

# Breathing life into in vitro models

Citation for published version (APA):

Baptista, D. F. (2023). *Breathing life into in vitro models: Exploring the respiratory landscape of bioinspired culture substrates for pulmonary research*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20231003db>

## Document status and date:

Published: 01/01/2023

## DOI:

[10.26481/dis.20231003db](https://doi.org/10.26481/dis.20231003db)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

Flat, two-dimensional (2D) air-liquid interface (ALI) cultures still make up for a large part of lung *in vitro* systems. In these types of systems, lung epithelial cells are grown to a confluent monolayer on a flat porous culture membrane, where they form a tight barrier. Subsequently, the apical side of the cells is exposed to air, inducing their differentiation into a functional mucociliary epithelial layer with basal, ciliated and mucus-producing cells, thereby recreating key aspects of the native lung epithelium. Additionally, endothelial cells can be co-cultured on the opposite side of the porous membrane, creating an endothelial layer that in combination with the epithelial layer establishes a model of the "air-blood" barrier *in vitro*. However, conventional ALI (co-) cultures fail to reconstitute the *in vivo* situation in terms of spatial cellular arrangement, related cellular interactions and dynamic regimes such as air and blood flow. Recent advances in microtechnology and developmental biology enabled researchers to take the next step towards more realistic *in vitro* models for lung research. Here, several strategies have been employed to engineer realistic, and yet simple, lung *in vitro* models. In the thesis, following the introduction on the current status of lung *in vitro* research and emerging challenges in **Chapter 1**, **Chapter 2** reviewed the biological significance of curvature of culture substrates for cellular responses and provided an overview of the recent engineering strategies and relevant design parameters to develop biomaterials with surface curvature at near-cell-scale. In **Chapter 3**, biomimetic porous culture membranes with a topography similar to that of an unwrapped alveolar sac were achieved by a combination of ion track etching and microthermoforming. This was followed by the establishment of monolayers of alveolar epithelial cells on the created microcurved membranes and their culture under submerged and ALI conditions. In **Chapter 4**, a 3D lung-on-chip model was developed by integrating similar biomimetically curved culture membranes into two-compartment microfluidic chips, thereby dividing them into an upper air and a lower medium compartment. Such a configuration provides more possibilities for the physiological culture of human lung epithelial cells, for this chapter conducted at ALI, and also together with human lung microvascular endothelial cells. In **Chapter 5**, a bioinspired bronchial *in vitro* model, reflecting key aspects of the microanatomy of different regions of the bronchioles, was created by microthermoforming of porous culture membranes into linear and bifurcated microchannel segments with semicircular cross sections. Subsequently, these half-tube-like membrane structures were populated with primary bronchial epithelial

cells. The microcurved culture membranes were compatible with ALI culture, allowing bronchial cell differentiation. Additionally, an image processing method to unwrap confocal microscopy images of cells on curved culture substrates was used in order to enable a more accurate quantitative morphological analysis of the cells. This procedure was then applied to investigate the effect of the curvature of the membrane substrates on epithelial jamming. In **Chapter 6**, the feasibility of using thermoformed microwell arrays from dense polymer films in combination with culture medium-diluted basement membrane extract (BME) for the long-term culture of human bronchial organoids as an alternative to conventional culture in BME drops was shown. This included the demonstration of the key favorable features of this culture platform, which are the accessibility, observability and addressability/traceability of the organoids. Subsequently, in **Chapter 7**, some of the new strategies pursued in the previous four research chapters are discussed against the state of art in a more general, broader context, as well as new technology that could be further integrated. These technological advancements are discussed against the paradox of having simplified realism *in vitro*, which encompasses the duel between diametrical opposing features, namely the desired operational simplicity *versus* the aimed physiological complexity. The thesis ends with **Chapter 8**, where the impact of the novel bioengineering solutions described in the previous chapters are discussed regarding the effects they might have on future research and society. Thereby, the potential effect of organ-on-chip technology on disease modelling and drug development are highlighted.

## Samenvatting

Platte, tweedimensionale (2D) lucht-vloeistof raakvlak (ALI)-celkweken vormen nog steeds een groot deel van in vitro longsystemen. In dit soort systemen worden longepitheelcellen op een plat poreus kweekmembraan opgegroeid tot een confluerende monolaag waardoor ze een hechte barrière vormen. Vervolgens wordt de apicale zijde van de cellen blootgesteld aan lucht, waardoor de cellen worden aangezet tot het worden van een functioneel mucociliair epitheel met basale, trilharen en slijmproducerende cellen, waardoor belangrijke aspecten van het natuurlijke longepitheel worden nagebootst. Door ook endotheelcellen te kweken aan de basale kant van het poreuze membraan ontstaat er een endotheellaag die in combinatie met de epitheellaag een model vormt die de lucht-bloed barrière nabootst in vitro. Ondanks deze ontwikkelingen slagen dergelijke kweeksystemen er echter niet in om de in vivo situatie realistisch te reconstrueren. Dit komt omdat deze systemen belangrijke in vivo factoren missen zoals ruimtelijke cellulaire rangschikking, gerelateerde cellulaire interacties en dynamische fysieke factoren zoals lucht- en bloedstroming. Recente ontwikkelingen in microtechnologie en ontwikkelingsbiologie stellen onderzoekers in staat om de volgende stap te zetten richting meer realistische in vitro modellen voor longonderzoek. In dit proefschrift presenteer ik verschillende strategieën om realistische en toch eenvoudige in vitro longmodellen te ontwikkelen. Specifiek, dit proefschrift begint met **Hoofdstuk 1** waarin een inleidende context geschetst wordt aangaande de huidige status van het hedendaagse in vitro longonderzoek en opkomende uitdagingen. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht over de biologische effecten van de kromming van kweeksubstraten op het niveau van cellulaire reacties. Daarnaast verschaft dit hoofdstuk een gedetailleerd overzicht van recente technische strategieën en relevante ontwerpparameters om biomaterialen te ontwikkelen met oppervlaktekromming tot op de micrometerschaal. In **Hoofdstuk 3** beschrijf ik hoe biomimetische poreuze kweekmembranen met een topografie lijkend op een onverpakt longblaasje verkregen kunnen worden door gebruik van een combinatie van ionenspoor-etsing en microthermoforming. Deze nieuwe membranen met microbuigingen zijn gebruikt voor de kweek van monolagen van alveolaire epitheelcellen met ALI-omstandigheden. **Hoofdstuk 4** beschrijft de ontwikkeling van een nieuw 3D-long-op-chip-model wat gebaseerd is op de integratie van de biomimetisch gekromde kweekmembranen in microfluidische chips waardoor er twee functionele compartimenten ontstaan: een bovenste luchtcompartiment en een onderste mediumcompartiment. Deze configuratie biedt meer mogelijkheden voor de fysiologische kweek van menselijke longepitheelcellen, wat in dit hoofdstuk onderzocht is met ALI en co-kweek met microvasculaire endotheelcellen uit menselijke longen. In **Hoofdstuk 5** presenteert een bio-geïnspireerd bronchiaal in vitro model dat de belangrijkste aspecten van de microanatomie van verschillende regio's van de bronchiolen nabootst. Dit kweekmodel is gemaakt door microthermovorming van poreuze kweekmembranen tot rechte en gevorkte microkanaalsegmenten met halfronde

morfologie. Vervolgens werden deze half ronde buis membraanstructuren bezaaid met primaire bronchiale epitheelcellen. De microgebogen kweekmembranen waren compatibel met ALI-celkweek, waardoor bronchiale celdifferentiatie mogelijk was. Daarnaast werd een beeldverwerkingsmethode gebruikt om nauwkeurigere kwantitatieve morfologische analyse van confocale microscopiebeelden van cellen op gebogen kweeksubstraten mogelijk te maken. Deze procedure werd vervolgens toegepast om het effect van de kromming van de membraansubstraten op het vastlopen van het epitheel te onderzoeken. In **Hoofdstuk 6** toon ik de haalbaarheid aan van het gebruik van thermisch gevormde microwell-arrays van dichte polymeerfilms in combinatie met kweekmedium-verdund basaalmembraanextract (BME) voor de langdurige kweek van humane bronchiale organoïden als alternatief voor conventionele kweek in BME-druppels. Hierbij worden de belangrijkste gunstige kenmerken van dit cultuurplatform gedemonstreerd, namelijk de toegankelijkheid, waarneembaarheid en adresseerbaarheid/traceerbaarheid van de organoïden. Vervolgens wordt in **hoofdstuk 7** enkele van de nieuwe strategieën besproken die in de voorgaande experimentele hoofdstukken zijn nagestreefd, met specifieke aandacht voor de stand van de techniek in een meer algemene, bredere context, evenals nieuwe technologie die verder zou kunnen worden geïntegreerd. Deze technologische vooruitgang wordt besproken met oog op de paradox van het creëren van een versimpelde werkelijkheid in vitro waarbij de balans tussen gewenste operationele eenvoud versus de beoogde fysiologische complexiteit centraal staat. Het proefschrift eindigt met **hoofdstuk 8** waarin de impact van de nieuwe bio-engineeringoplossingen, zoals beschreven in de voorgaande hoofdstukken, wordt besproken met nadrukkelijk aandacht op de effecten die deze doorbraken zouden kunnen hebben op toekomstig onderzoek en onze samenleving. Daarbij wordt het potentiële effect van orgaan-on-chip-technologie op ziektemodellering en medicijnontwikkeling benadrukt.