



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Squaramide-based interpenetrated networks for load-bearing applications

Chen, Y.

Citation

Chen, Y. (2024, November 8). *Squaramide-based interpenetrated networks for load-bearing applications*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4108020>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4108020>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Supramoleculaire hydrogelen zijn geavanceerde kunstmatige materialen voor *in vitro* engineering van de micro-omgeving in levende cellen. Ondanks de voordelen van niet-covalente dynamische interacties, die dynamische en omkeerbare eigenschappen aan het materiaal verlenen, is hun toepassing in stijve en dragende weefselengineering tot nu toe beperkt gebleven. In dit proefschrift heb ik supramoleculaire monomeren op basis van squaramides en covalente polymeren ontworpen en deze gemengd om de invloed van de mechanische eigenschappen van de resulterende hydrogelen op cellen te bestuderen en om de extracellulaire matrix (ECM) na te bootsen. De studies beschreven in dit proefschrift dragen bij aan de fundamentele kennis over de samenstelling van squaramide-gebaseerde supramoleculaire hydrogelen, het verkennen van functionele supramoleculaire biomaterialen en mogelijke toepassingen in biomedische toepassingen.

In **Hoofdstuk 2** werd een kleine bibliotheek van tripodale squaramide-monomeren onderzocht in een waterige omgeving met betrekking tot hun zelf-assemblagegedrag en thermoresponsieve eigenschappen. De eerder gerapporteerde tripodale squaramide-gebaseerde hydrogelator vormt vezelachtige hydrogel boven de kritische gelatieconcentratie, wat het belang van hydrofobe en waterstofbindende interacties voor de vorming van een supramoleculaire hydrogel aantoont. Om een beter inzicht te krijgen in de hydrofiliciteit/hydrofobiciteit balans en het effect van waterstofbindingen op gelvorming werd een familie van tripodale squaramide-gebaseerde monomeren ontworpen en gesynthetiseerd. De zelf-assemblage-eigenschappen werden onderzocht en vergeleken met de oorspronkelijke tripodale squaramide-gebaseerde hydrogelator. De vervanging van de carbamaten door etherbindingen verlaagde de stijfheid van de hydrogel, terwijl de vermindering van het aantal squaramide-eenheden en hydrofiele en hydrofobe eigenschappen leidde tot de vorming van gel-fasematerialen. De waargenomen effecten op gelering zijn waarschijnlijk het gevolg van de verminderde polymerisatiegraad van de squaramide-monomeren, waarbij een vermindering van het aantal squaramide-synthons hun verstrengeling beïnvloedt. Bovendien vertoonden hydrogels **3-5** een lager kritische oplossings-temperatuur gedrag, wat de ontwikkeling van thermoresponsieve hydrogels mogelijk maakt. Hydrogels **4** en **5** behielden hun oorspronkelijke vorm, maar ondergingen krimp, wat uiteindelijk leidde tot de vorming van sterk georiënteerde materialen bij verwarming tot 130°C en daaropvolgende afkoeling tot kamertemperatuur. Samengevat laten deze studies zien dat niet alleen de essentiële structurele kenmerken die de gelering en thermoresponsiviteit van tripodale squaramide-gebaseerde monomeren in water sturen, maar suggereren ook de mogelijke aanpasbaarheid aan structurele modificaties voor toekomstige functionele supramoleculaire biomaterialen.

Op basis van deze resultaten is het duidelijk dat het ontwerp van supramoleculaire hydrogelators zorgvuldige overweging van verschillende factoren vereist. De belangrijkste hiervan is de balans tussen hydrofiele en hydrofobe eigenschappen, die als de belangrijkste kracht dient voor het zelf-

assemblageproces. Bovendien oefenen de kenmerken van waterstofbindingen, inclusief hun aantal, positionering en typen, aanzienlijke invloed uit op intra- en intermoleculaire krachten. Andere factoren, zoals π - π interacties beïnvloeden ook de dynamiek van het systeem.

In een vorige studie werden tripodale squaramide-gebaseerde monomeren gemodificeerd met 1,2-dithiolaanen om fotocrosslinking mogelijk te maken. Deze monomeermodificatie faciliteerde de precieze controle van materiaaleigenschappen in supramoleculaire hydrogelen door de vorming van dynamische covalente bindingen tussen de vezels resulterende in de controle van de stijfheid van de ECM's. Geïnspireerd door deze resultaten werd de mogelijkheid om de mechanische eigenschappen van supramoleculaire hydrogels te moduleren met behulp van fenolgroepen (Phe) in het squaramide-gebaseerde monomeer (**SQ-Phe**) bestudeerd. *In situ* covalente polymerisatie van SQ-Phe door zichtbaar licht van de hydrogel beïnvloedde de complexe mechanische eigenschappen (bijvoorbeeld rek-stijving, spanningsontspanning, viscoplastisiteit). Opvallend was dat de co-assemblage van een kleine hoeveelheid (tot 5 mol%) van het reactieve **SQ-Phe** monomeer met het oorspronkelijke squaramide-gebaseerde monomeer (**C8-SQ**) resulteerde in een sterke toename van de hydrogelstijfheid. Door de concentratie van de hydrogel of de hoeveelheid **SQ-Phe** af te stemmen, vertoonde deze filamenteuze supramoleculaire hydrogel rek-stijving, rek-versterkte spanningsontspanning en viscoplastische eigenschappen zoals biopolymeren (bijvoorbeeld actine, fibrine) van de ECM die worden gebruikt voor de ontwikkeling van organen en weefselsmodellen. Bovendien beïnvloedde de supramoleculaire hydrogel de groei van individuele 3T3-cellen, bevorderde het de vorming van anisotrope sferoïden onder een 3D-omgeving zonder extra bioactieve liganden zoals RGD, waarbij hun morfologie kon worden gemoduleerd door de optimalisatie van crosslinkerconcentratie en vezeldichtheid. Daarnaast konden de neuronale stamcellen 3D worden gedifferentieerd in zenuwcellen binnen deze supramoleculaire hydrogels in een zachte omgeving. Deze studie toont de brede toepasbaarheid van supramoleculaire hydrogels voor diverse 3D-celculturen aan waar anisotropie van het substraat gewenst is, met het potentieel om stamcellen te sturen voor weefselengineering en ziektemodellerings toepassingen.

Hoewel de versterking van de mechanische eigenschappen van supramoleculaire hydrogelen kan worden bereikt door nanovezelcrosslinking die bepaalde kenmerken van de ECM nabootsen, bestaan er nog aanzienlijke uitdagingen bij de toepassing van filamentaire supramoleculaire polymeren als stijve weefsels, vooral waar belasting nodig is. **Hoofdstuk 3** beschrijft een studie waarbij ringopeningsfotopolymerisatie van 1,2-dithiolanes (DT) en norborneen (NB) en kettinggroeipolymerisatie gebruikt werd om een covalent netwerk te maken resulterend in gecrosslinkte supramoleculaire filamenten in een taaie dubbelnetwerkhydrogel die dynamische compressie in 3D-celcultuur kan weerstaan. Deze hydrogelen vertonen kraakbeenachtige mechanische eigenschappen, namelijk hun biomimetische complexe mechanische eigenschappen, spanningsreactie en ontspanning onder compressie die kunnen worden afgestemd op basis van componentverhoudingen en concentraties met behulp van licht. De mechanische eigenschappen zijn verbonden met hun

inhomogene netwerkarchitecturen, gegenereerd door de polymerisatie van monomeren, resulterend in de gelijktijdige vorming en versterking van poly(disulfide)s en poly(disulfide-norborneen)s netwerken door middel van UV-bestraling bij dezelfde golflengte. De mogelijke toepassing van dit dubbele netwerk voor 3D-cultuur werd onderzocht door menselijke primaire articulaire chondrocyten (hPACs) te kweken met een goede levensvatbaarheid. Bovendien resulteerde de cyclische compressieve belasting op hPACs-belaadde 3D-hydrogel in verhoogde afzetting van gesulfateerde glycosaminoglycanen na dagelijkse belasting gedurende 14 dagen. Door gebruik te maken van de fotoreactieve macromonomeren werden de materialen voorzien van een ruimtelijk onderscheidende mechanische domeinen, stijf en zacht, om ontwikkelings- en ziekteomstandigheden na te bootsen die aanwezig is in kraakbeen met bovenliggende compressieve belasting. Deze strategie voor netwerkversterking door covalente bindingen gecombineerd met bioorthogonale fotopolymerisatie biedt een basis om de mechanica van filamentaire supramoleculaire biomaterialen af te stemmen. Dit geeft nieuwe mogelijkheden om 3D-celculturen waar cyclische mechanische belasting bij betrokken is, te bestuderen. Deze studie van dynamische covalente bindingen in DN-hydrogelen introduceert daarom de mogelijkheid om hydrogeldegradatie te controleren in stijve hydrogels.

In **Hoofdstuk 4** werd zichtbaar licht geïnduceerde fotopolymerisatie van fenolgroepen (**Phe**) gebruikt om gelijktijdig dubbele netwerken (**DNs**) te bereiden door gebruik te maken van het filamentaire supramoleculaire polymeer (met 5% mol **SQ-Phe**) en poly(ethyleenglycol) netwerk (gefunctionaliseerd met **Phe**-groep) voor 3D-cultuur met cyclische compressieve belasting. Deze netwerken behielden de filamentaire supramoleculaire structuur met een hogere mechanische sterkte. Deze hydrogelen bezitten biomimetische complexe mechanische eigenschappen, zoals een kraakbeenachtige spanningsreactie en ontspanning onder compressie die kunnen worden afgestemd op basis van componentverhoudingen en concentraties. De opname van filamentaire supramoleculaire structuren bleek de spanningsontspanning in zowel de schuif- als axiale richting te versnellen, zelfs in gevallen waar de stijfheid was verhoogd. Deze **DN**-hydrogelen kunnen worden gebruikt voor menselijke primaire articulaire chondrocyten-cultuur in 3D en cyclische compressieve belasting van deze gels gedurende 2 dagen vertoonde een verbeterde afzetting van gesulfateerde glycosaminoglycanen (s-GAGs) vergeleken met de vrije zweltoestand. Deze **DN**-hydrogelen kunnen toegepast worden voor 3D-celculturen van diverse weefseltypes die compressieve belasting vereisen. Tevens maakt het nieuwe toepassingen mogelijk door de essentiële chemische parameters in de volgende generatie hydrogelen voor geavanceerde 3D-in vitro modellering en gerichte regeneratieve therapieën, vooral osteoarthritis (OA), in kaart te brengen.

Stimuli-responsieve hydrogelen bieden mogelijkheden om de fysische eigenschappen te controleren in reactie op externe prikkels, wat is toegepast in vele aspecten zoals gecontroleerde medicijnafgifte, sensorische materialen en weefselkweek. **Hoofdstuk 5** beschrijft een stimulus-responsieve **DN**-hydrogel met mechanische eigenschappen die de compressieve eigenschappen van kraakbeen nabootsen en het potentieel om lokale verwarming te bieden die kan worden gebruikt voor

verschillende in vitro en in vivo doeleinden, waaronder therapie. In deze studie heb ik de chemie en DN-materialen uit **Hoofdstuk 4** gebruikt en 15 nm goudnanodeeltjes toegevoegd om een dual-network hydrogel te creëren met verbeterde mechanische eigenschappen en functies. De niet-gecrosslinkte hydrogels waren injecteerbaar en bleef stabiel in PBS na crosslinking. Bovendien verbeterde de toevoeging van goudnanodeeltjes het energieabsorptievermogen van de hydrogelen en introduceerde het instelbare geleidbaarheid en fotothermische eigenschappen wanneer bestraald met 532 nm. De hydrogel vertoonde goede cytocompatibiliteit en het fotothermische effect werd succesvol toegepast in het MDA-MB-231-B1 3D-kankermodel. Het fotothermische effect is afhankelijk van de AuNPs-concentratie, lichtdosering en lokale belichting was mogelijk door gebruik te maken van een laser lichtbron, wat potentiële toepassingen van squaramide-gebaseerde hydrogels voor fotothermische therapie bij kankerweefsel dichterbij brengt en waardevolle inzichten voor het bestuderen van complexe ziekten biedt.