

Organ-on-a-chips bieden ruimte voor complexe, fysiologisch relevantere 3D-modellen

Bi/ond combineert voeden, stimuleren en monitoren van cellen in één microchip

De in 2017 opgerichte Delftse startup Bi/ond ontwikkelt organ-on-a-chips waarmee complexe *in vitro* 3D-modellen kunnen worden geïmplementeerd, die dicht bij de fysiologische werkelijkheid staan. De combinatie van chipfabricage- en polymeertechnologie voorziet in functionaliteiten voor zowel het voeden, stimuleren als monitoren van cellen. Het bedrijf werkt ook al aan toepassingen van de chips, met name op het gebied van spieren en bloedvaten, maar ook organoïden en tumorweefsel. CTO Nikolas Gaio en senior scientist Mitchell Han geven een inkijkje in de verdere ambities.

Nierorganoïden uit humane iPSC's zijn een belangrijk *in vitro* model voor het bestuderen van nierontwikkeling en nierziektes. Een gebrek aan vascularisatie van deze organoïden leidt echter vaak tot onvoldoende toevoer van zuurstof en voedingsstoffen, waardoor de organoïden zich maar beperkt kunnen ontwikkelen. Je kunt vascularisatie bereiken door implantatie in *in vivo* diermodellen, maar dat is complex en zeker niet ideaal, omdat de vasculatuur grotendeels afkomstig is van dierlijk gastheerweefsel. Onderzoekers van het Erasmus MC publiceerden eind 2022 in Nature Scientific Reports hoe zij erin geslaagd zijn om van een *in vivo* implantatiemodel over te stappen naar een *in vitro* model dat de voordelen van vascularisatie biedt en toch volledig bestaat uit humane cellen.

De onderzoekers kweekten de organoïden op een door Bi/ond ontwikkelde inCHIPit™ chipsysteem. Ze zagen gedurende een negen dagen durend experiment dat niet alleen de endotheelpopulaties goed rijpten, maar ook dat er vascularisatie plaatsvond. Dit laatste

was mogelijk door migratie en proliferatie in het organoïde van humane navelstreng-endothelcellen (HUVEC's). Deze cellen, gekweekt in een microfluidisch kanaaltje in de chip, verbonden zich in een co-cultuur setting met endogene endothelcellen tot een vaatachtige open lumen structuur. Dit model, zo concludeerden de onderzoekers, is een goede tool voor verdere studies naar de ontwikkeling van nieren en het testen van geneesmiddelen, zowel voor onderzoeks- als preklinische toepassingen.

Completere organ-on-a-chip

Een resultaat als dat in de publicatie van de Rotterdammers moeten CEO Cinzia Silvestri, CTO Nikolas Gaio en William Solano ongeveer voor ogen hebben gehad toen ze in 2017, alle drie nog promovendi in het Else Kooi Lab (de cleanroom van de TU Delft), de koppen bij elkaar staken om een bedrijf op te richten. Aanleiding was een mislukt experiment van William, waarbij per ongeluk een kanaaltje werd gemaakt in de polymeerlaag van de silicium wafer. "Al snel kwam het idee naar boven dat we door combinatie van onze kennis op het gebied van polymeerverwer-



De inCHIPit™ (links) is er met één of drie microfluïde kanalen. De MUSbit™, die is toegespitst op spieronderzoek, heeft als extra twee pilaren die de groei van de gezaaide spiercellen faciliteren.



Senior scientist Mitchell Han maakt bij Bi/ond gebruik van de Nikon Ti2 Eclipse microscoop om het gedrag en de morfologie van de celsystemen in de organ-on-a-chips te beoordelen en te volgen.

king en siliciumgebaseerde microfabricage organische chips met microfluïde kanalen zouden kunnen gaan maken. Voordelen van de chiptechnologie zijn onder meer dat je relatief eenvoudig de productie kan opschalen en een goede reproduceerbaarheid kan bereiken. Daarbij is het -analoog aan een elektronicachip- ook mogelijk om sensoren en andere elektrische signalen te integreren in het systeem”, legt Nikolas Gaio uit.

De organ-on-a-chips, zoals die voor ogen stonden en inmiddels zijn gerealiseerd in de inCHIPit™ en de MUSbit™, hebben drie basiselementen in zich. Allereerst is dat de mogelijkheid van interactie tussen het 3D-weefsel en de inhoud van de microkanaaltjes, of dat nu voedingsstoffen, andere cellen of geneesmiddelen zijn. Daarbij kan via elektrodes de 3D-structuur worden gestimuleerd of getraind. Tenslotte kunnen signalen, die zijn gegenereerd door het weefsel, worden gemonitord. “Op basis van deze drie elementen kunnen we voorzien in complexe *in vitro* modellen, die dichterbij de fysiologische werkelijkheid zijn dan wat je met andere organ-on-a-chips kunt bereiken. Deze hebben in de regel maar één of hoogstens twee van die elementen in zich. Ik durf te beweren dat wij tot nu toe de enige zijn met zo’n complete organ-on-a-chip”, aldus Nikolas.

Eén vierkante centimeter

Wat de inCHIPit™ betreft speelt alles zich af op een stukje silicium van 10 x 10 mm. In het midden van deze structuur is een open well van 3 x 3 mm, die via een poreus membraan in verbinding staat met, afhankelijk van

de uitvoering, één of drie microfluïde kanaaltjes. In de well kan allerlei celmateriaal worden geplaatst, zoals organoïden of cellen van patiëntmonsters. De celcultuur is vanaf de bovenkant benaderbaar; imaging kan via de licht-transparante onderkant. In een kanaaltje kan bijvoorbeeld een 3D-bloedvat worden gemaakt dat via het membraan de celstructuur in de well voorziet van nutriënten en zuurstof. Zo’n kanaaltje kan ook worden gebruikt voor het kweken van een co-cultuur van andersoortige cellen of voor het toedienen van geneesmiddelen.

De MUSbit™ heeft dezelfde maten als de inCHIPit™, en biedt voorsnogen één microkanaal. Verschil zit hem in de well, die ovaalvormig is en twee, enkele honderden micrometers hoge pilaren heeft. Tussen die pilaren kunnen spiercellen worden gezaaid, waarbij met elektrische stimuli de groei kan worden bevorderd. Het onderliggende kanaaltje is er dan weer voor het voeden van de cellen of het toedienen van geneesmiddelen.

Om de chips gemakkelijker te hanteren is er de COMPLETE™, de interface waarmee de chips met microfluïdische slangetjes op een pomp kunnen worden aangesloten. Deze interface heeft een multi-well plaat format, die in de huidige uitvoering zes plekken biedt voor evenveel organ-on-a-chips. De plaat biedt een gesloten systeem voor de weefselculturen op de chip en is compatibel met verschillende microscopen voor imaging.

Doorontwikkelen

Waar de focus lang op het ontwikkelen van de hardware →

Ik durf te beweren dat wij tot nu toe de enige zijn met zo’n complete organ-on-a-chip.



lag, gaat Bi/ond sinds enkele tijd voor een meer toepassingsgericht benadering. Dat zie je ook terug in de samenstelling van het team van momenteel twaalf medewerkers, dat niet langer exclusief uit engineers bestaat. Zo is sinds een jaar Mitchell Han bij het bedrijf in dienst, een technologie-georiënteerde celbioloog met expertise op het gebied van biomaterialen, extracellulaire matrices, 3D-celculturen en de interacties tussen deze. “In ons laboratorium hebben we hele korte lijnen tussen applicatie- en productontwikkeling. Aan de ene kant van het lab hebben we de ‘natte’ biokant en aan de andere kant de technologie-site waar de engineers hun werk doen. Aan de biokant passen we onze producten toe op verschillende applicaties van klanten en testen proof of concepts van nieuw ontwikkelde devices. We kunnen hierbij direct feedback geven aan de engineers. Zij werken aan polymeren, materialen, oppervlaktebehandeling, elektronica en mechanica; aspecten die allemaal van invloed zijn op de biologie en nog steeds worden gefinetuned op de uitdagingen in de praktijk. Zo hebben we bij de start van de ontwikkeling van onze chips het silicium gecombineerd met het polymeer PDMS, dat veel wordt gebruikt in de biologie. We doen echter ook onderzoek naar andere polymeren, die wellicht de organ-on-a-chips nog beter geschikt maken voor bepaalde toepassingen. Dat heeft bijvoorbeeld te maken met celadhesie en zuurstoftransport.”

Enabler

Waar veel organ-on-a-chips in de markt worden gezet als vervanger van CRO's, is Bi/ond er juist aan gelegen om tools te maken die de dienstverlening van CRO's kunnen versterken door ze de mogelijkheid te geven om meer complexe, fysiologisch relevantere modellen aan te bieden. “De MUSbit is op dat gebied geschikt voor bio-farmabedrijven die werken aan skeletspierziektes, waarin we uniek zijn. In deze chip kunnen we namelijk 3D-pilaren inbouwen om de vorming van het weefsel te induceren, en via een microfluidisch kanaal voedings-

stoffen en geneesmiddelen op een dynamische wijze toe dienen. Daarnaast kunnen we hopelijk binnenkort in de volgende evolutie van de chip aan de hand van geïntegreerde elektroden gelijktijdig de contractiviteit van het spierweefsel stimuleren en meten. We zullen de komende jaren veel werk steken in het verder ontwikkelen van deze toepassingen, onder andere binnen het onlangs gestarte vierjarige MAGIC project, waarin een 15 partners tellend consortium op basis van ‘muscle-on-chip’ tools geavanceerde multicellulaire modellen van neuromusculaire ziektes wil ontwikkelen”, vertelt Nikolas.

Personalized medicine

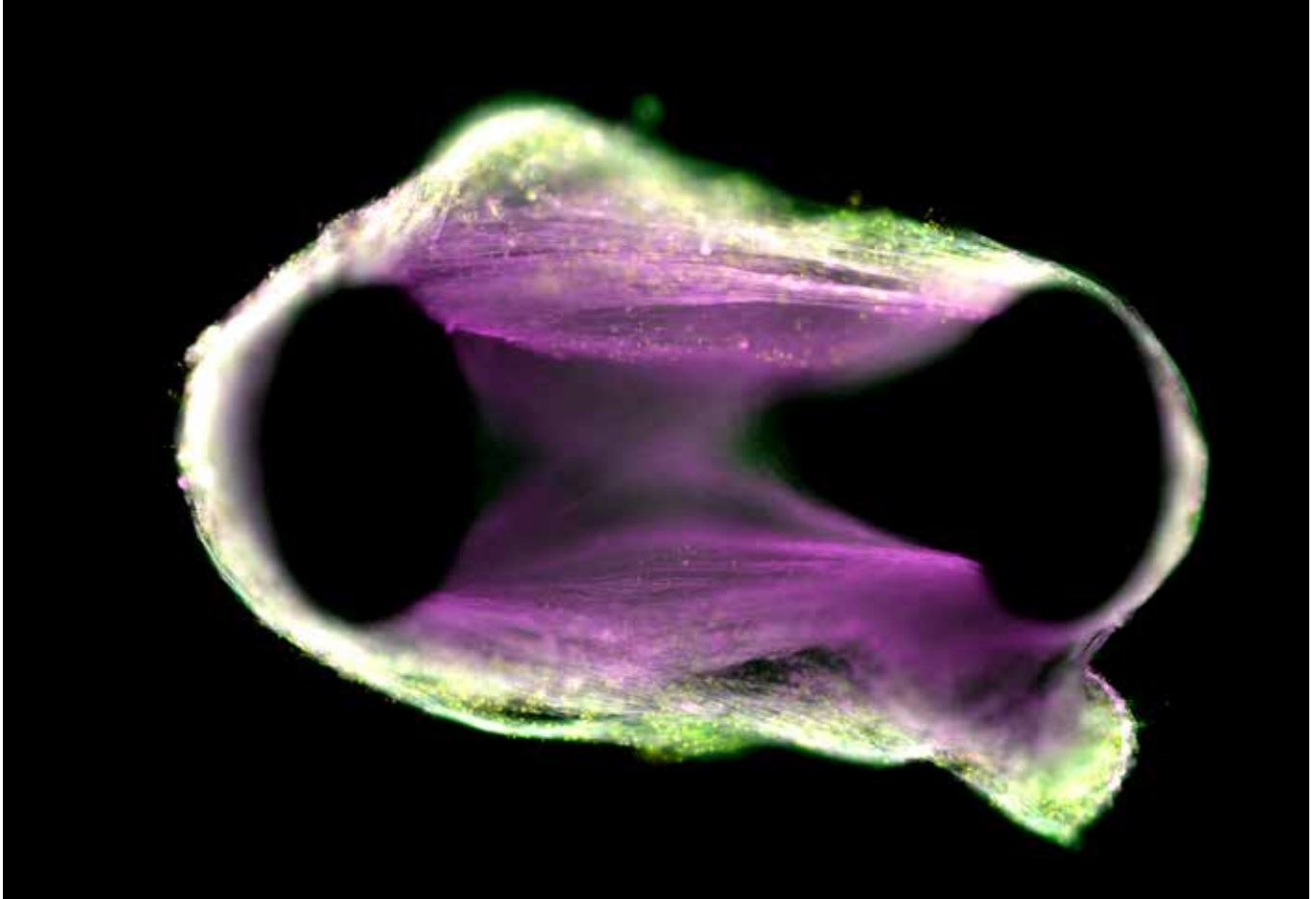
“Maar ook met de inCHIPit zitten we op toepassingsgebied niet stil, in samenwerkingen met verschillende academische partners op het gebied van onder meer nierorganoïden en tumorbiopten”, vervolgt Nikolas. “Onze ambitie is ook om de drempel te verlagen voor het testen van ‘niche’ groepen. Onderzoeksprotocollen gaan nog veel te veel uit van zeg maar ‘man, middelbare leeftijd, westerse achtergrond’, terwijl het zonneklaar is dat de op basis van deze populatie ontwikkelde therapieën minder effectief kunnen zijn voor andere groepen, of dat nu vrouwen, kinderen of etnische minderheden zijn. Met onze chips kan je gemakkelijker testen op individuele personen, voor ‘personalized medicine’, maar ook op klassen van patiënten, voor zeg maar ‘dedicated medicine’.”

Gebruikersvriendelijk

Hoe complex de modellen die op de chips worden gedraaid en de onderliggende hardware ook mogen zijn, het is wel de bedoeling dat de chips gemakkelijk kunnen worden toegepast. “Als je al ervaring hebt op het gebied van microfluidics, dan kunnen gebruikers zelf wel een protocol implementeren. We kunnen ook services bieden om een protocol aan te passen aan de celcultuur van de gebruiker. Om het gebruik zo soepel mogelijk te laten verlopen streven we er naar om een complete oplossing

CTO Nikolas Gaio toont de ComPLATE™, een well-plaat die zes plekken biedt voor evenveel organ-on-a-chips.





Opname van een in de MUSbit™ gegroeide spierbundel vanuit iPSC-afgeleide menselijke skeletspiercellen op dag 5 na zaaien. Op het met de Nikon Ti2 Eclipse microscoop opgenomen brightfield fluorescentie beeld, dat een resolutie heeft van 6000 x 3984 pixels, zijn de volgende kleuringen te zien. In geel: de kernen gekleurd met DAPI. In groen: het actine cytoskelet gekleurd met Phalloidin-AlexaFluor 488. In magenta: het muis sarcomeer alfa-actine (SAA) antilichaam + geit anti-muis AlexaFluor647.

te bieden, dus niet alleen de organ-on-a-chip, maar ook de perfusie, detectoren, well-plates, apparatuur voor het uitlezen van signalen, die we waar mogelijk in eigen beheer ontwikkelen”, vertelt Mitchell.

Microscopie als readout

“Je kunt onze systemen wat dat betreft vergelijken met microscopen, die ondanks de complexe hardware zeer gebruikersvriendelijke systemen zijn”, vervolgt Mitchell. “Microscopie, de belangrijkste readout voor onze systemen, is nu net de enige technologie die we niet zelf willen ontwikkelen: er zijn systemen verkrijgbaar die perfect aansluiten bij onze toepassingen waardoor wij op onze core expertise kunnen focussen. Wij maken in ons laboratorium sinds enkele maanden gebruik van een Nikon Ti2 Eclipse microscoop om te kijken waar de cellen precies zitten, hoe het met de morfologie is gesteld en hoe ze zich gedragen. Denk daarbij aan het beoordelen van de integriteit van de endotheelcellen in het microfluïde kanaal, het volgen hoe immuuncellen vanuit het kanaal in de endotheellaag gaan, of het vaststellen van de interactie tussen cellen in de verschillende compartimenten. Momenteel werken we vooral met gefixeerde weefsel-slides om aan de hand van fluorescentie te kijken naar geschikte expressie-markers van verschillende celtypes en om er bijvoorbeeld zeker van te zijn dat de barrière goed functioneert.

Maar we hebben de microscoop ook gekocht om er live cell experimenten mee te doen. Bijvoorbeeld om te volgen hoe cellen van het ene naar het andere compartiment gaan. Of, als je een spierbundel op zo’n pilaar hebt en je laat er geneesmiddelen naar stromen, wat dat dan doet op de contractie. Wat dat betreft lag de keuze voor Nikon voor de hand. Ik maakte al tijdens mijn PhD-onderzoek gebruik van Nikon-microscopen, juist omdat

Door specifieke cellulaire structuren of celtypes te kleuren kan je met fluorescentie een goed beeld krijgen van interacties, ook voor live cell imaging.

ze zo’n goede tool voor live cell imaging tracking hebben. Alleen al vanuit die ervaring ga je niet zo snel over op een andere fabrikant. Maar wat ook meespeelt is de flexibiliteit van Nikon. Als er bepaalde componenten moeten worden toegevoegd die niet standaard zijn, is dat geen probleem. En dat is voor ons relevant, want wij hebben niet-standaard producten, waar we bovendien nog steeds ontwikkeling aan doen.”

Kijken door een raampje

Het ontwerp van de chips is geoptimali-

seerd voor readout met de microscoop. Aan de onderkant van het well-systeem zit een transparant venster, zodat je in de z-richting de cellen en de onderliggende microfluïde kanalen ook in de brightfield modaliteit kan bestuderen. Dat geldt niet voor de delen die onder het niet-lichtdoorlaatbare silicium zitten, zoals een deel van de kanalen en de in- en uitgangen. Hiervoor is fluorescentie de aangewezen detectietechniek.

Sowieso zal fluorescentie veel worden toegepast, ook voor het zichtbare gedeelte onder het well-systeem. “Door specifieke cellulaire structuren of celtypes te kleuren kan je met fluorescentie een goed beeld krijgen van interacties, ook voor live cell imaging. Daar hebben wij nu veel profijt van, maar ook gebruikers zullen baat hebben bij microscopie als readout. In de toekomst kunnen ze imaging combineren met andere sensoren, zodat ze zoveel mogelijk datapunten kunnen hangen aan een single event. Dan zijn hun modellen fysiologisch gezien nog relevanter!” ||

INFORMATIE

Nikon Europe

www.microscope.healthcare.nikon.com

Bi/ond

www.gobiond.com