

Doctoral Thesis for the degree of Doctor of Philosophy (Medicine)

Engineering tissue –
Bacterial cellulose as a potential biomaterial

Maricris Esguerra

Institute of Clinical Sciences, Department of Surgery,
Sahlgrenska Academy,
University of Gothenburg,
Sweden
2010



UNIVERSITY OF GOTHENBURG

A Doctoral Thesis at a University in Sweden is produced either as a monograph or as a collection of papers. In the latter case, the introductory part constitutes the formal thesis, which summarizes the accompanying papers. These have either already been published or are manuscripts at various stages (in press, submitted, or in manuscript).

Illustrations: Maricris Esguerra

Printed by Chalmers Reproservice

Göteborg, 2010

ISBN 978-91-628-8134-4

To my parents
Felipa & Mauro

Engineering tissue – Bacterial cellulose as a potential biomaterial

Maricris Esguerra

Institute of Clinical Sciences, Department of Surgery,
Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg, Sweden

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are still the predominant cause of death among the adult population in the Western world. Diseases such as myocardial infarction and stroke are caused by occluded blood vessels, as a result of atherosclerosis. Severely occluded vessels are preferably replaced with an autologous mammary artery or saphenous vein through bypass surgery. Autologous replacement vessels are limited since many patients lack suitable vessels due to previous operations or have blood vessels that are inadequate for transplantation. Available synthetic vascular conduits function satisfactorily in large vessels. However, in small blood vessels (<6 mm), synthetic grafts are prone to thrombosis. Thus, there is a need for alternative vascular graft material of biological origin. The main aim of this Thesis was to evaluate whether bacterial cellulose (BC) can be used as a biomaterial for engineered blood vessels.

For an implant to be accepted in the host, it has to be biocompatible, i.e., be well integrated into the tissue and display appropriate properties. Biocompatibility studies of BC in hamster showed that the material does not induce inflammation and that both cells and microvessels grow into the BC. Thus, BC is well accepted in the tissue. Then, microporous BC was designed to further enhance biocompatibility. Smooth muscle cells (SMCs) cultured on porous BC migrated further into the material compared to cells grown on conventional BC. However, in contrast to conventional BC, porous BC elicited an inflammatory response characterized by macrophages, lymphocytes and myofibroblasts. Taken together, these results indicate that porous BC is inferior to conventional BC with regards to biocompatibility; nevertheless, microporosity improved cellular migration of SMCs *in vitro*.

Additionally, the presence of the non-neuronal cholinergic system was evaluated in the vascular wall of the saphenous vein and cultured venous and arterial SMCs. Components of the non-neuronal cholinergic system were found in the media of the blood vessels as well as in cultured SMCs. Its function in these cells remains to be determined.

This Thesis demonstrates that BC is biocompatible since it was found to be well integrated into surrounding tissues and therefore has good potential as a biomaterial for tissue engineering.

Keywords: Bacterial cellulose, biocompatibility, blood vessels, non-neuronal cholinergic system, smooth muscle cells, tissue engineering

ISBN 978-91-628-8134-4

Göteborg 2010

Populärvetenskaplig sammanfattning

Hjärt- och kärlsjukdomar är idag den primära dödsorsaken bland vuxna och drabbar ca 30 % av jordens befolkning. Några exempel på sjukdomar är ateroskleros, stroke och hjärtinfarkt. De orsakas av åderförkalkning och förträngningar i kärl som leder till försämrat blodflöde och blodtillförsel till vävnader vilket resulterar i vävnadsskada. Vid svåra förträngningar måste det skadade kärlet bytas ut med kirurgiskt ingrepp, så kallad bypass-operation. Skadade kärl byts ut med en av patientens egna vener eller artärer. Dock är det många patienter som saknar lämpliga ersättningskärl, antingen på grund av tidigare operationer eller för att kärlet inte är tillräckligt friska. Då används istället syntetiska material som kärlimplantat. De fungerar bra som implantat i större kärl, men är inte lämpliga i mindre kärl (mindre än 6 mm i diameter) eftersom de orsakar blodproppar och nya förträngningar. En orsak till detta är att de syntetiska materialen inte godtas av vävnaden och cellerna de är i kontakt med. Med anledning av detta försöker forskare framställa konstgjorda blodkärl som skulle kunna användas som ersättningsmaterial. Konstgjorda blodkärl skapas oftast genom att celler odlas på ett rörformat material (ett biomaterial) som verkar som stödjevävnad. Efter en tids odling kan kärlet opereras in i en patient. De konstgjorda blodkärl som idag framställs är inte optimala ersättningskärl för små blodkärl, dessutom är tillverkningsprocessen lång. Kärlet kan därför inte användas vid akut behov.

Syftet med denna avhandling var att studera interaktionen mellan celler/vävnad och bakteriell cellulosa (BC), för att utvärdera om BC kan användas som ett biomaterial vid framställning av konstgjorda blodkärl. Vidare var syftet även att utforska om glattmuskelceller i kärlväggen uttrycker signalsubstanser och strukturer i det kolinerga systemet.

Bakteriell cellulosa är ett material som produceras av bakterien *Acetobacter xylinum*. Materialet har studerats av flera forskare som implantat i mjuka och hårda vävnader. I avhandlingsarbetet har vävnadsrespons mot BC och odling av glattmuskelceller från ven på BC studerats. Resultaten visar att BC accepteras av kroppen genom att inte framkalla inflammatoriska eller immunologiska reaktioner. Dessutom bildades nya små blodkärl i och omkring cellulosan vilket är ett tecken på att materialet godtas av vävnaden. För att ytterligare göra BC till ett bättre biomaterial gjordes porer i cellulosan för att skapa plats för inväxande vävnad, celler och nya små blodkärl. Cellulosa med porer var mindre accepterad av vävnaden jämfört med BC utan porer. Däremot växte odlade glattmuskelceller längre in i cellulosa med porer jämfört med den utan porer.

Glattmuskelceller från vener och artärer studerades med ändamålet att avgöra om cellerna uttrycker signalsubstanser och strukturer i det kolinerga systemet. Detta system producerar signalsubstansen acetylkolin, som är mest känd för att överföra signaler från nerverna till muskelvävnad. Det har framgått att även andra celler producerar denna substans. Glattmuskelceller från både ven och artär uttryckte det icke-neuronala kolinerga systemet.

Avhandlingen visar att BC accepteras av kroppen genom att den integreras i den omgivande vävnaden, därför är BC ett lovande biomaterial.

List of papers

This thesis is based on the following papers, which will be referred to in the text by their Roman numerals.

I. Intravital fluorescent microscopic evaluation of bacterial cellulose as scaffold for vascular grafts.

Esguerra, M., Fink, H., Laschke, M. W., Jeppsson, J., Delbro, D., Gatenholm, P., Menger M. D., Risberg, B.

J Biomed Mater Res A. 2010 Apr;93(1):140-149

II. Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds.

Bäckdahl, H., Esguerra, M., Delbro, D., Risberg, B., Gatenholm, P.

J Tissue Eng Regen Med. 2008 Aug;2(6):320-330.

III. In vivo evaluation of porous bacterial cellulose: A biocompatibility study.

Esguerra, M., Johansson, B.R., Soussi, B., Risberg, B., Krettek, A., Delbro, D.S.,

Submitted

IV. Vascular smooth muscle cells express markers of the non-neuronal cholinergic system.

Esguerra, M., Novotny, A., Jeppsson, A., Risberg, B., Krettek, A., Delbro, D.S.,

Manuscript

Reprints were made with kind permission from the respective publisher.

List of abbreviations

$\alpha 7$ nACh	$\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor
ABC-method	Avidin-biotin-complex method
ACh	Acetylcholine
AChE	Acetylcholinesterase
BC	Bacterial cellulose
CD3	Protein complex involved in the activation of the T-Lymphocyte
ChAT	Choline acetyltransferase
CHT1	High affinity choline transporter
DAB	Chromogen 3,3'-diaminobenzidine
EC	Endothelial cell
ECM	Extracellular matrix
EPC	Endothelial progenitor cells
ESCA	Electron spectroscopy for chemical analysis
ePTFE	Expanded polytetrafluoroethylene
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FT-IR	Fourier transform infrared
HRP	Horseradish peroxidase
ICC	Immunocytochemistry
IHC	Immunohistochemistry
LPS	Lipopolysaccharides
mAChR	Muscarinic acetylcholine receptor
MSC	Mesenchymal stem cell
nAChR	Nicotinic acetylcholine receptor
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor BB
PGA	Poly (glycolic acid)
SLURP-1	Secreted mammalian Ly-6/urokinase plasminogen activator receptor-related protein 1
SMC	Smooth muscle cell
TE	Tissue engineering
VAcHT	Vesicular acetylcholine transporter
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western blotting