dag 7 (originele vergroting 10x)

Zoals verwacht, vertonen de PCL oppervlakken vrijwel geen celhechting en proliferatie. Het PCL is hydrofoob en bevat geen functionele groepen die celsamenhechting kunnen stimuleren. Als een gevolg van deze inherente eigenschappen zullen de uitgezaaide cellen eerder clusters vormen dan dat ze zich aan het PCL oppervlak hechten. De affiniteit van de PCL films voor de cellen is vergelijkbaar met deze van de negatieve controle.

In het geval van PCL-AEMA films is eveneens geen goede celhechting en proliferatie merkbaar. In tegenstelling tot de gewone PCL films werden nu geen grote clusters van niet gehechte cellen waargenomen. Het is belangrijk te beseffen dat een grafttijd van 5 min nog steeds in een contacthoek van 55° resulteert. De hier gebruikte PCL-AEMA films zijn dus nog steeds relatief hydrofoob te noemen.

Ondanks de korte grafttijd is het toch mogelijk een homogene proteïnelaag te immobiliseren. De geïmmobiliseerde films hebben een gemiddelde contacthoek van $36^\circ \pm 7^\circ$. Zoals verwacht werd een merkbaar betere celhechting, proliferatie, en een goede viabiliteit van de cellen waargenomen op geïmmobiliseerde films. Vier uren na de celuitzaaiing werd reeds celadhesie en uitstrekking van de cellen waargenomen op de PCL-Gel en PCL-Fn films. Na 3 dagen werd een stijging van het aantal cellen geobserveerd. De positieve consequenties door het immobiliseren van een proteïne was sneller, en meer uitgesproken in het geval van films met een laagje fibronectine (in vergelijking met een GelB laag). Een gelijkaardige confluente spreiding, proliferatie en adhesie met de positieve controle werd geobserveerd na 7 dagen.

Hoofdstuk 11

Introductie in en Optimalisatie van de 3D-Biplotter techniek

In een laatste deel van de thesis werd, zoals hoger vermeld, een aanvang genomen met het op punt stellen van de printparameters van PCL, gebruik makend van de Bioscaffolder technologie. De bespreking van dit optimalisatieproces wordt in dit hoofdstuk weergegeven.

11.1 Bespreking van de ondervonden Probleemstellingen

De problemen waarmee we bij aanvang werden geconfronteerd kunnen opgesplitst worden in twee types: software en hardware gerelateerde problemen.

11.1.1 Software-matige problemen

De grootste problematiek was software gerelateerd. Het betreft het plotse verlies van de referentie positie van het systeem. Het hele systeem is ingebed in een coördinatenstelsel (absoluut en relatief) met een referentiepunt ($[X \ Y \ Z]_{\text{ABS}} = [0 \ 0 \ 95]_{\text{ABS}}$ in mm). Het absolute systeem geeft de coördinaten van de tip van de naald in referentie tot het absolute referentiepunt. In het relatieve systeem worden de coördinaten van de naald tip weergegeven in referentie tot een zelfgekozen oorsprong ($[X \ Y \ Z]_{\text{REL}} = [0 \ 0 \ 0]_{\text{REL}}$ in mm). Om de plaats van de naald tip te bepalen dient met andere woorden steeds het referentiepunt gekend te zijn. Indien dit niet gekend is, kan het systeem zijn positie niet juist inschatten en zal bij het plotten in het slechtste geval een botsing ontstaan tussen de naald en de ondergrond waarop dient te worden geplot. Het is duidelijk dat een dergelijke botsing enkele gevolgen met zich kan meebrengen, zoals de destructie van de naald, het krassen van de basisplaat, en het verticaal verschuiven van de hardware die zich positioneert boven de naald. Dit laatste kan eventueel een zodanige frictie teweegbrengen dat de stappenmotor wordt geforceerd.

Enkele dagen na de installatie van de bioscaffolder werd dit probleem ondervonden. Aangezien vanaf de naald tip ook maar een fractie van een millimeter botst met de basisplaat de naald (on)herstelbare schade wordt toegebracht, werden drie ‘medical grade stainless steel’ gage D27 naalden (kostprijs \pm €100) door dit probleem vernield. De ‘medical grade stainless steel’ basisplaat werd ook licht gekrast over het oppervlak waar getracht werd te plotten. Ing. H. John (SYSENC) overdacht dat het probleem een gevolg was van een communicatiefout tussen

de software en de hardware. Vermoedelijk was de driver software geschreven voor computers met een 'single core' processor. De toegeleverde computer was een 'dual core', en bijgevolg niet compatibel met de software. Als oplossing werd een nieuwe driver software geschreven en geïmplementeerd in de bestaande bioscaffolder software. Ondanks deze poging bleef het probleem zich voordoen, zelfs na het vervangen van de 'dual core' PC met een 'single core' PC. Dit wijst erop dat het probleem niet gerelateerd is met het single of dubbel zijn van de processor.

Hedendaags wordt nog steeds gezocht naar een oplossing voor het, tot nu toe, onbekende kernprobleem. Er wordt vermoed dat het probleem te maken heeft met de uitlijning van de Z-referentie-sensor of eventueel een beschadiging of foute component van de besturingskaart. Finaal werd vastgesteld dat het probleem te maken heeft met een slecht contact van de Z-sensor. Het probleem is dus niet software gerelateerd, maar hardware gerelateerd.

Een tweede software gerelateerd probleem is de primitieve koppeling tussen parameters en systeem. Sommige parameters dienen handmatig te worden ingesteld, rechtstreeks aan het toestel, andere dienen in een log-boek te worden ingevuld, nog andere dienen met behulp van een NC code te worden ingegeven. De input van de gewenste parameters is met andere woorden alles behalve rechtlijnig en eenduidig.

11.1.2 Hardware-matige problemen

De problemen die ondervonden werden als gevolg van de bioscaffolder hardware kunnen opgedeeld worden in enkele klassen: (1) de naald; (2) de Auger schroef; (3) de drukaanvoer van de extrusiekop, en; (4) ontmanteling en kuisen van de extrusiekop.

Medical grade Stainless Steel naalden

Het werd reeds aangehaald dat de naald een zwakke schakel is in het systeem. Vanaf het ogenblik dat de naald de basisplaat raakt, is deze meestal onherstelbaar beschadigd. Dit is te wijten aan het conische uiteinde van de naald, met een opening op submillimeter schaal (gage D27 heeft een opening van $200 \mu m$). Door de kleine opening, én de dunne 'stainless steel' wand van de tip, wordt de naald bij de kleinste mechanisch ondervonden kracht afgeknepen. Hierdoor kan deze niet meer worden gebruikt. Een oplossing zou het verdikken van de wand kunnen zijn, doch dient ermee rekening te worden gehouden dat hierdoor de resolutie van het systeem zal dalen. Indien immers de wand dikker wordt, zal de interstrut afstand mee vergroten.

De beschadigde naalden kunnen echter gerecycleerd worden na wegschuren (centrale werkplaats) van het conische uiteinde. Hierdoor worden in plaats van gage D27, naalden met een $400 \mu m$ opening bekomen.

Auger schroef

Een overkomelijk probleem betreffende de Auger schroef was het niet goed vastklemmen van het schroefomhulsel. Dit gebeurt aan de hand van een klein schroefje dat wordt vastgedraaid op de schroefmantel, de Auger schroef hierbij fixerend. Nadeel van dergelijk systeem is dat het schroefkanaal volledig vrij dient te zijn van eventuele polymeermassa. Het kanaaltje is echter zo klein dat dit visueel niet waarneembaar is. Als gevolg hiervan werd een niet-destructieve ontregeling van het systeem (kop) waargenomen. Dit ging echter wel gepaard

met de destructie van een naald. De schroef was immers tijdens het plotten losgekomen en gezakt, waardoor de naald de basisplaat taakte.

Verder moest de O-ring (dichting in de overgang van de smeltaanvoer naar de Auger schroef) vervangen worden. De ring was tijdens een plotproces op, tot heden, onverklaarbare reden gefragmenteerd. De fragmenten O-ring werden meegevoerd in de Auger schroef en veroorzaakten een blokkeren van de naald ingang. De O-ring werd vervangen.

Drukaanvoer van de extrusiekop

Drukverlies werd geconstateerd als gevolg van een kapotte O-ring in de ‘quicklock’ die voor de connectie tussen de drukdarm en het polymeereservoir instaat. De ring was niet gefragmenteerd zoals in bovenstaand geval, eerder gebroken op twee plaatsen. Ook deze O-ring werd vervangen.

Ontmanteling en reinigen van de extrusiekop

Er werd geconstateerd dat de ontmanteling van het systeem slechts enigszins mogelijk is indien het geheel zich op temperatuur bevindt. Het ontmantelen neemt ongeveer 1 uur tijd in beslag. Het reinigen van het systeem gebeurt in een solvent, overeenkomstig het gebruikte polymeer. In het geval van PCL dient de kop minstens één nacht gewassen te worden in chloroform. Daarna moeten, gelet op bovenvermelde problematiek, alle kleine openingen grondig gekuist worden teneinde alle kanalen vrij te maken. Dit duurt op zijn minst ongeveer een halve dag. Vervolgens dient het systeem terug te worden gemonteerd (30-45 min).

Met andere woorden, het is een noodzakelijk kwaad dat het gebruik van het toestel toch anderhalve dag stillegt, en best gebeurt met twee personen. Indien dit zonder veel aandacht voor details wordt uitgevoerd kan dit voor problemen zorgen tijdens de werking van het systeem (cfr. Auger schroef).

11.2 Plotten van poreuze Scaffolds via de Bioplotter Techniek

Na verkennende tests waarbij de parameters voor het plotten van PCL in eerste instantie op een visuele basis werden geselecteerd, werden 4 experimenten met betrekking tot het plotten van PCL scaffolds uitgevoerd. Een overzicht wordt verschaft in tabel 11.1. Bij de vier experimenten werden kubussen van $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ (experimenten nr. 1, 3 en 4) en een meniscus (experiment nr. 2) geplot. In het geval van de kubussen werden series van 6 scaffolds met dezelfde ingestelde parameters geproduceerd. Patroonvarianties (i.e. variërende hoeken waaronder twee opeenvolgende lagen worden geplot, cfr. $90^\circ, 45^\circ, \dots$) werden uitgetest, maar zijn niet opgenomen in dit werk. Patronen waarbij de hoek minder dan 45° of meer dan 135° bedraagt resulteren in een distortie tijdens het 3D-plotten [38]. Vanuit dit oogpunt werden de scaffolds geplot met hoeken van 90° tussen de opeenvolgende lagen. De scaffolds werden allen geplot op ‘*double-sided tape*’¹ (HUBO) bij een omgevingstemperatuur van 25°C . Het systeem wordt op druk gehouden door een compressor.

¹Naar analogie met de iets primitievere oplossing van Landers *et al.* [38], nl. ruw karton

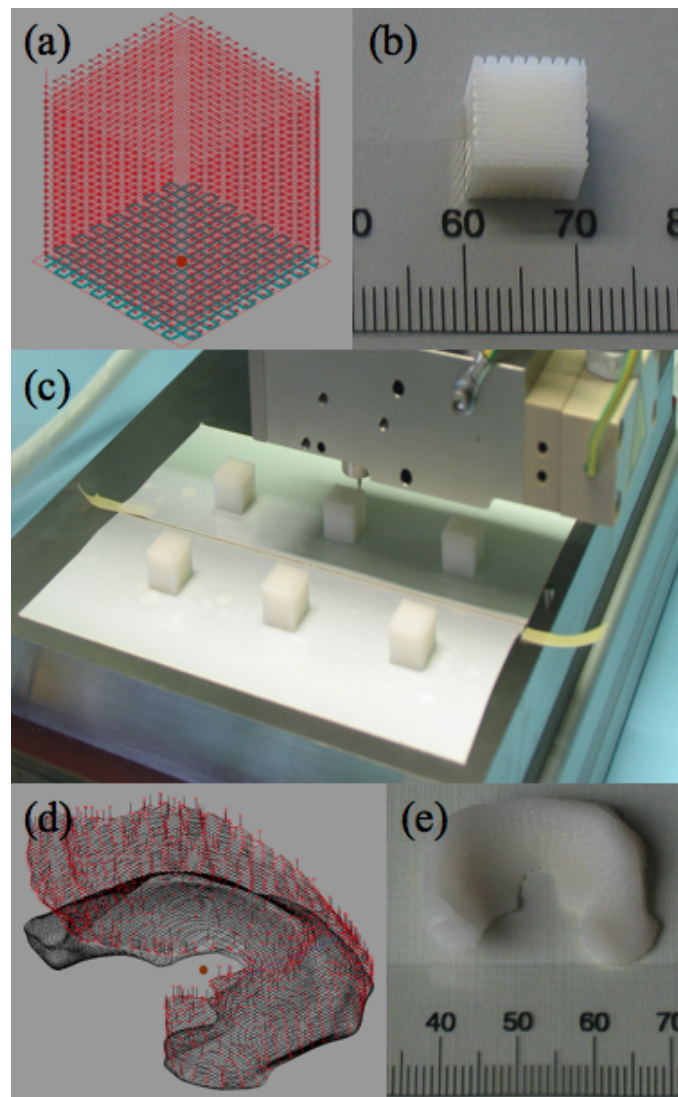
Tabel 11.1: Overzicht van de uitgevoerde 3D-Biplotter experimenten en ingestelde parameters

| Extrusie parameters | Experiment Nr. 1 | Experiment Nr. 2 | Experiment Nr. 3 | Experiment Nr. 4 |
|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Structuurtype | kubus (10x10x10 mm ³) | meniscus | kubus (10x10x10 mm ³) | kubus (10x10x10 mm ³) |
| Materiaal | PCL | PCL | PCL | PCL |
| Type naald | gage 27 DL encapsulation | gage 27 DL encapsulation | gage 27 DL encapsulation | gage 27 DL encapsulation |
| Patroon | 90° | 90° | 90° | 90° |
| Interstrut afstand (mm) | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 0,7 |
| Temperatuur (°C) | 160 | 160 | 140 | 120 |
| v_{xy} (mm/min) | 46 | 46 | 60 | 80 |
| Druk (bar) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| v_s (mm/min) | 200 | 200 | 200 | 200 |
| $v_{pullback}$ (mm/min) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| $t_{pullback}$ (s) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| $v_{corner\ delay}$ (mm/min) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Pre/Postflow (mm/min) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Meander | ja | ja | ja | neen |

Met *gage 27 DL encapsulation* een ‘medical grade stainless steel’ naald ($\emptyset_{binnenste} = 200 \mu m$); de *interstrut afstand* als de afstand tussen de middens van twee (XY) parallelle struts; de *temperatuur* de temperatuur van de extrusiekop; v_{xy} de snelheid waarmee de naald in het XY-vlak beweegt; v_s de snelheid waaraan de Auger schroef draait; $v_{pullback}$ de snelheid waaraan de Auger schroef in tegengestelde richting draait bij onderbreken van het plotten; $t_{pullback}$ de tijd over dewelke de Auger schroef in tegengestelde richting draait bij onderbreken van het plotten; $v_{corner\ delay}$ de snelheid waarmee de extrusiekop afremt bij het naderen van een struteinde, en; *meander* is het al dan niet onderbreken van het plotproces in één XY laag.

De rheologische eigenschappen van de polymeersmelt zijn grotendeels bepalend voor de in te stellen parameters [23]. Een snellere plotting is mogelijk indien bij gelijke drukken wordt gewerkt met lagere viscositeiten. Het is belangrijk dat de snelheid waarmee de polymeersmelt wordt geëxtrudeerd afgestemd wordt op de snelheid waarmee de extrusiekop zich voortbeweegt in het XY-vlak (v_{xy}). Hiertoe wordt de lengte (in mm) bepaald van de strut die geëxtrudeerd wordt gedurende 60 sec, bij de ingestelde parameters en stationaire extrusiekop. De temperatuur van de smelt (\sim temperatuur van de extrusiekop) is nauw gerelateerd aan de viscositeit van de polymeersmelt. Hogere temperaturen garanderen een lagere viscositeit (in het geval van PCL). Met andere woorden, hogere temperaturen kunnen de snelheid van het plotproces opdrijven, maar kunnen nadelig zijn voor de degradatie van het PCL tijdens het plotten.

In figuur 11.1 worden enkele concrete, *manu propria*, 3D-Biplotter toepassingen afgebeeld. De afgebeelde computermodellen zijn gesegmenteerde *.stl* files waarin het plotpatroon wordt weergegeven (software PrimCAM).



Figuur 11.1: 3D-Bioplotter toepassingen: Computermodellen van respectievelijk een $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ kubus ((a), experiment nr. 1) en een meniscus ((d), experiment nr. 2), met de hiermee overeenstemmende geplotte scaffolds (b),(e). De modellen zijn onderverdeeld in lagen van $200 \mu\text{m}$. (d) Toont een experimentele set-up voor het plotten van PCL kubussen.

De ingestelde waarden van de parameters zijn vergelijkbaar met waarden die worden weergevonden in de literatuur. Kim en Son [47] plotten PCL ($M_n = 80000 \text{ g/mol}$) aan $60 - 180 \text{ mm/min}$, een extrusie temperatuur van 110°C (dynamische viscositeit = $4 \times 10^4 \text{ poise}$ bij 100 rad/s), de plaat waarop werd geplot had een temperatuur van 25°C , de gebruikte naald had een binnendiameter van $200 \mu\text{m}$. Park *et al.* [92] vervaardigden $10 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$ PCL ($M_n = 80000 \text{ g/mol}$) scaffolds bij $100 - 130^\circ\text{C}$, variërende naald diameters ($200 \mu\text{m}$, $250 \mu\text{m}$, $330 \mu\text{m}$) en variërende interstrut afstanden (resp. $300 \mu\text{m}$, $500 \mu\text{m}$, $700 \mu\text{m}$). Het plotten van PCL ($M_n = 37000 \text{ g/mol}$) bij een temperatuur van 130°C onder CO_2 druk werd beschreven door Yilgor *et al.* [93]. Het gebruik van stikstofgas voor het opleggen van druk (5 bar), temperaturen tussen $190 - 220^\circ\text{C}$ voor de extrusiekoep en kamertemperatuur voor de basisplaat, een

snelheid van 180 - 230 mm/min, een interstrut afstand van 800 μm als ingestelde parameters en het gebruik van PCL ($M_n = 12000$ g/mol, 65000 g/mol en 130000 g/mol) voor het plotten van scaffolds werd uiteengezet door Moroni *et al.* [101].

Landers *et al.* [38] vermeldden het plotten van een 5 % waterige oplossing van sodium alginaat met 1 % gelatine en 0,1 % EDTA in 0,03 mol/l waterige CaCl_2 oplossing. Voor het plotproces werd een compressor aangesloten met ingestelde waarden tussen $1,5 - 2,0 \times 10^5$ Pa. v_{xy} bedroeg 18 mm/s, met een delay van 0,06 sec in 'turning points'. De temperatuur waarop gedispenseerd werd bedroeg 60 - 80°C, en de basisplaat bevond zich op kamertemperatuur.

Opmerkingen:

- Enige inconsistentie is weer te vinden in de tabel met betrekking tot de parameter v_{xy} . Uit de tabel zou men foutief kunnen afleiden dat bij het verlagen van de temperatuur, de extrusiesnelheid wordt opgedreven. Dit is echter niet mogelijk aangezien de viscositeit toeneemt met afnemende temperatuur. Desondanks wordt benadrukt dat de waarden de correcte waarden zijn, opgemeten volgens bovenvermelde procedure. In het eerste deel van dit hoofdstuk werd aangehaald dat 2 O-ringen (drukaanvoer en Auger schroef) een mankement vertoonden. De eerst O-ring (Auger schroef) werd vervangen tussen de experimenten nr. 2 en 3. De tweede (drukaanvoer) werd vervangen tussen de experimenten nr. 3 en 4. Iedere vervanging ging gepaard met een verhoging van de extrusiesnelheid, waaruit men kan afleiden dat drukverlies optrad tussen de onderdelen als gevolg van een niet perfecte dichting. Dit drukverlies betekent onrechtstreeks een kleinere plotsnelheid.
- Het smeltpunt van PCL ($M_n = 80000$ g/mol) bedraagt 60°C, en decompositie van het polymeer treedt op vanaf 350°C [93]. Bij de bepaling van de decompositie temperatuur wordt echter geen rekening gehouden met de dimensie tijd. Een experiment waarbij een serie kubussen worden geplot, neemt 15 à 20 uren in beslag. Gedurende deze relatief lange periode wordt de polymeersmelt op (de ingestelde) temperatuur gehouden. Er werd vastgesteld dat indien de PCL smelt bij 160°C wordt gehouden voor dergelijke relatief lange periode, het materiaal degradeert. Deze degradatie was visueel zichtbaar in experiment nr. 1 als een verkleuring van de bovenste lagen. Indien de smelt meer dan 72 uren bij 160°C wordt gehouden, veroorzaakt dit naast de visuele verkleuring een inzakken van de struts als gevolg van de verminderde mechanische sterkte van het polymeer. Dit inzakken is op zijn beurt verantwoordelijk voor het dichtslibben van de scaffold (geen interconnectief poriënnetwerk meer aanwezig; cfr. experiment nr. 2).
- Wegens tijdgebrek was het niet mogelijk om de ontwikkelde oppervlaktechemie toe te passen op de geplotte structuren. Omwille van diezelfde reden was het eveneens niet mogelijk om structuren te vervaardigen uitgaande van de gesynthetiseerde copolymeren. Wel werd een soort 'proof of principle' uitgevoerd waarin de ontwikkelde oppervlaktechemie werd toegepast op handmatig geproduceerde scaffolds van p(LA-co-CL) bismethacrylaat random copolymeren. Een chemische vernetting van de gemodificeerde copolymeren werd uitgevoerd door het toevoegen van een D,L-camphorquinone/ethyl-4-dimethylaminobenzoaat initiator systeem [60]. Er werd vastgesteld dat de handmatig gedispenseerde struts in een waterig medium beter hun cilindrische morfologie behielden, ten opzichte van struts gedispenseerd in open lucht. Een rudimentaire kwalitatieve

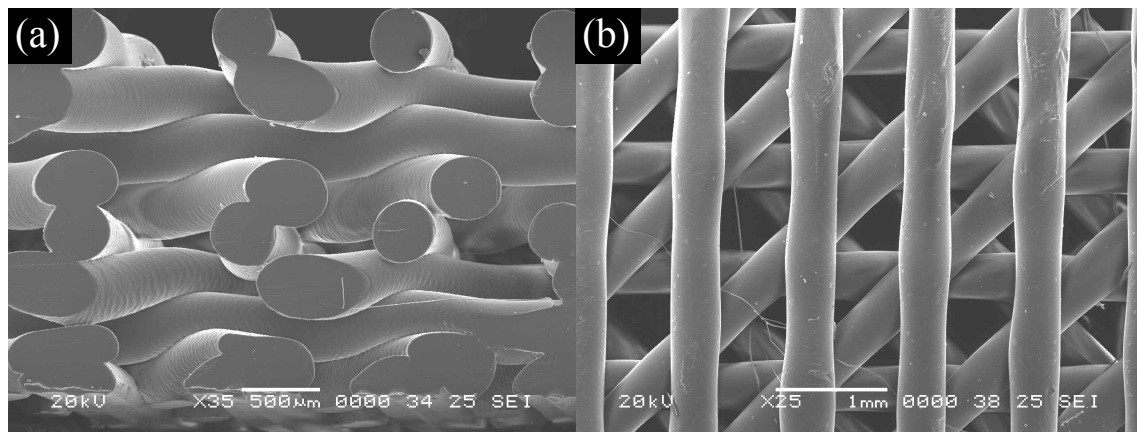
controle van de oppervlaktechemie werd uitgevoerd aan de hand van kleuringen. In conclusie kan gesteld worden dat het waarschijnlijk is dat de ontwikkelde oppervlaktechemie op 2D-films kan overgedragen worden naar 3D-structuren en verder onderzoek in die richting zal ondernomen worden.

11.3 Karakterisatie van de geplote Structuren

Een theoretisch model is beschikbaar voor het bepalen van de porositeit [38, 59]. De scaffolds worden gekarakteriseerd aan de hand van SEM beeldopnames, waaruit een kwalitatieve indruk kan worden bekomen van de porositeit en ‘cross-secties’, en een kwantitatieve bepaling van de poriën- en strut afmetingen kan worden verkregen [59]. Uitgaande van de experimenteel bevestigde poriën- en strut dimensies werd de berekening van de porositeit aangepast en werden uiterste limieten berekend.

11.3.1 Karakterisatie van de PCL scaffolds via SEM

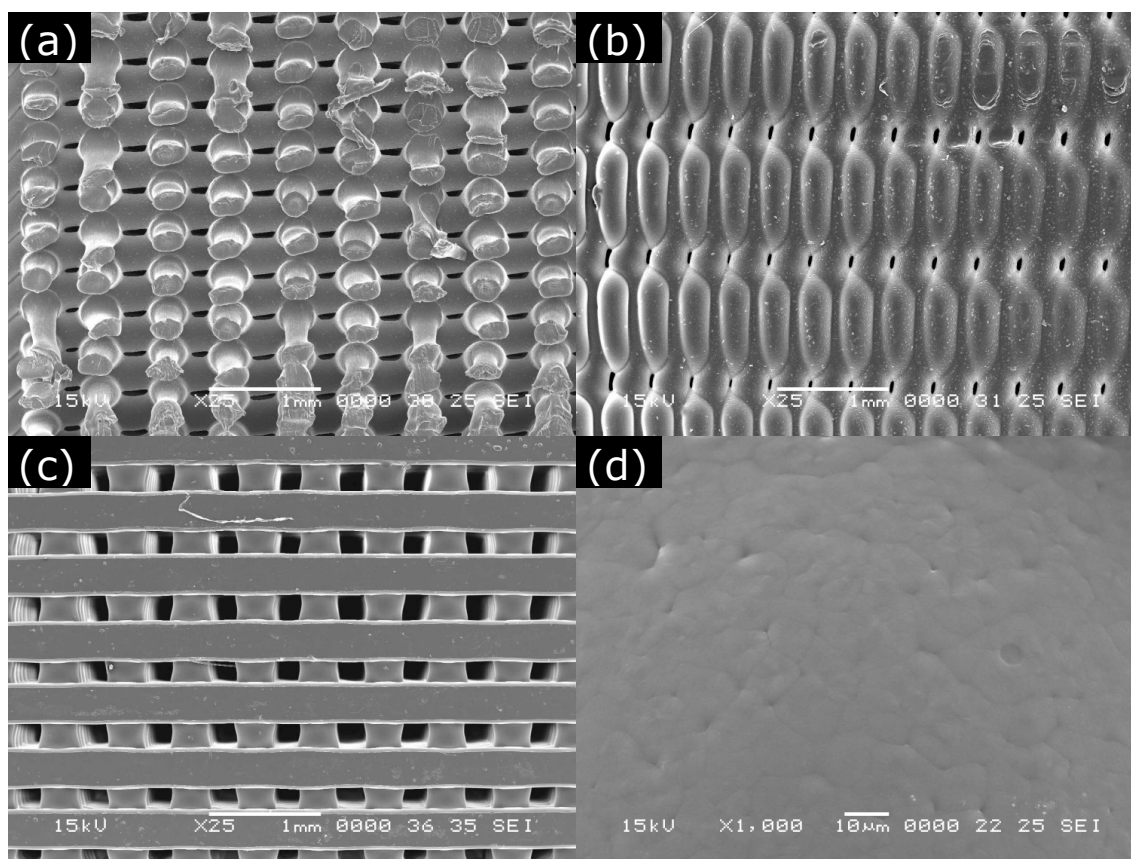
Enkele SEM opnames werden genomen van een scaffold geproduceerd voor de start van de experimenten. Het betreft een scaffold waarvan de struts onder hoeken van 45° , i.p.v. 90° , werden geprint. Om louter kwalitatieve redenen worden in figuur 11.2 deze opnames weergegeven. Het is interessant om het verschil op te merken met het meer regelmatige 90° patroon.



Figuur 11.2: SEM opnames van een PCL scaffold met struts onder 45° : (a) doorsnede (vergroting 35x); (b) bovenaanzicht (vergroting 25x)

Experiment Nr. 1

In figuur 11.3 worden enkele SEM beeldopnames weergegeven, die werden opgenomen van kubussen geplot met de parameters vermeld onder de categorie “Experiment Nr. 1”.



Figuur 11.3: SEM opnames van experiment nr. 1 structuren: (a) doorsnede (vergroting 25x); (b) zijaanzicht (vergroting 25x); (c) bovenaanzicht (vergroting 25x); (d) PCL oppervlakte (vergroting 1000x)

De vier types aanzichten, opgenomen via SEM, leiden tot vier grote vaststellingen: (1) Uit beeldopnames van de interne structuur (doorsneden) blijkt dat de structuren 100 % interconnectiviteit vertonen. In hoofdstuk 2: *Tissue Engineering* werden enkele vereisten opgesomd met betrekking tot dragerstructuren. Hierin werd afgeleid dat het gewenst is om over een zo groot mogelijke interconnectiviteitsgraad te bezitten met het oog op celuitzaaiing. Er werd vastgesteld dat de Biplotter techniek hieraan kan voldoen. De doorsneden geven ook een indicatie van het temperatuurseffect. Er wordt vastgesteld dat struts, die bij 160°C worden geprint, in relatief hoge mate samenvloeien. Zoals uit de berekeningen (zie verder) zal volgen, heeft dit grote consequenties voor de porositeit van de scaffold. Het samenklitten van de struts verkleint drastisch het theoretische poriënvolume. Het inzakken van de struts is waarschijnlijk een combinatie van een rechtstreeks gevolg (het opnieuw smelten van de reeds geplotte lagen door de nieuwe laag) en een onrechtstreeks gevolg (degradatie) van de temperatuur.

(2) Er wordt vastgesteld, uit de zijaanzichten, dat het instellen van een meander in combinatie met de vaststelling uit punt (1), ertoe leidt dat de zijanten in grote mate dichtslibben. Er zijn enkele opties om dit probleem te omzeilen, met name: lagere temperatuur, grotere interstrut afstand, en het uitschakelen van de optie meander. Deze opties worden uitgetest in experimenten nr. 3 en 4.

(3) De bovenaanzichten bevestigen de regelmatige laag-na-laag depositie van PCL struts. Uit deze aanzichten is duidelijk af te leiden dat homogene struts worden geprint, met een homogene spatiëring.

(4) Een detailopname die een strutoppervlak visualiseert is in overeenstemming met de SEM opnamen van PCL films uit hoofdstuk 10: *Post-plasma Grafting van AEMA op PCL en aansluitende Immobilisatie van Biomoleculen*. Er wordt opgemerkt dat heel gladde struts worden bekomen. De problematiek van de gladde struts wordt door Kim en Son [47] beschreven.

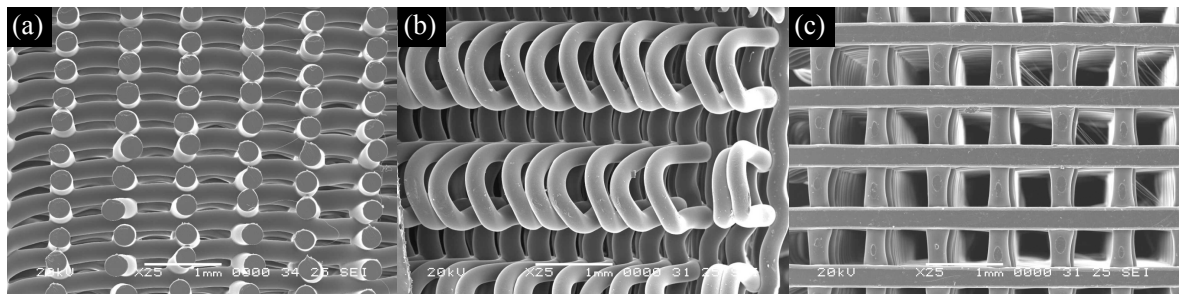
In appendix F worden enkele SEM foto's weergegeven, inclusief afmetingen van poriën en struts. De uitgemiddelde waarden van deze afmetingen werden gebruikt voor de berekening van de porositeit.

Experiment Nr. 2

Er werd vastgesteld dat de meniscus structuur vrijwel geen interconnectiviteit vertoonde. Hoogstwaarschijnlijk heeft, zoals reeds eerder besproken, de lange periode op de hoge temperatuur een degradatie van het uitgangsmateriaal veroorzaakt in die mate dat de struts inzakten en samensmolten. Dit experiment wordt dan ook verder niet meer behandeld.

Experiment Nr. 3

Het plotten van kubussen met de “Experiment Nr. 3” instellingen, leidt tot de SEM foto's uit figuur 11.4.



Figuur 11.4: SEM opnames van experiment nr. 3 structuren: (a) doorsnede (vergroting 25x); (b) zijaanzicht (vergroting 25x); (c) bovenaanzicht (vergroting 25x)

De doorsnede bevestigt alvast een meer regelmatige inwendige spatiëring van de poriën en struts. De hoge mate van dichtslibben als een gevolg van de hoge temperaturen en kleine interstrut afstanden uit “Experiment Nr. 1” wordt niet meer waargenomen. Er wordt dan ook een merkkelijk hogere porositeit verwacht.

In het zijaanzicht zijn duidelijk de meanders zichtbaar, die in dit geval niet samengesmolten zijn tot het vormen van een quasi ondoordringbare zijwand (cfr. figuur 11.3 (b)). Eerder worden losstaande lusjes waargenomen, die in mindere of meerdere mate onder invloed van de zwaartekracht, doorhangen.

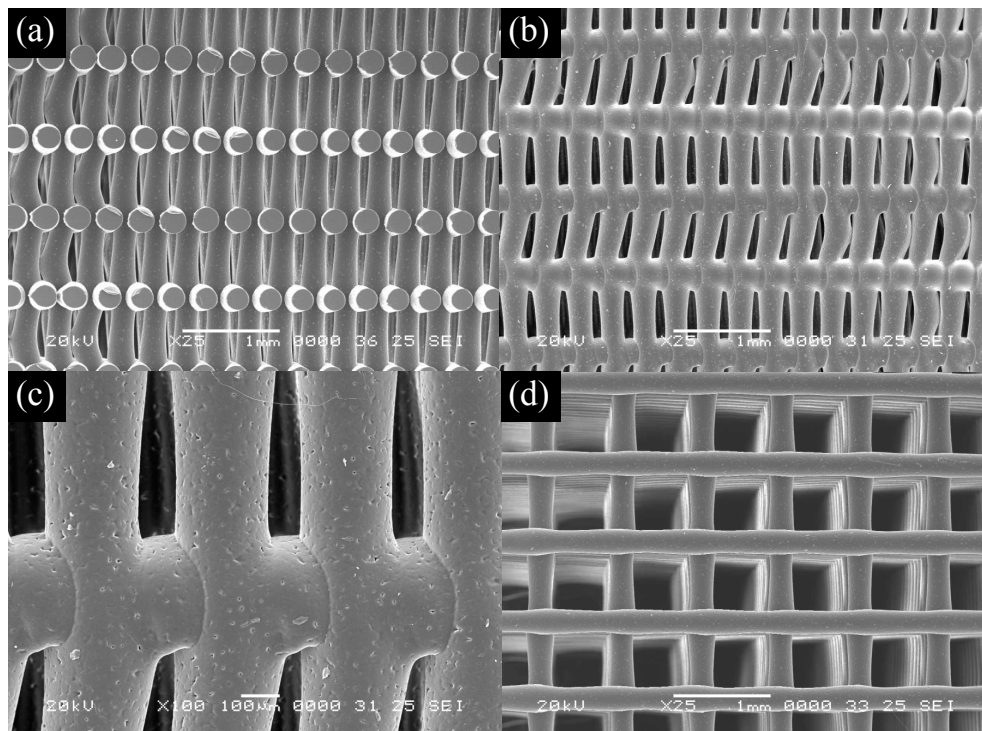
Uit het bovenaanzicht valt op dat de struts verdikkingen vertonen naar de knooppunten (i.e. de punten waar 2 opeenvolgende lagen elkaar raken) toe. Teneinde deze heterogeniteit te vermijden zal in “Experiment Nr. 4” de temperatuur nogmaals worden verlaagd.

In appendix F worden enkele SEM foto's weergegeven, inclusief afmetingen van poriën en struts. De uitgemiddelde waarden van deze afmetingen werden gebruikt voor de berekening van de porositeit.

Experiment Nr. 4

Uiteindelijk wordt verwacht dat de meest homogene scaffold wordt geproduceerd met de parameterset uit "Experiment Nr. 4". Het printen bij de laagste temperatuur zou moeten voorkomen dat de struts versmelten en/of invallen, en bijgevolg een heel homogene spatiëring van struts en poriën garanderen. Dit is zichtbaar in zowel het bovenaanzicht als in de doorsnede (figuur 11.5 (a,d)). Opgemerkt wordt dat voor de doorsnede het beeld een beetje gekanteld is, wat een verkeerde impressie van de homogeniteit zou kunnen geven. In analogie met experiment nr. 3 worden op het eerste zicht uniforme strutdiameters bekomen. Bij experiment nr. 1 waren de diameters in het XY-vlak merkkelijk groter dan deze in de Z-richting (\sim invallen van de struts).

De minimale mate van versmelting is duidelijk waarneembaar in een detailopname van de zijwand (figuur 11.5 (c)). Daarnaast blijkt dat het uitschakelen van de optie meander een goed homogene poriënstructuur van de zijwanden genereert (figuur 11.5 (b)). In tegenstelling tot experiment nr. 1 zijn de zijwanden niet dichtgeslibd, en in contrast met experiment nr. 3 worden makkelijk toegankelijke zijwanden verkregen door de afwezigheid van doorhangende lusjes.



Figuur 11.5: SEM opnames van experiment nr. 4 structuren: (a) doorsnede (vergroting 25x); (b) zijaanzicht (vergroting 25x); (c) detail zijaanzicht (vergroting 100x); (d) bovenaanzicht (vergroting 25x)

Theoretisch zou de verwachte porositeit, uitgaande van de interstrut afstanden, tussen de porositeit verkregen bij experimenten nr. 1 en 3 moeten gelegen zijn. De minimale mate van verzakking van de struts leidt tot de verwachting dat de porositeit eerder zal aanleunen bij deze van experiment nr. 3. Een visuele vergelijking staaft dit argument.

In appendix F worden enkele SEM foto's weergegeven, inclusief afmetingen van poriën en struts. De uitgemiddelde waarden van deze afmetingen werden gebruikt voor de berekening van de porositeit.

11.3.2 Berekening van de porositeit van de scaffolds

Theoretische modellering garandeert enkel een schatting van de porositeit. Er zijn twee grote theoretische benaderingen: (i) *'unit cube analysis'*, en; (ii) *'mass technique'*. Eerstgenoemde benadering wordt meestal toegepast op structuren met een regelmatige opbouw, en zal bijgevolg in dit werk worden toegepast. De berekening veronderstelt de aanwezigheid van uniforme struts, en de afwezigheid van fusie tussen opeenvolgende lagen. Deze randvoorwaarden betekenen dat de strut diameter en interstrut afstanden over de gehele structuur gelijk en consistent zijn. Zoals echter hierboven beschreven vertonen de struts een inconsistente diameter en grijpt een gedeeltelijke fusie tussen de semi-vaste struts plaats. De accuraatheid van de berekende waarden wordt door deze imperfecties aangetast. [59]

SEM analyse complementeert echter deze theoretische berekeningen van de porositeit. Het laat toe om directe metingen van de poriën en struts uit te voeren. Door gebruik te maken van SEM analyse wordt een betere schatting bekomen, doch wordt benadrukt dat het slechts om een schatting gaat! Een goede kwantitatieve bepaling van de porositeit is mogelijk via *'mercury porosimetry'*, *'gas pycnometry'*, *'gas adsorption'* of μ -CT [59].

In tabel 11.2 worden de theoretische afmetingen, SEM analyse opgemeten afmetingen, theoretische porositeit, en de aangepaste theoretische porositeit (onder de vorm van uiterste limieten) weergegeven. De porositeit wordt berekend aan de hand van formule (11.6) [38, 59]. De symboliek van de formules wordt eveneens gebruikt in de tabel, met l de zijde van de kubus, n_{xy} het aantal struts in een laag, n_z het aantal struts in de Z-richting, d_1 de strut diameter, d_2 de interstrut afstand in het XY-vlak, d_3 de hoogte van een strut in de Z-richting, V_{strut} het volume van een strut, V_{laag} het volume aan struts in één laag, $V_{scaffold}$ het door PCL ingenomen totale volume, en V_{kubus} het totale volume. \emptyset_{naald} wordt gebruikt als waarde voor d_1 en d_3 , en de theoretische interstrut afstand als waarde voor d_2 bij de berekening van de theoretische porositeit.

$$l = n_{xy} d_2 = n_z d_3 \quad (11.1)$$

$$V_{strut} = \left(\frac{\pi}{4} d_1^2 \right) l \quad (11.2)$$

$$V_{laag} = n_{xy} V_{strut} = \frac{l^2 \pi d_1^2}{4 d_2} \quad (11.3)$$

$$V_{scaffold} = n_z V_{laag} = \frac{\pi}{4} \frac{l^3 \pi d_1^2}{d_2 d_3} \quad (11.4)$$

$$V_{kubus} = l^3 \quad (11.5)$$

$$Porositeit(\%) = 1 - \frac{V_{scaffold}}{V_{kubus}} = \left(1 - \frac{\pi}{4} \frac{1}{\left(\frac{d_2}{d_1}\right)} \frac{1}{\left(\frac{d_3}{d_1}\right)} \right) 100 \quad (11.6)$$

Tabel 11.2: Berekening van de porositeit

| Experiment Nr. | \emptyset_{naald} (μm) | Theoretische interstrut afstand (μm) | Theoretische porositeit (%) | d_1 (μm) | d_2 (μm) | d_3 (μm) | Aangepaste porositeit (%) |
|----------------|---------------------------------------|--|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 1 | 200 | 600 | 74 | 309 ± 16 | 523 ± 37 | 307 ± 41 | 35 - 65 |
| 3 | 200 | 800 | 80 | 269 ± 24 | 813 ± 25 | 270 ± 20 | 65 - 81 |
| 4 | 200 | 700 | 78 | 241 ± 12 | 827 ± 15 | 244 ± 10 | 73 - 81 |

Enkele belangrijke besluiten kunnen worden getrokken uit de gegevens van tabel 11.2. In wat volgt wordt een bespreking gegeven.

De drie experimenten werden uitgevoerd met eenzelfde ‘stainless steel’ naald. Vanuit die wetenschap zou theoretisch de waarde d_1 bij de drie experimenten gelijkaardig moeten zijn en de waarde $200 \mu\text{m}$ naderen. Meer nog, indien de scaffold zou zijn opgebouwd uit perfect cilindrische struts, i.e. struts die geen zwaartekrachtwerking ondervinden en bijgevolg niet inzakken, moeten d_1 en d_3 quasi dezelfde afstanden vertegenwoordigen. Er wordt opgemerkt dat dit slechts voor de experimenten nr. 3 en 4 opgaat, rekening houdende met de standaardafwijkingen. Enerzijds zijn de fundamenteel grotere waarden van d_1 in vergelijking met de theoretische waarde, anderzijds de grotere spreiding tussen het verschil van de waarden voor d_1 en d_3 , kwantitatieve bevestigingen van het inzakken van de structuren uit experiment nr. 1. Daarnaast wordt opgemerkt dat bij lagere extrusietemperaturen, en bijgevolg hogere viscositeiten van de smelt, de diameter van de struts homogener (kleinere standaardafwijking en dezelfde waarden voor d_1 en d_3) wordt. Beter geformuleerd convergeren de waarden voor de diameters naar de theoretische waarde, met kleiner wordende standaardafwijkingen. Zoals visueel reeds duidelijk werd uit de SEM opnamen zijn de kubussen geprint met parameterset “Experiment Nr. 4” de meest uniforme scaffolds.

Als de limieten voor de experimentele porositeit, die kunnen worden berekend aan de hand van formule (11.6), worden beschouwd en vergeleken met de theoretisch verwachte waarden, kunnen 2 interessante vaststellingen gemaakt worden. (1) De theoretisch verwachte waarde voor experiment nr. 1 valt niet in het bereik van de experimentele uiterste limieten, en; (2) men stelt vast dat het bereik van de uiterste limieten convergeren naar een waarde die hoogstwaarschijnlijk de theoretische waarde benadert. De grootte van de gebieden die de uiterste limieten bestrijken is eveneens een maat voor de homogeniteit. Deze bedragen respectievelijk 30%, 16%, en 8%. Hoe kleiner deze waarde, hoe uniform de structuur is opgebouwd.

Het ziet er dus naar uit dat optimalisatie van het benutte materiaal een cruciaal aspect is voor het verkrijgen van uniforme scaffolds. In het geval van PCL kan door verder onderzoek hoogstwaarschijnlijk een parameterset worden opgesteld die structuren genereert waarvan de experimentele porositeit de theoretische porositeit zeer dicht zal benaderen. Onderzoek van de scaffolds met betrekking tot celculturen is lopende.

Algemene Bespreking en Besluit

Dit eindwerk stelde zich tot doel: (1) de aanmaak van toepassingsgerichte copolymeren voor verwerking via de Bioplotter technologie; (2) het verbeteren van de celcompatibiliteit van PCL films door de ontwikkeling en screening van een oppervlaktemodificatie methodologie, en; (3) het opstellen van optimale parameters voor het printen van driedimensionale PCL-structuren met de 3D-Bioplotter.

Random copolymeren van D,L-lactide en ϵ -caprolacton met een quasi equivalente verhouding aan monomeren, en een gemiddelde M_n van 3786 g/mol, werden gesynthetiseerd en gekarakteriseerd met $^1\text{H-NMR}$. De gemiddelde opbrengst bedroeg 60 %. De hydroxyl eindgroepen werden succesvol gemodificeerd tot methacrylaat eindgroepen, met een rendement van quasi 100 %. Onderzoek naar de initiële thermische degradatie werd uitgevoerd via TGA analyse. Na eindgroepmodificatie blijft ongeveer 8 % aan solventen achter en verschuift de initiële degradatietemperatuur van 237°C naar 295°C. De methacrylaat eindgroepen maken chemische vernetting bij kamertemperatuur mogelijk, resulterend in een verdere verbetering van de thermische stabiliteit. Via DSC analyse werd de aanwezigheid van twee T_g 's geobserveerd. Hoogstwaarschijnlijk grijpt een lichte fase separatie plaats tijdens de ringopeningpolymerisatie, waardoor domeinen rijker aan PCL ($T_g = -37^\circ\text{C}$) en domeinen rijker aan PLA ($T_g = -12^\circ\text{C}$) worden verkregen. Met andere woorden werden amorfe, semi-random copolymeren gesynthetiseerd. De relatief lage viscositeit bij kamertemperatuur, samen met de mogelijke vernetting bij kamertemperatuur, maken deze copolymeren een uitstekende kandidaat voor de eventuele vervaardiging van cel-scaffold constructies in één enkele processtap.

De succesvolle oppervlaktemodificatie van PCL films volgens een 3-stappen protocol (plasma voorbehandeling, UV geïnduceerde graft polymerisatie met AEMA, gelatine immobilisatie via carbodiimide koppeling) werd kwalitatief bevestigd aan de hand van kleuringen alvorens gedetailleerd onderzoek uit te voeren. De bepaling van het aantal geïntroduceerde (hydro)peroxiden door de plasmabehandeling was niet mogelijk via de DPPH methode. Een behandeling van de PCL films gedurende 30 sec met Ar-plasma laten echter reeds een voldoende bevochtiging van de films toe teneinde een goed contact te kunnen verzekeren tussen de films en de waterige graftoplossing.

XPS analyse van de films na de grafting stap toonde de aanwezigheid van vrije amines aan. Een uitgebreide statistische analyse naar de invloed van de graftprocedure op de concentratie aan vrije amines en de bevochtigbaarheid van de films werd uitgevoerd via respectievelijk ninhydrine assay en SCA metingen. Variatie van de concentratie van de graftoplossing en de grafftijd stelt ons in staat de hoeveelheid vrije amines en de bevochtigbaarheid van de films te controleren. De grootste concentratie aan vrije amines werd weergevonden voor het graften met een 1M graftoplossing onder 60 min UV belichting bij kamertemperatuur ($\pm 7 \times 10^{-8}$

mol/cm²). Diezelfde condities leiden tot de grootste bevochtigbaarheid met een contacthoek van $53^\circ \pm 5^\circ$. De gegrafte polymeren zijn in SEM, AFM, profilometrie en CFM zichtbaar onder de vorm van 'mushroom-like' clusters. Er werd opgemerkt dat het aantal pAEMA clusters niet kon gecontroleerd worden door variatie van de graftconcentratie en -tijd. Daarentegen resulteerden variaties van de vermelde parameters wel tot een alteratie van de perimeter van de clusters. Het is dus waarschijnlijk dat het aantal clusters wordt gecontroleerd door het aantal geïntroduceerde (hydro)peroxiden (en bijgevolg de plasma voorbehandeling), daar waar de lengte van de clusters afhankelijk is van de graftconcentratie/grafttijd (en bijgevolg de UV geïnduceerde polymerisatie). AFM demonstreerde een stijgende oppervlakteruwheid als een gevolg van de graftprocedure. Daarnaast werd de efficiëntie van het spoelprotocol aangetoond via XPS.

De introductie van pAEMA clusters op de PCL films maakte de covalente aanhechting van een gelatine laag mogelijk, en SPR demonstreerde de verhoogde adsorptie en retentie van interessante biomoleculen zoals laminine en fibronectine. Een homogene bedekking van de films met gelatine werd visueel aangetoond via CFM, SEM, en FT-IR mapping. De resultaten van SCA metingen en XPS analyse leverden kwantitatief bewijs voor de aanwezigheid van het proteïne. Opmerkelijk is de vaststelling dat een homogene bedekking reeds kan worden bekomen na een grafttijd van 5 min, resulterend in een uniforme contacthoek van $36^\circ \pm 7^\circ$ ongeacht de graftparameters, en een daling van de oppervlakteruwheid en de standaardafwijking erop. Deze vaststelling rechtvaardigde het gebruik van 5 min grafting voor het uitvoeren van celtesten.

Een eerste reeks verkennende celtesten demonstreerde de uitstekende osteosarcoma celadhesie en proliferatie op PCL-GelB en PCL-Fn films. Verder onderzoek naar specifieke celculturen zal ondernomen worden. Het is duidelijk dat de gehanteerde methodologie interessante toekomstperspectieven biedt voor een efficiënte oppervlaktemodificatie van PCL-gebaseerde tissue engineered scaffolds.

Het printen van scaffolds via de Bioplotter technologie is zeker en vast geen 'plug and play'. Een cruciaal aspect is het verwerven van een goede kennis over de rheologische en thermische eigenschappen van het uitgangspunt. Optimalisatie van de processing temperaturen maakt het mogelijk om goed homogene structuren met uniforme eigenschappen te fabriceren. Hoog poreuze scaffolds met 100 % interconnectiviteit kunnen worden bekomen. De meest homogene PCL structuren met strutdiameters van $241 \pm 12 \mu\text{m}$ en 'repeating lengths' van $827 \pm 15 \mu\text{m}$ werden geplot onder de geometrische vorm van $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ kubussen bij een temperatuur van 120°C . Met behulp van de experimenteel bepaalde afmetingen (SEM) konden uiterste limieten worden berekend voor de porositeit van de scaffolds. Er werd geconcludeerd dat de porositeit, door optimalisatie van de parameters, convergeert naar waarden die de theoretische porositeit dicht benaderen. Een nadeel aan deze berekening is, dat deze in het beste geval slechts een goede schatting geeft (\sim limieten) en enkel kan worden uitgevoerd voor het specifieke geval van 90° patronen. Indien een kwantitatieve berekening van de porositeit gewenst is, dient te worden overgeschakeld naar andere methoden (cfr. μ -CT). Celtesten op de geplote PCL scaffolds worden momenteel ondernomen.

Als algemeen besluit kan gesteld worden dat de gecontroleerde succesvolle synthese van interessante copolymeren voor het creëren van scaffolds werd verwezenlijkt. Daarnaast werd in dit eindwerk ook een succesvolle oppervlaktemodificatie op punt gesteld voor biodegradeerbare polyesters. Eenvoudige scaffolds werden via de 3D-Bioscaffolder technologie gefabriceerd en

de extrusieparameters voor PCL werden geoptimaliseerd.

Verder onderzoek zal verschillende aspecten van dit onderzoek verder uitdiepen. Vooreerst zal de overdraagbaarheid van de ontwikkelde oppervlaktemodificatie naar biodegradeerbare polyester gebaseerde scaffolds nagegaan worden. Een tweede aspect is het fabriceren van elastische scaffolds met de gesynthetiseerde copolymeren, waarbij verschillende strategieën uitgetest zullen worden tot de juiste parameters bekomen worden. Ook op deze scaffolds zal bekeken worden of de oppervlaktemodificatie een meerwaarde kan vormen.

Het is ons geloof dat de juiste combinatie van RP technieken, geschikte polymeermaterialen, oppervlaktemodificatie en moderne celkweektechnieken de hoogste slaagkans biedt voor het creëren van succesvolle tissue engineering scaffolds.

Bibliografie

- [1] JB Park and RS Lakes. *Biomaterials: An Introduction*, chapter 1. Springer, third edition, 2007.
- [2] T Desmet, E Schacht, and P Dubruel. *Tissue Engineering: Roles, Materials and Applications*, chapter 7. Nova Science Publishers, Inc., 2008.
- [3] JB Park and YK Kim. *The Biomedical Engineering Handbook*, chapter 37. CRC Press LLC, second edition, 2000.
- [4] PK Chu, JY Chen, LP Wang, and N Huang. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering R*, 36:143–206, 2002.
- [5] R Lakes. *The Biomedical Engineering Handbook*, chapter 40. CRC Press LLC, second edition, 2000.
- [6] SM Best, AE Porter, ES Thian, and J Huang. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*, 28:1319–1327, 2008.
- [7] WG Billotte. *The Biomedical Engineering Handbook*, chapter 38. CRC Press LLC, second edition, 2000.
- [8] HB Lee, G Khang, and JH Lee. *The Biomedical Engineering Handbook*, chapter 39. CRC Press LLC, second edition, 2000.
- [9] CC Chu. *The Biomedical Engineering Handbook*, chapter 41. CRC Press LLC, second edition, 2000.
- [10] M Vert, SM Li, and H Garreau. Attempts to map the structure and degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomater Sci Polym Ed*, 6(7):639–649, 1994. ISSN 0920-5063 (Print).
- [11] M Vert, SM Li, G Spenlehauer, and P Guerin. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science-Materials In Medicine*, 3:432–446, 1992.
- [12] federale overheidsdienst. Organen: Wetgeving: Enkele cijfers. URL <https://portal.health.fgov.be>.
- [13] R Langer and JP Vacanti. Tissue engineering. *Science*, 260(5110):920–926, 1993.
- [14] LJ Bonassar and CA Vacanti. Tissue engineering: The first decade and beyond. *Journal of Cellular Biochemistry*, pages 297–303, 1998.

- [15] F Berthiaume and ML Yarmush. *The Biomedical Engineering Handbook*, chapter 8. CRC Press LLC, third edition, 2003.
- [16] LG Griffith and G Naughton. Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities. *Science*, 295:1009–1016, 2002. Science.
- [17] DL Butler, JT Shearn, N Juncosa, MR Dressler, and SA Hunter. Functional tissue engineering parameters toward designing repair and replacement strategies. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, pages S190–S199, 2004.
- [18] JM Goddard and JH Hotchkiss. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress In Polymer Science*, 32:698–725, 2007.
- [19] PX Ma. Scaffolds for tissue fabrication. *Materialstoday*, pages 30–40, may 2004.
- [20] SM Peltola, FPW Melchels, DW Grijpma, and M Kellomaki. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of Medicine*, 40:268–280, 2008. Annals of Medicine.
- [21] WY Yeong, CK Chua, KF Leong, and M Chandrasekaran. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends In Biotechnology*, 22:643–652, 2004.
- [22] E Sachlos and JT Czernuszka. Making tissue engineering scaffolds work. review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*, 5:29–40, 2003.
- [23] PS Maher, RP Keatch, K Donnely, and JZ Paxton. Formed 3d bio-scaffolds via rapid prototyping technology. In J. Vandersloten, P. Verdonck, M. Nyssen, and J. Haueisen, editors, *Engineering for Health*, volume 22 of *European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering*. IFMBE, november 2008.
- [24] V Mironov, G Prestwich, and G Forgacs. Bioprinting living structures. *Journal of Materials Chemistry*, 17:2054–2060, 2007.
- [25] QZ Chen, SE Harding, NN Ali, AR Lyon, and AR Boccaccini. Biomaterials in cariac tissue engineering: Ten years of research survey. *Materials Science and Engineering R*, 59:1–37, 2008.
- [26] Y Ikada. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 3: 589–601, 2006. Journal of the Royal Society Interface.
- [27] L Hayflick. Limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37:614–636, 1965.
- [28] AG Bodnar, M Ouellette, M Frolkis, SE Holt, CP Chiu, GB Morin, CB Harley, JW Shay, S Lichtsteiner, and WE Wright. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279:349–352, 1998.
- [29] CJ Kirkpatrick, S Fuchs, MI Hermanns, K Peters, and RE Unger. Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*, 28: 5193–5198, 2007.

- [30] Y Chung, I Klimanskaya, S Becker, T Li, M Maserati, SJ Lu, T Zdravkovic, D Ilic, O Genbacev, S Fisher, A Krtolica, and R Lanza. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*, 2:113–117, 2008. Cell Stem Cell.
- [31] L Moroni. *A Mechanistic Approach to Design Smart Scaffolds for Tissue Engineering*. PhD thesis, University of Twente, 2006.
- [32] L Moroni, J De Wijn, and CA Van Blitterswijk. 3d plotted scaffolds for tissue engineering: Dynamical mechanical analysis. *European Cells and Materials*, 7:68, 2004.
- [33] I Martin, D Wendt, and M Heberer. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends In Biotechnology*, 22:80–86, 2004. Trends In Biotechnology.
- [34] JS Stephens, JA Cooper, FR Jr Phelan, and JP Dunkers. Perfusion flow bioreactor for 3d in situ imaging: investigating cell/biomaterials interactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4):952–961, 2007. ISSN 0006-3592 (Print).
- [35] JA Chinn and SM Slack. *The Biomedical Engineering Handbook*, chapter 111. CRC Press LLC, second edition, 2000.
- [36] Y Zhou, F Chen, ST Ho, MA Woodruff, TM Lim, and DW Hutmacher. Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high-strength biodegradable composite scaffolds for engineered functional bone grafts. *Biomaterials*, 28(5):814–824, 2007. ISSN 0142-9612 (Print).
- [37] HCH Ko, BK Milthorpe, and CD McFarland. Engineering thick tissues - the vascularisation problem. *European Cells and Materials*, 14:1–18, 2007.
- [38] R Landers, A Pfister, U Hubner, H John, R Schmelzeisen, and R Mulhaupt. Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques. *Journal of Materials Science*, 37:3107–3116, 2002.
- [39] A Ohl and K Schroder. Plasma-induced chemical micropatterning for cell culturing applications: a brief review. *Surface and Coatings Technology*, 116:820–830, 1999. Surface & Coatings Technology.
- [40] YL Cao, JP Vacanti, KT Paige, J Upton, and CA Vacanti. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 100:297–302, 1997.
- [41] JM Anderson, A Rodriguez, and DT Chang. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars In Immunology*, 20:86–100, 2008.
- [42] P Roach, D Eglin, and K Rohde. Modern biomaterials: a review – bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Material Science*, 18:1263–1277, 2007.
- [43] KS Siow, L Britcher, S Kumar, and HJ Griesser. Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - a review. *Plasma Processes and Polymers*, 3:392–418, 2006. Plasma Processes and Polymers.

- [44] DSW Benoit, MP Schwartz, AR Durney, and KS Anseth. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nature Materials*, 7:816–823, 2008.
- [45] CK Chua, KF Leong, and CS LIM. *Rapid Prototyping: Principles and Applications*. World Scientific, second edition, 2004.
- [46] DW Hutmacher. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21:2529–2543, 2000.
- [47] GH Kim and JG Son. 3d polycaprolactone (pcl) scaffold with hierarchical structure fabricated by a piezoelectric transducer (pzt)-assisted bioplotter. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 2008.
- [48] JJ Stankus, L Soletti, K Fujimoto, Y Hong, DA Vorp, and WR Wagner. Fabrication of cell microintegrated blood vessel constructs through electrohydrodynamic atomization. *Biomaterials*, 28:2738–2746, 2007.
- [49] PD Drumheller and JA Hubbell. *The Biomedical Engineering Handbook*, chapter 110. CRC Press LLC, second edition, 2000.
- [50] CJ Hsieh. *Studies on surface modifications of materials for tissue engineering applications*. PhD thesis, National Taiwan University, 2000.
- [51] MSK Chong, CN Lee, and SH Teoh. Characterization of smooth muscle cells on poly(epsilon-caprolactone) films. *Materials Science and Engineering C*, 27:309–312, 2007.
- [52] ZY Cheng and SH Teoh. Surface modification of ultra thin poly (epsilon-caprolactone) films using acrylic acid and collagen. *Biomaterials*, 25:1991–2001, 2004.
- [53] N Tsubokawa, K Maruyama, Y Sone, and M Shimomura. Graft-polymerisation of acrylamide from ultrafine silica particles by use of a redox system consisting of ceric ion and reducing groups on the surface. *Polymer Journal*, 21(6):1458–1460, 1989.
- [54] pierce protein research products. Edc (1-ethyl-3[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride). URL <http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=ProductFamily&ID=020303> 12.
- [55] SI Jeong, BS Kim, YM Lee, KJ Ihn, SH Kim, and YH Kim. Morphology of elastic poly(l-lactide-co-epsilon-caprolactone) copolymers and in vitro and in vivo degradation behavior of their scaffolds. *Biomacromolecules*, 5:1303–1309, 2004.
- [56] VB Ivanov, J Behnisch, A Hollander, F Mehdorn, and H Zimmermann. Determination of functional groups on polymer surfaces using fluorescence labelling. *Surface and Interface Analysis*, 24:257–262, 1996.
- [57] K Hoffmann, U Resch-Genger, R Mix, and JF Friedrich. Fluorescence spectroscopic studies on plasma-chemically modified polymer surfaces with fluorophore-labeled functionalities. *Journal of Fluorescence*, 16:441–448, 2006.

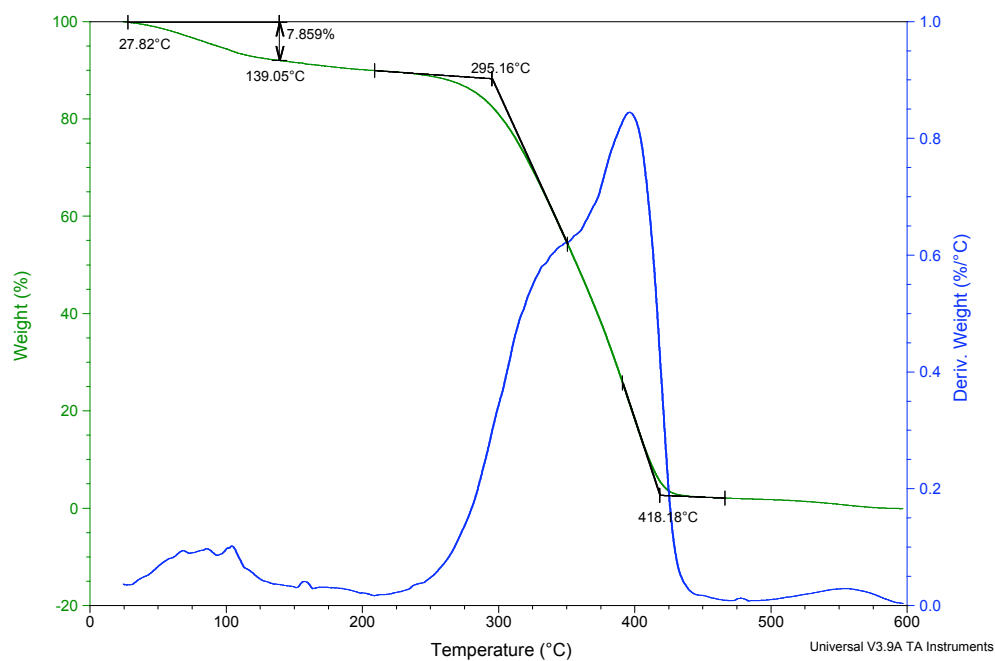
- [58] YB Zhu, CY Gao, and JC Shen. Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility. *Biomaterials*, 23:4889–4895, 2002.
- [59] ST Ho and DW Hutmacher. A comparison of micro ct with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*, 27:1362–1376, 2006.
- [60] HA Declercq, TL Gorski, EH Schacht, and MJ Cornelissen. Osteoblast behaviour on in situ photopolymerizable three-dimensional scaffolds based on d,l-lactide and epsilon-caprolactone: influence of pore volume, pore size and pore shape. *Journal of Material Science*, 19:3105–3114, 2008.
- [61] D Cohn and AF Salomon. Designing biodegradable multiblock pcl/pla thermoplastic elastomers. *Biomaterials*, 26:2297–2305, 2005.
- [62] T Desmet, P Dubruel, M Rymarczyk-Machal, N De Smet, and E Schacht. Poly(2-aminoethyl-methacrylate) grafted poly-epsilon-caprolactone surfaces for the development of cell-interactive biomaterials. In AC Albertsson and M Hakkarainen, editors, *Renewable, Degradable and Biomedical Polymers*, International Workshop on Biomacromolecules. European Polymer Federation, June 2008.
- [63] YB Zhu, KS Chian, MB Chan-Park, PS Mhaisalkar, and BD Ratner. Protein bonding on biodegradable poly(l-lactide-co-caprolactone) membrane for esophageal tissue engineering. *Biomaterials*, 27:68–78, 2006.
- [64] Y Baimark and R Molloy. Synthesis and characterization of poly(l-lactide-co-epsilon-caprolactone) copolymers: Effects of stannous octoate initiator and diethylene glycol coinitiator concentrations. *ScienceAsia*, 30:327–334, 2001.
- [65] C Jerome and P Lecomte. Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(9):1056–1076, 2008. ISSN 0169-409X (Print).
- [66] S Jacobsen, HG Fritz, and R Jerome. Polylactide - a new way of production. *Polymer Engineering and Science*, 39(7):1311–1319, 2004.
- [67] A Kowalski, J Libiszowski, K Majerska, A Duda, and S Penczek. Kinetics and mechanism of epsilon-caprolactone and l,l-lactide polymerization coinitiated with zinc actoate or aluminum acetylacetonate: the next proofs for the general alkoxide mechanism and synthetic applications. *Polymer*, 48:3952–3960, 2007.
- [68] T Biela, A Duda, K Rode, and H Pasch. Characterization of star-shaped poly(l-lactide)s by liquid chromatography at critical conditions. *Polymer*, 44:1851–1860, 2003.
- [69] J Mohammadi-Rovshandeh. Synthesis and thermal properties of novel multiblock biodegradable copolymers derived from polyethylene glycol, epsilon-caprolactone and p-dioxanone. *Scienceasia*, 34:207–213, 2008.
- [70] Y Nakayama, S Okuda, H Yasuda, and T Shiono. Synthesis of multiblock poly(l-lactide)-co-poly(epsilon-caprolactone) from hydroxy-telechelic prepolymers prepared by using neodymium tetrahydroborate. *Reactive and Functional Polymers*, 67:798–806, 2007.

- [71] G Rokicki, A Piotrowska, and P Pawlowski. Macrocyclic vs. linear polymer formation in the coordination-insertion polymerization of cyclic carbonates. *Polymer Journal*, 35(2):133–140, 2003.
- [72] G Marletta, G Ciapetti, C Satriano, S Pagani, and N Baldini. The effect of irradiation modification and rgd sequence adsorption on the response of human osteoblasts to polycaprolactone. *Biomaterials*, 26(23):4793–4804, 2005. ISSN 0142-9612 (Print).
- [73] G Marletta, G Ciapetti, C Satriano, F Perut, M Salerno, and N Baldini. Improved osteogenic differentiation of human marrow stromal cells cultured on ion-induced chemically structured poly-epsilon-caprolactone. *Biomaterials*, 28(6):1132–1140, 2007. ISSN 0142-9612 (Print).
- [74] M Suzuki, A Kishida, H Iwata, and Y Ikada. Graft-copolymerization of acrylamide onto a polyethylene surface pretreated with a glow-discharge. *Macromolecules*, 19:1804–1808, 1986.
- [75] HE Wagner, R Brandenburg, KV Kozlov, A Sonnenfeld, P Michel, and JF Behnke. The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment. *Vacuum*, 71:417–436, 2003. Vacuum.
- [76] AN Bhoj and MJ Kushner. Plasma-polymer interactions in a dielectric barrier discharge. *Ieee Transactions On Plasma Science*, 33:250–251, 2005.
- [77] FS Denes and S Manolache. Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science. *Progress In Polymer Science*, 29:815–885, 2004. Progress In Polymer Science.
- [78] GJ Pietsch. Peculiarities of dielectric barrier discharges. *Contributions To Plasma Physics*, 41:620–628, 2001. Contributions To Plasma Physics.
- [79] ED Yildirim, H Ayan, VN Vasilets, A Fridman, S Guceri, and W Sun. Effect of dielectric barrier discharge plasma on the attachment and proliferation of osteoblasts cultured over poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *Plasma Processes and Polymers*, 5:58–66, 2008.
- [80] KL Thompson, ES Read, and SP Armes. Chemical degradation of poly(2-aminoethyl methacrylate). *Polymer Degradation and Stability*, 93:1460–1466, 2008.
- [81] HY Yu, JM He, LQ Liu, XC He, JS Gu, and XW Wei. Photoinduced graft polymerization to improve antifouling characteristics of an smbr. *Journal of Membrane Science*, 302:235–242, 2007.
- [82] B Boutevin, Y Pietrasanta, JJ Robin, and T Pollet. Synthesis of copolymers by grafting polystyrene onto polyvinyl-chloride. *European Polymer Journal*, 24:953–959, 1988.
- [83] T Fargere, M Abdennadher, M Delmas, and B Boutevin. Determination of peroxides and hydroperoxides with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph). application to ozonized ethylene vinyl acetate copolymers (eva). *Eur. Polym. J.*, 31(5):489–497, 1995.
- [84] P Molyneux. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (dpph) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2):211–219, 2004.

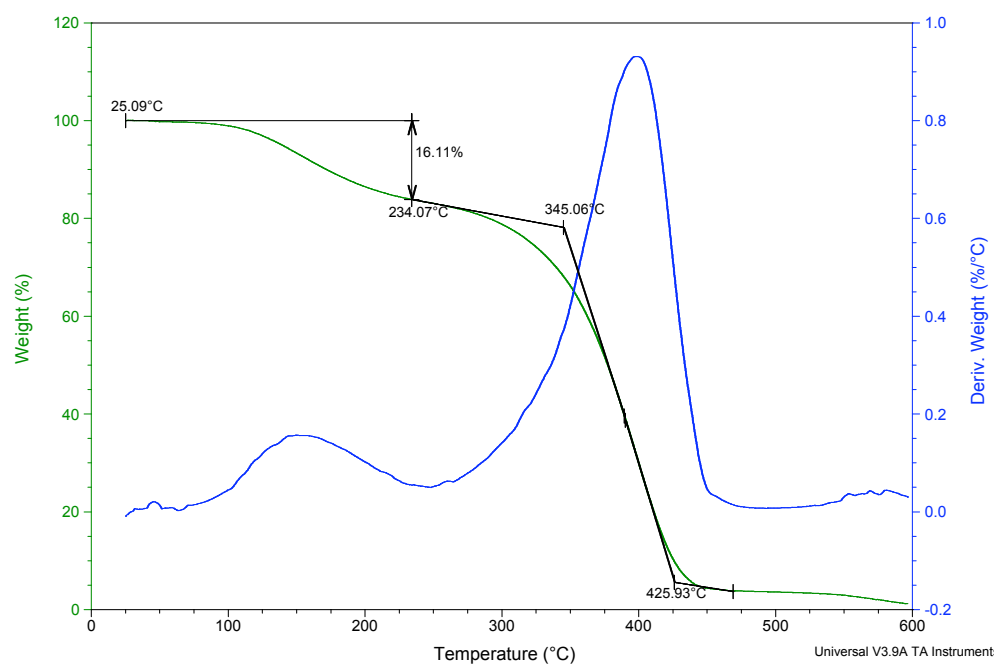
- [85] Y Zhu, C Gao, X Liu, and J Shen. Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells. *Biomacromolecules*, 3(6):1312–1319, 2002. ISSN 1525-7797 (Print).
- [86] Y Gong, Y Zhu, Y Liu, Z Ma, C Gao, and J Shen. Layer-by-layer assembly of chondroitin sulfate and collagen on aminolyzed poly(l-lactic acid) porous scaffolds to enhance their chondrogenesis. *Acta Biomater*, 3(5):677–685, 2007. ISSN 1742-7061 (Print).
- [87] DB Hansen and MM Joullie. The development of novel ninhydrin analogues. *Chem Soc Rev*, 34(5):408–417, 2005. ISSN 0306-0012 (Print).
- [88] JJ Sun, CJ Bae, YH Koh, HE Kim, and HW Kim. Fabrication of hydroxyapatite-poly(epsilon-caprolactone) scaffolds by a combination of the extrusion and bi-axial lamination processes. *J Mater Sci Mater Med*, 18(6):1017–1023, 2007. ISSN 0957-4530 (Print).
- [89] Invitrogen. Product highlight: The alexa fluor dye series - note 1.1. URL [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-% The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/The-Alexa-Fluor-Dye-Series% .html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-%20The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/The-Alexa-Fluor-Dye-Series%.html).
- [90] K De Wael, S Van Vlierberghe, H Buschop, P Dubruel, B Vekemans, E Schacht, L Vincze, and A Adriaens. Surface characterization of a cross-linked cytochrome c film on cysteamine modified gold electrodes. *Surface and Interface Analysis*, 41(5):389–393, 2009.
- [91] S Van Vlierberghe. *Cell-Interactive Biopolymer-based Hydrogels designed for Tissue Engineering*. PhD thesis, Ghent University, 2008.
- [92] S Park, G Kim, YC Jeon, Y Koh, and W Kim. 3d polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system. *J Mater Sci Mater Med*, 20(1):229–234, 2009. ISSN 0957-4530 (Print).
- [93] P Yilgor, RA Sousa, Reis RL, N Hasirci, and V Hasirci. 3d plotted pcl scaffolds for stem cell based bone tissue engineering. *Macromolecules*, 269:92–99, 2008.
- [94] J Mas Estelles, A Vidaurre, JM Meseguer Duenas, and I Castilla Cortazar. Physical characterization of polycaprolactone scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*, 19(1):189–195, 2008. ISSN 0957-4530 (Print).
- [95] DW Hutmacher, T Schantz, I Zein, KW Ng, SH Teoh, and KC Tan. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res*, 55(2):203–216, 2001. ISSN 0021-9304 (Print).
- [96] SW Myung, YH Yeom, YM Jang, HS Choi, and D Cho. Preparation of a reticulated polyurethane foam grafted with poly(acrylic acid) through atmospheric pressure plasma treatment and its lysozyme immobilization. *J Mater Sci Mater Med*, 16(8):745–751, 2005. ISSN 0957-4530 (Print).

- [97] CY Huang, WL Lu, and YC Feng. Effect of plasma treatment on the aac grafting percentage of high-density polyethylene. *Surface and Coatings Technology*, 167:1–10, 2003.
- [98] S Turmanova, M Minchev, K Vassilev, and G Danev. Surface grafting polymerization of vinyl monomers on poly(tetrafluoroethylene) films by plasma treatment. *J Polym Res*, 15:309–318, 2008.
- [99] ZW Ma, W He, T Yong, and S Ramakrishna. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. *Tissue Engineering*, 11(7-8):1149–1158, 2005.
- [100] Y Tsujii, K Ohno, S Yamamoto, A Goto, and T Fukuda. Structure and properties of high-density polymer brushes prepared by surface-initiated living radical polymerization. *Surface-Initiated Polymerization I*, 197:1–45, 2006. Surface-Initiated Polymerization I.
- [101] L Moroni, R Schotel, J Sohler, JR de Wijn, and CA van Blitterswijk. Polymer hollow fiber three-dimensional matrices with controllable cavity and shell thickness. *Biomaterials*, 27(35):5918–5926, 2006.

Appendix A: TGA thermogrammen



TGA thermogram van poly(D,L-LA-co-ε-CL) BMA random copolymeren, batch 2



TGA thermogram van vernette poly(D,L-LA-co-ε-CL) BMA random copolymeren, batch 3

Appendix B: Statistische gegevens (ninhydrine assay)

| REEKS IM | n | gemiddelde | standaarddeviatie | p-waarde | Ho aanvaarden? ($\alpha=0,01$) |
|----------|---|------------|-------------------|----------|-------------------------------------|
| 5 min | 3 | 0,0172 | 0,003 | | |
| | 2 | 0,0195 | 0,012 | 0,835 | ja |
| 10 min | 1 | 0,0132 | NA | | |
| | 3 | 0,0210 | 0,011 | 0,354 | ja |
| 30 min | 2 | 0,0424 | 0,000 | | |
| | 2 | 0,0386 | 0,009 | 0,661 | ja |
| 45 min | 3 | 0,0838 | 0,013 | | |
| | 2 | 0,0876 | 0,009 | 0,730 | ja |

Statistische gegevens met betrekking tot reproduceerbaarheid

| t-test | Grafting met 1M AEMA oplossing | | Grafting met 0,5M AEMA oplossing | | Grafting met 0,1M AEMA oplossing | |
|---------------|--------------------------------|---|----------------------------------|---|----------------------------------|---|
| | p-waarde | H ₀ aanvaarden? ($\alpha=0,01$) | p-waarde | H ₀ aanvaarden? ($\alpha=0,01$) | p-waarde | H ₀ aanvaarden? ($\alpha=0,01$) |
| blanco-5 min | 0,003 | neen | 0,115 | ja | 0,038 | neen (†) |
| blanco-10 min | 0,032 | neen (†) | 0,006 | neen | NP | NP |
| blanco-15 min | 0,002 | neen | 0,153 | ja | 0,255 | ja |
| blanco-30 min | 0,001 | neen | 0,085 | ja | 0,017 | neen (†) |
| blanco-45 min | 0,008 | neen | 0,001 | neen | 1,39E-04 | neen |
| blanco-60 min | 5,44E-05 | neen | 0,017 | neen (†) | 0,012 | neen (†) |
| 5-10 min | 0,877 | ja | 0,245 | ja | NP | NP |
| 5-15 min | 0,105 | ja | 1,000 | ja | 0,922 | ja |
| 5-30 min | 0,001 | neen | 0,116 | ja | 0,113 | ja |
| 5-45 min | 0,005 | neen | 1,36E-04 | neen | 0,126 | ja |
| 5-60 min | 8,80E-06 | neen | 0,016 | neen (†) | 0,135 | ja |
| 10-15 min | 0,372 | ja | 0,301 | ja | NP | NP |
| 10-30 min | 0,015 | neen (†) | 0,159 | ja | NP | NP |
| 10-45 min | 0,005 | neen | 0,001 | neen | NP | NP |
| 10-60 min | 3,48E-05 | neen | 0,020 | neen (†) | NP | NP |
| 15-30 min | 0,007 | neen | 0,114 | ja | 0,416 | ja |
| 15-45 min | 0,022 | neen (†) | 0,000 | neen | 0,499 | ja |
| 15-60 min | 1,23E-04 | neen | 0,016 | neen | 0,488 | ja |
| 30-45 min | 0,124 | ja | 0,074 | ja | 0,687 | ja |
| 30-60 min | 1,44E-04 | neen | 0,019 | neen (†) | 0,742 | ja |
| 45-60 min | 0,003 | neen | 0,130 | ja | 0,986 | ja |

(†): $\alpha = 0,05$

Statistische gegevens met betrekking tot meetpunten uit eenzelfde curve

| t-test | reeksen 1M en 0,5M | | reeksen 1M en 0,1M | | reeksen 0,5M en 0,1M | |
|-----------------|--------------------|---|--------------------|---|----------------------|---|
| | p-waarde | H ₀ aanvaarden? ($\alpha=0,01$) | p-waarde | H ₀ aanvaarden? ($\alpha=0,01$) | p-waarde | H ₀ aanvaarden? ($\alpha=0,01$) |
| 5 min - 5 min | 0,004 | neen | 0,047 | neen (†) | 0,045 | neen (†) |
| 10 min - 10 min | 0,050 | neen (†) | NA | NA | NA | NA |
| 15 min - 15 min | 1,39E-04 | neen | 0,160 | ja | 0,298 | ja |
| 30 min - 30 min | 0,001 | neen | 0,001 | neen | 0,302 | ja |
| 45 min - 45 min | 0,018 | neen (†) | 0,014 | neen (†) | 0,009 | neen |
| 60 min - 60 min | 1,53E-04 | neen | 3,64E-05 | neen | 0,040 | neen (†) |

(†): $\alpha = 0,05$

Statistische gegevens voor onderlinge curves

Appendix C: Statistische gegevens (contacthoekmetingen)

| REEKS 1M | n | gemiddelde | standaardafwijking | p-waarde | Ho aanvaarden? ($\alpha=0,01$) |
|----------|---|------------|--------------------|----------|-------------------------------------|
| 5 min | 6 | 68,12 | 3,74 | | |
| 5 min | 6 | 66,14 | 3,78 | 0,385 | ja |
| 10 min | 6 | 67,52 | 2,30 | | |
| 10 min | 3 | 67,97 | 4,79 | 0,889 | ja |
| 30 min | 5 | 57,37 | 6,40 | | |
| 30 min | 6 | 67,88 | 1,83 | 0,019 | ja |
| 60 min | 5 | 51,20 | 4,91 | | |
| 60 min | 7 | 54,56 | 4,04 | 0,247 | ja |

Statistische gegevens met betrekking tot reproduceerbaarheid

| t-test | n _{tot} | df | p-waarde | Ho aanvaarden? ($\alpha=0,01$) |
|-----------|------------------|----|----------|-------------------------------------|
| bl-5 min | 18 | 16 | 1,54E-08 | neen |
| bl-10 min | 15 | 13 | 2,07E-07 | neen |
| bl-15 min | 15 | 13 | 4,54E-05 | neen |
| bl-30 min | 17 | 15 | 6,01E-06 | neen |
| bl-45 min | 14 | 12 | 3,54E-06 | neen |
| bl-60 min | 18 | 16 | 3,75E-11 | neen |
| 5-10 min | 21 | 19 | 0,719 | ja |
| 5-15 min | 21 | 19 | 0,846 | ja |
| 5-30 min | 23 | 21 | 0,108 | ja |
| 5-45 min | 20 | 18 | 0,002 | neen |
| 5-60 min | 24 | 22 | 4,85E-08 | neen |
| 10-15 min | 18 | 16 | 0,653 | ja |
| 10-30 min | 20 | 18 | 0,069 | ja |
| 10-45 min | 17 | 15 | 0,001 | neen |
| 10-60 min | 21 | 19 | 4,48E-08 | neen |
| 15-30 min | 20 | 18 | 0,211 | ja |
| 15-45 min | 17 | 15 | 0,008 | neen |
| 15-60 min | 21 | 19 | 2,04E-05 | neen |
| 30-45 min | 17 | 15 | 0,146 | ja |
| 30-60 min | 23 | 21 | 0,001 | neen |
| 45-60 min | 20 | 18 | 0,023 | neen (†) |

(†): $\alpha = 0,05$

Statistische gegevens met betrekking tot meetpunten uit eenzelfde curve (1M)

| t-test | n_{tot} | df | p-waarde | Ho aanvaarden? ($\alpha=0,01$) |
|---------------|------------------------|-----------|-----------------|--|
| bl-5 min | 13 | 11 | 1,94E-04 | neen |
| bl-10 min | 16 | 14 | 7,75E-08 | neen |
| bl-15 min | 16 | 14 | 5,40E-06 | neen |
| bl-30 min | 17 | 15 | 5,24E-07 | neen |
| bl-45 min | 10 | 8 | 0,005 | neen |
| bl-60 min | 14 | 12 | 3,23E-08 | neen |
| 5-10 min | 17 | 15 | 0,963 | ja |
| 5-15 min | 17 | 15 | 0,942 | ja |
| 5-30 min | 18 | 16 | 0,148 | ja |
| 5-45 min | 11 | 9 | 0,066 | ja |
| 5-60 min | 15 | 13 | 6,23E-05 | neen |
| 10-15 min | 20 | 18 | 0,885 | ja |
| 10-30 min | 21 | 19 | 0,068 | ja |
| 10-45 min | 14 | 12 | 0,066 | ja |
| 10-60 min | 18 | 16 | 3,31E-06 | neen |
| 15-30 min | 21 | 19 | 0,132 | ja |
| 15-45 min | 14 | 12 | 0,069 | ja |
| 15-60 min | 18 | 16 | 9,24E-06 | neen |
| 30-45 min | 15 | 13 | 0,244 | ja |
| 30-60 min | 19 | 17 | 2,95E-04 | neen |
| 45-60 min | 12 | 10 | 0,187 | ja |

(†): $\alpha = 0,05$

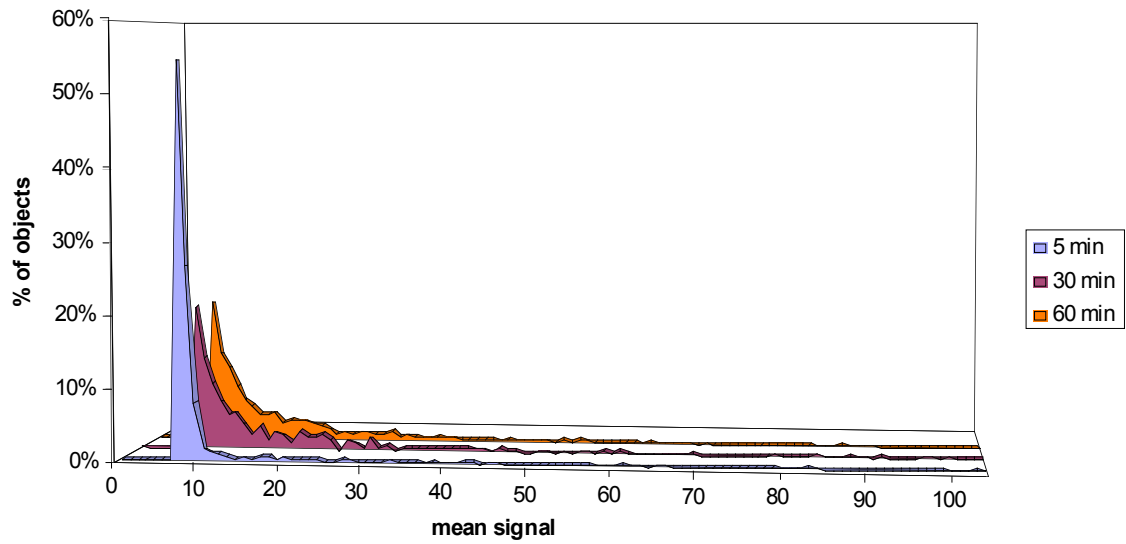
Statistische gegevens met betrekking tot meetpunten uit eenzelfde curve (0,5M)

| t-test | n_{tot} | df | p-waarde | Ho aanvaarden? ($\alpha=0,01$) |
|---------------|------------------------|-----------|-----------------|--|
| 5-5 min | 19 | 17 | 0,008 | neen |
| 10-10 min | 19 | 17 | 0,003 | neen |
| 15-15 min | 19 | 17 | 0,028 | neen (†) |
| 30-30 min | 22 | 20 | 0,016 | neen (†) |
| 45-45 min | 12 | 10 | 0,028 | neen (†) |
| 60-60 min | 20 | 18 | 1,51E-05 | neen |

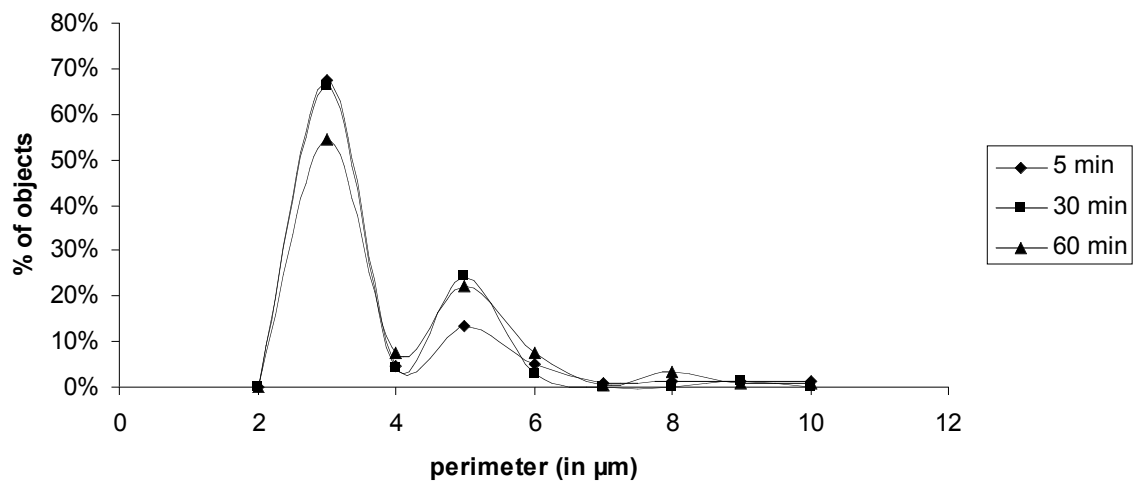
(†): $\alpha = 0,05$

Statistische gegevens voor onderlinge curves

Appendix D: Statistische gegevens (confocale fluorescentie microscopie)

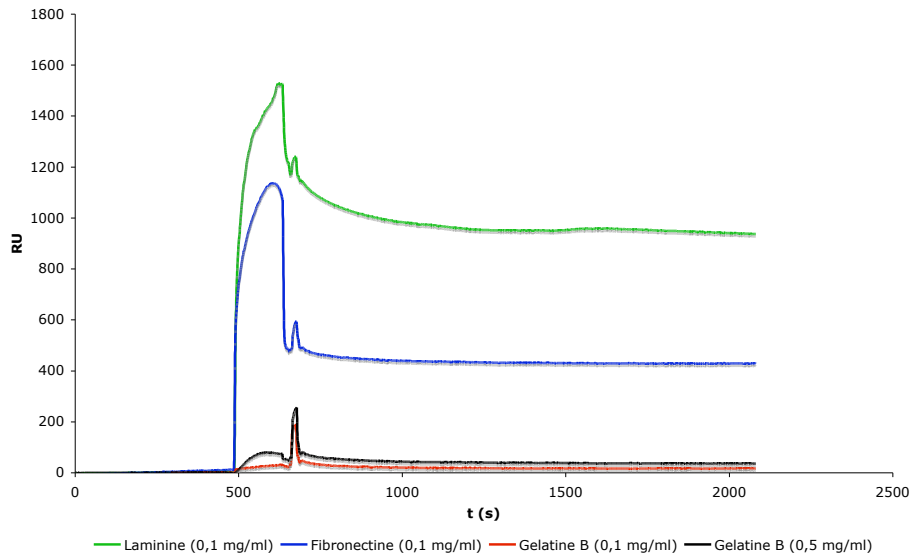


Distributie van het gemiddelde signaal van de spots

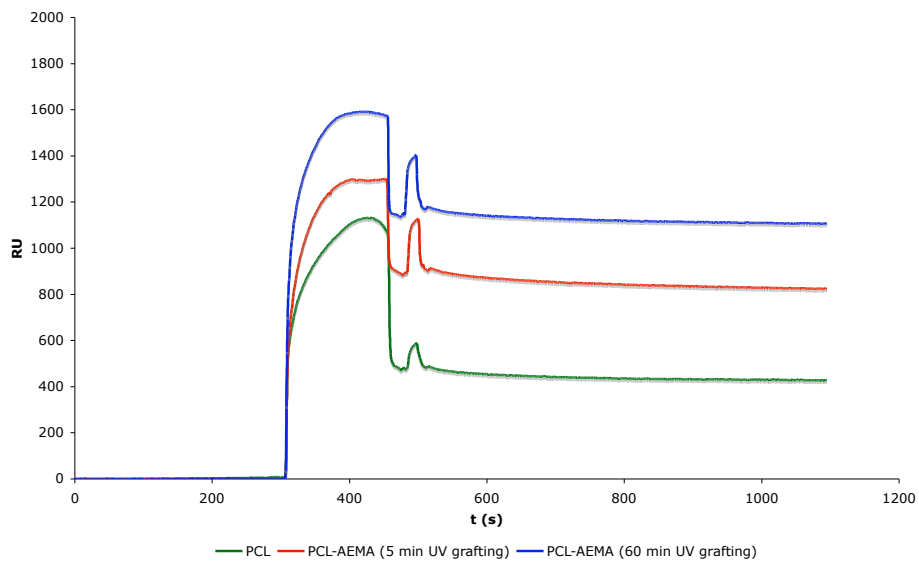


Perimeter van de opgemeten objecten

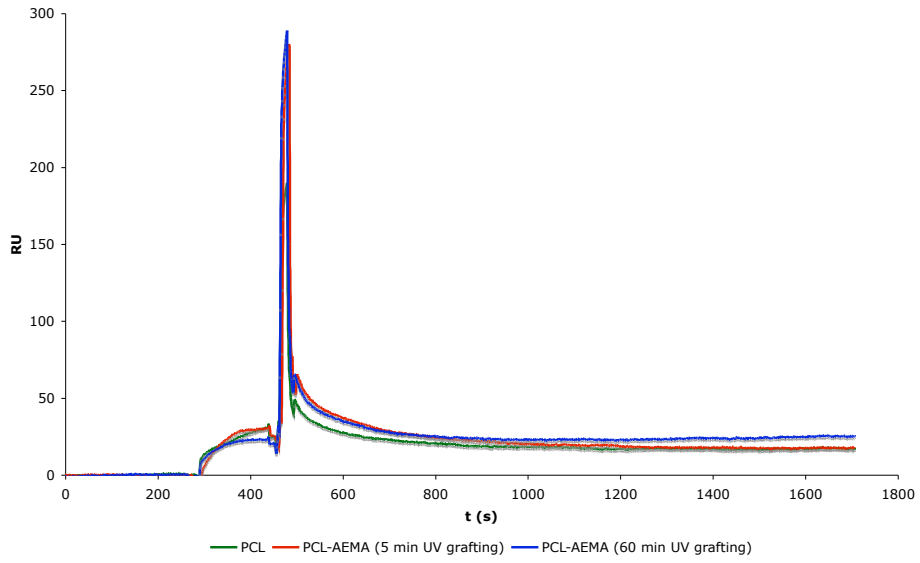
Appendix E: Statistische gegevens (confocale fluorescentie microscopie)



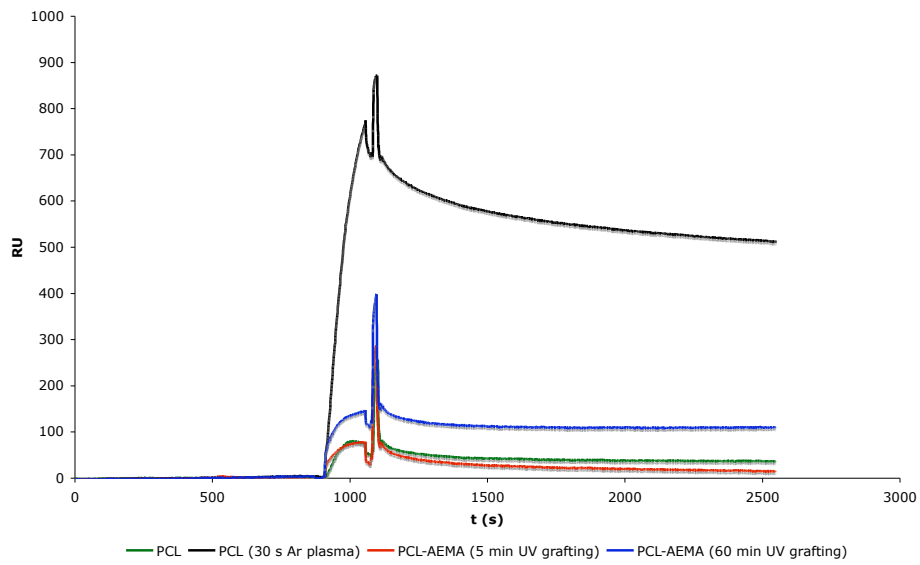
Proteïne affiniteiten voor PCL films



Sensogram voor 0,1 mg/ml fibronectine op PCL en PCL-AEMA



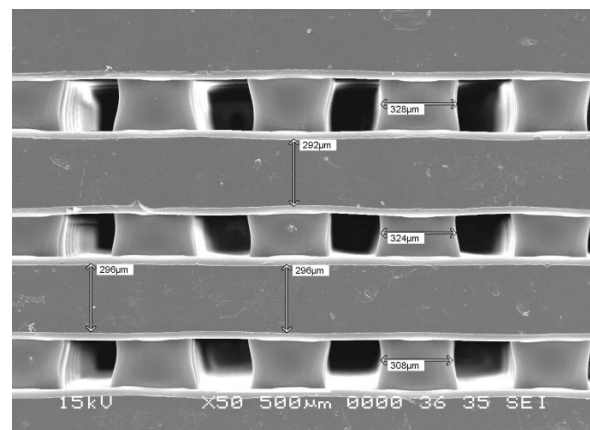
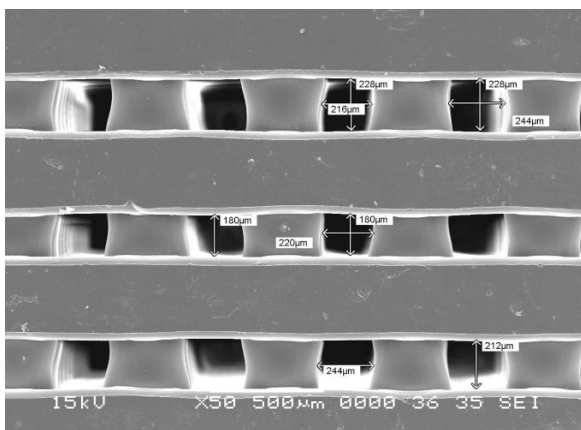
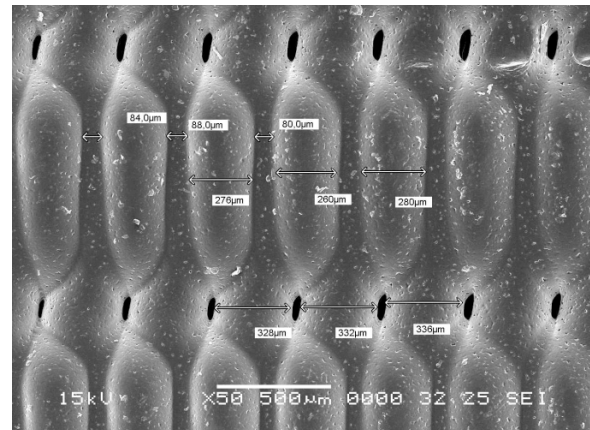
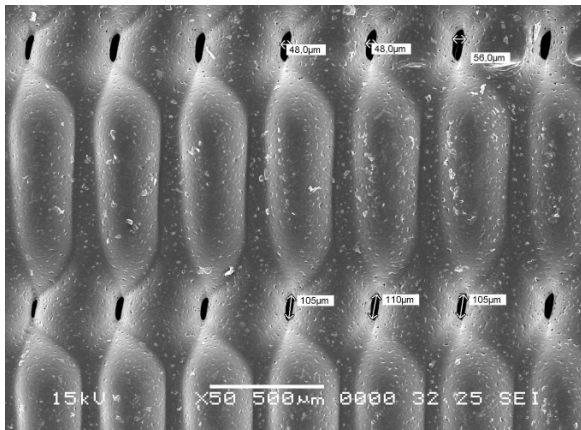
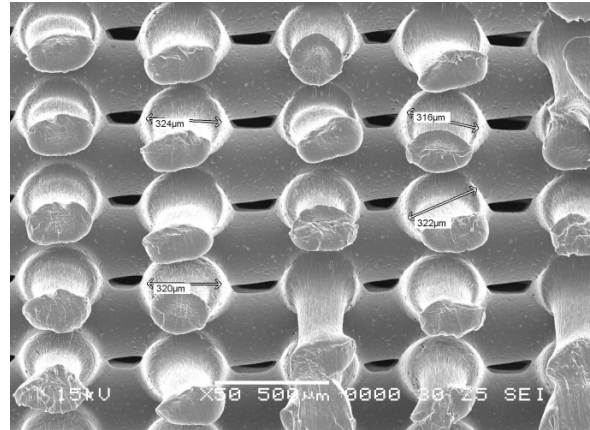
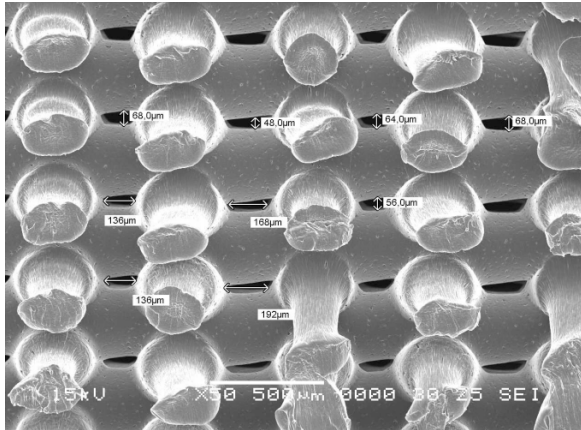
Sensogram voor 0,1 mg/ml GelB op PCL en PCL-AEMA



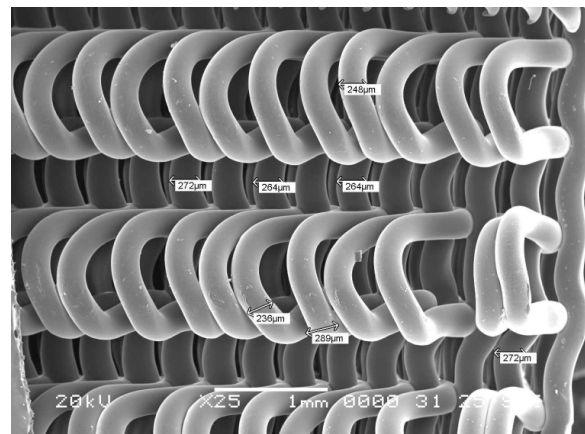
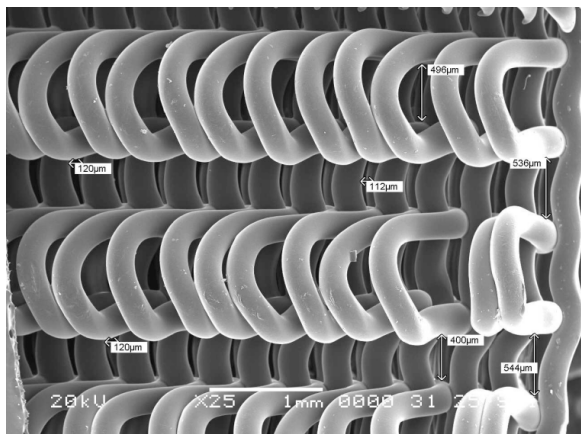
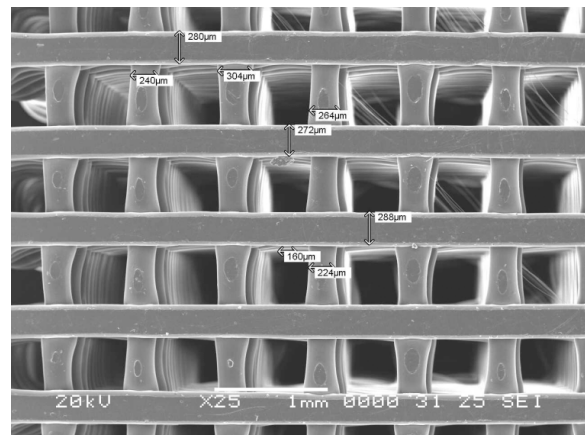
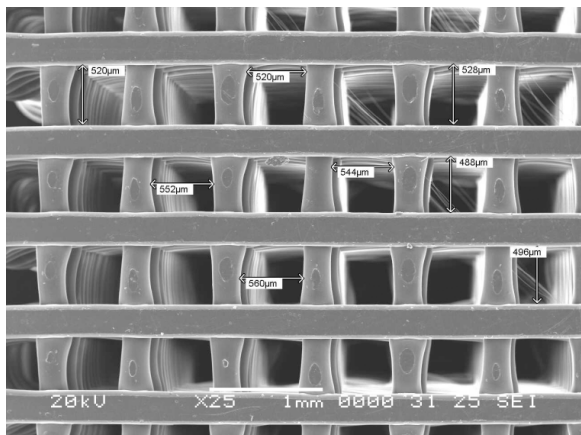
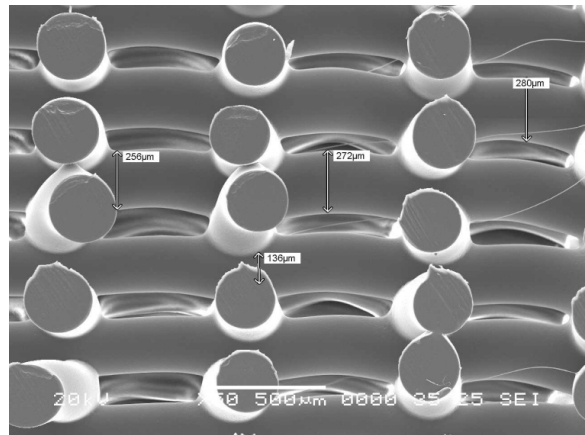
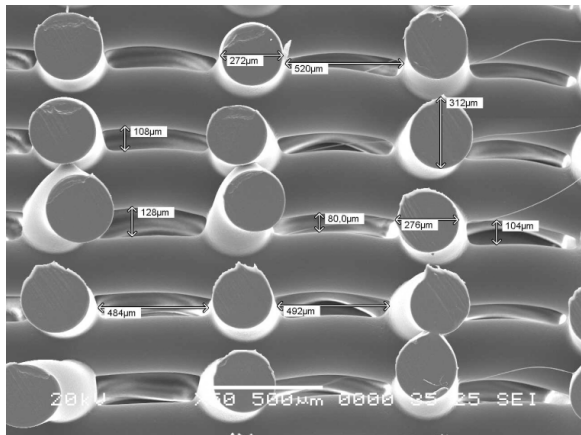
Sensogram voor 0,5 mg/ml GelB op PCL en PCL-AEMA

Appendix F: SEM karakterisatie van PCL scaffolds

Experiment nr. 1



Experiment nr. 3



Experiment nr. 4

