

University of Groningen

Monitoring endothelial cells in microfluidic systems

Grajewski, Maciej

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Grajewski, M. (2018). *Monitoring endothelial cells in microfluidic systems*. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse Samenvatting

Dit proefschrift bestaat uit vijf delen, welke allen raakvlak hebben met het microfluidics vakgebied, en laten de invloed van dit onderzoek zien op hedendaagse methodologie. In het eerste deel wordt de lezer geïnformeerd over de redenen achter het onderzoek en worden optische instrumenten en methoden kritisch bekeken in hun toepasbaarheid voor het bestuderen van cel- en weefselkweken. In het tweede deel van het proefschrift wordt ons werk beschreven waarin we microkanalen optimaliseren voor het kweken van endotheelcellen en waarmee we vervolgens kijken naar de invloed van schuifspanning op deze cellen in microkanalen met verschillende breedtes. In het derde deel van het proefschrift wordt de ontwikkeling en evaluatie van een microfluidics methode beschreven waarmee cellen bestudeerd kunnen worden zonder dat ze gelabeld hoeven te worden. In het vierde deel van het proefschrift hebben we gekeken naar de toepasbaarheid van een 3D printer in microfluidics onderzoek. Het vijfde deel van het proefschrift bevat een algemene beschouwing van het werk in dit proefschrift en hierin worden mogelijke richtingen voor toekomstig onderzoek beschreven.

In Hoofdstuk 1 worden de algemene doelstelling en motivatie voor dit proefschrift beschreven. In Hoofdstuk 2 hebben we gekeken naar de meest gebruikte methoden voor de real-time optische observatie van cel- en weefselkweken. In dit hoofdstuk beschrijven we het belang van het selecteren van een adequate methode voor dergelijke studies, en hoe dit afhangt van de specifieke toepassing en de onderzoeksvraag. We hebben daarom de voordelen en beperkingen van twee-foton microscopie, flow cytometry, en evanescent waveguide sensoren op rij gezet bij hun gebruik als real-time sensoren. Het hoofdstuk wordt afgesloten met advies over mogelijke verbeteringen voor deze methoden. Een belangrijke conclusie die wordt getrokken is dat er behoefte is aan miniaturisering en systeemintegratie, en dat de bijdrage van microfluidics hierin belangrijk is en zal zijn.

Het tweede deel van het proefschrift beschrijft de ontwikkeling van een microkanaalgeometrie, welke het kweken van endotheelcellen mogelijk maakt met kanaalbreedtes van 60 μm of meer. In Hoofdstuk 3 wordt beschreven hoe de efficiëntie van het laden van kanalen met cellen kan worden verbeterd in kanalen met breedtes tussen de 360 en 60 μm . Alle gebruikte protocollen welke in dit werk zijn ontwikkeld voor deze kweken worden in detail beschreven. In Hoofdstuk 4 worden experimenten beschreven waarin endotheelcellen in microkanalen zijn blootgesteld aan verschillende maten van schuifspanning om vast te stellen hoe dit invloed heeft op de distributie van membraaneiwwitten en de conformatie van het actine cytoskelet. Dit werd bekeken met confocale microscopie, waarvoor de microfluidic chip moesten worden aangepast, als ook het protocol om ermee te werken. Het toepassen van schuifspanning resulteerde in een verschil in membraaneiwit distributie en cytoskelet conformatie ten opzichte van een statische kweek.

In het derde deel van dit proefschrift worden de ontwikkeling, evaluatie en toepassing van een optische chip beschreven, welke het mogelijk maakt om simultaan en real-time (de interactie) van een aantal cellen in de context van een volledige cellaag te bekijken, zonder de cellen te hoeven te labelen. Hoofdstuk 5 is gewijd aan de ontwikkeling van deze sensor, welke gebaseerd is op waveguide technologie, en waarmee nauwkeurig rood licht in een cellaag geschoten kan worden, om vervolgens aan de andere kant van de cellaag weer opgevangen te worden. Zodoende functioneert de cellaag dus als een optische component van het systeem. Doordat licht gepropageerd wordt door de endotheelcellen, worden patronen van lichtverstrooiing geregistreerd. De fluctuaties in het geregistreerde signaal reflecteren veranderingen in celmorfologie, welke optreden door aanpassingen van het cytoskelet. Dit fenomeen staat betekent als cellulaire microbeweging. Cellulaire

microbeweging kan worden beïnvloed door een verscheidenheid aan chemische en fysische factoren. Het observeren van veranderingen in het cytoskelet is belangrijk in onderzoek met endotheelcellen.

Het belangrijkste doel van hoofdstuk 6 is om meer inzicht te verkrijgen in hoe veranderingen in het cytoskelet effect hebben op de geregistreerde lichtverstrooiingspatronen met de optische chip. Om dit te doen hebben we xenobiotica geselecteerd die selectief binden aan het actine cytoskelet en dienen als versneller van de formatie van actinefilamenten (jasplakinolide) of juist actine polymerisatie blokkeren (latrunculine A). De veranderingen in lichtverstrooiing als gevolg van het toedienen van de xenobiotica konden succesvol worden opgevangen met de optische chip. Deze chip kan dus real-time veranderingen van het cytoskelet volgen als gevolg van blootstelling aan een bepaalde stimulus, zoals xenobiotica.

In hoofdstuk 7 introduceren we een geïntegreerd platform voor celkweken in microsystemen, met als doel het robuuster en reproduceerbaarder maken van microfluidic celkweken op een gebruiksvriendelijke manier. Het ontwikkelde platform combineert een vloeistofpomp, microscoop en een incubator in een veelzijdig instrument, welke eenvoudig te gebruiken is met een PC. Door het beschreven platform in te zetten is het mogelijk om de experimentele capaciteit van een onderzoekslaboratorium te vergroten. Het geïntegreerde celkweek platform is toegepast in een experiment waarin de optische chip werd gebruikt om cellulaire microbeweging te observeren in confluente endotheelcellagen met al dan niet stromend medium over de cellen.

In Hoofdstuk 8 wordt het gebruik van 3D-geprinte polymeren in ons laboratorium beschreven. Dit werk demonstreert de bijdrage van een 3D-print methode, namelijk fused deposition modeling (FDM), aan ons onderzoek. De methode is gebaseerd op het extruderen van gesmolten plastic in een vooraf bepaalde vorm op een metalen plaat. De technologie is ingezet om een aantal parameters te karakteriseren, waaronder resolutie, gladheid van oppervlakken, lekkage in geprinte onderdelen, en transparantie. Bovendien zijn twaalf verschillende polymeren getest op hun compatibiliteit met verschillende oplosmiddelen en met twee biologische systemen (leverweefsel van een rat, en menselijke primaire endotheelcellen). In dit hoofdstuk wordt beschreven hoe 3D printen kan bijdragen aan microfluidics onderzoek, en wordt onder andere gekeken naar de fabricage van gietmallen, kanaalstructuren, prototypen en het op maat maken van een experimentele setup.

In het vijfde deel wordt het proefschrift afgerond. In Hoofdstuk 9 presenteren we de algemene conclusies van het onderzoek en kijken we kritisch naar hetgeen bereikt is. Bovendien worden hier suggesties gegeven voor toekomstig onderzoek in dit veld. Voorbeelden hiervan zijn het toepassen van een ontstekingstoestand in de endotheelcellenkweek door blootstelling aan bijvoorbeeld TNF- α . We geven een beschouwing van huidige beperkingen van de ontwikkelde optische methode voor het bestuderen van celkweken, zowel vanuit biologisch als technologisch perspectief. Tot slot, geven we aanbevelingen voor het verder ontwikkelen van het microfluidics veld om tot een beter begrip te komen van biologische systemen.