



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**A novel cell-based microfluidic multichannel setup – impact of hydrodynamics
and surface characteristics on the bioadhesion of polystyrene microspheres**

Verfasserin

Clara Maria Pichl

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, im Oktober 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ.- Prof. Mag. Dr. Michael Wirth

Danke an alle, die mich in den letzten Jahren unterstützt und ermutigt haben.

Besonderer Dank geht an

Herrn Univ.- Prof. Mag. Dr. Michael Wirth und Herrn Univ.- Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die hervorragende Betreuung, Unterstützung und jedes einzelne aufmunternde Wort während der gesamten Zeit

die gesamte Arbeitsgruppe für das angenehme Klima sowohl während der Arbeits- als auch der Nichtarbeitszeiten (!!), im Besonderen Frau Mag. Xue-Yan Wang für ihre Hilfe beim Verfassen dieser Arbeit und Herrn Mag. Dr. Christian Fillafer für die Einführung in mein Diplomarbeitsthema

meine Eltern für jegliche Unterstützung in den letzten Jahren

meine Freunde für ihre nie endende Motivation und Aufmunterung, sowie ihr Verständnis in schwierigen Zeiten.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung und Problemstellung	7
Ergebnisse und Diskussion	9
Zusammenfassung	14
Anhang	17

PUBLIKATION

A novel cell-based microfluidic multichannel setup – impact of hydrodynamics and surface characteristics on the bioadhesion of polystyrene microspheres

Abstract	18
Introduction	19
Materials and methods	21
Results and discussion	25
Conclusion	31
References	40
Lebenslauf	43

Einleitung und Problemstellung

Der zielgerichtete Transport von Wirkstoffen zu erkrankten Zellen und Geweben bietet zahlreiche Vorteile. Dazu zählt vor allem die Möglichkeit, bei gleichem therapeutischem Effekt die Dosis des eingesetzten Arzneistoffes reduzieren zu können. In weiterer Folge werden so zumeist auch Toxizität und Nebenwirkungen gesenkt, wodurch die Verträglichkeit verbessert und damit die Compliance beim Patienten erhöht wird. Setzt man nun die Wirkstoffe in Form von Mikro- oder Nanopartikeln ein, ergeben sich zusätzliche Vorteile, wie der Schutz der Arzneistoffe unter den degradativen Bedingungen des Verdauungstraktes oder die Verlängerung der Wirkung infolge eines retardierenden Effekts. Demnach stellen diese kolloidalen Trägersysteme heute einen viel versprechenden Ansatz in der medikamentösen Therapie dar.

Um die Eignung derartiger partikulärer Drug Delivery Systeme besser einschätzen zu können, sind Partikel-Zell-Interaktionsstudien in möglichst nah an die physiologischen Gegebenheiten heranreichenden *in vitro*-Modellen nötig. Als besonders geeignet erwiesen sich in diesem Zusammenhang Caco-2 Zellmonolayer, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem humanen Dünndarmepithel die Resorptionsbarriere nach peroraler Applikation sehr gut imitieren können. Derartige Untersuchungen wurden aber bislang zumeist nur unter stationären Bedingungen durchgeführt. Dies birgt jedoch das Problem, dass die infolge der Peristaltik unter physiologischen Gegebenheiten vorliegenden Strömungsphänomene und damit einhergehende hydrodynamische Kräfte bisher nicht oder nur unzureichend berücksichtigt werden konnten. Um die Auswirkungen dieser Flussbedingungen auf die Partikel-Zell-Interaktion näher charakterisieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Bindungsstudien an Zellen in einem chipbasierten mikrofluidischen *in vitro*-Testmodell durchgeführt. Hierbei werden durch akustische Oberflächenwellen (surface acoustic wave, SAW) Flüssigkeitsströme in 3D-Mikrokanälen (44 mm x 4 mm x 3 mm; Länge x Breite x Höhe) aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) erzeugt. Dieses bereits zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelte und in der Literatur beschriebene System (siehe Anhang, Ref. 17), sollte im Rahmen dieser Diplomarbeit dahingehend weiterentwickelt werden, dass anstelle des ursprünglichen 1-Kanalsystems ein um 3 Kanäle erweitertes System (siehe Anhang, Fig. 1) zum Einsatz kam. Durch die Möglichkeit der Parallelisierung sollte so die Qualität der Versuchsergebnisse erhöht und die Reproduzierbarkeit verbessert werden. Die 4 SAW-Chips sind in einen Aluminiumblock integriert, wobei über entsprechend konfigurierte „Fenster“ auch eine mikroskopische Überwachung der Experimente möglich ist. Die PDMS-Mikrokanäle werden dabei nicht mehr auf ein Deckgläschen, sondern auf eine Glasplatte in den Dimensionen einer Mikrotiterplatte (127 mm x 85 mm x 1.1 mm; Länge x Breite x Höhe) aufgebracht. Auf diese Weise ist eine Detektion der relativen zellassozierten Fluoreszenzintensität auch mittels handelsüblicher Mikrotiterplattenfluorimeter möglich.

Hinsichtlich der Partikel-Zell-Interaktion wurden im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit carboxylierte Polystyrol-Mikropartikel mit einem Durchmesser von 1 μm eingesetzt, wobei die Oberfläche der Partikel auf unterschiedliche Weise modifiziert wurde. Einerseits sollte mittels Weizenlektin eine biorekognitive Oberfläche erzeugt werden, die spezifisch mit Zuckerstrukturen in der Glycocalyx humaner Zellen interagieren kann. Andererseits sollten die durch oberflächliche Carboxylgruppen negativ geladenen Ausgangspartikel mit Hilfe von Polyethylenimin umgeladen werden, um zu einer positiven Oberflächenladung zu gelangen. Anschließend wurde die Bindungseffizienz der unterschiedlich modifizierten Mikrosphären sowohl an konfluenten Caco-2 Monolayern als auch an Einzelzellen charakterisiert, wobei besonderes Augenmerk auf den Unterschied zwischen ionischen und biorekognitiven Wechselwirkungen gelegt wurde. Darüber hinaus sollten durch Einsatz des zuvor erwähnten, über akustische Oberflächenwellen betriebenen mikrofluidischen *in vitro*-Testmodells dynamische Bedingungen simuliert und deren potentielle Auswirkung auf die Partikel-Zell-Interaktion durch Erfassung der Unterschiede zwischen stationären und dynamischen Inkubationsbedingungen ermittelt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zur Publikation

“A novel cell-based microfluidic multichannel setup – impact of hydrodynamics and surface characteristics on the bioadhesion of polystyrene microspheres”

Xue-Yan Wang, Clara Pichl, Franz Gabor, Michael Wirth

(siehe Anhang) maßgeblich beigetragen werden.

In dieser Diplomarbeit wurden Bindungsstudien unterschiedlich oberflächenmodifizierter Polystyrolmikropartikel sowohl an konfluenten Caco-2 Monolayern als auch an Einzelzellen durchgeführt. Durch Einsatz eines über akustische Oberflächenwellen betriebenen Chipsystems (siehe Anhang, Fig. 1) konnte ein Testmodell etabliert werden, bei dem in 3D-Mikrokanälen Flüssigkeitsströme generiert werden, um somit auch *in vitro*, hinsichtlich der Fluidik, *in vivo* Bedingungen simulieren zu können. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf dem Einfluss hydrodynamischer Kräfte und Motilitäten, wie sie unter physiologischen Bedingungen omnipräsent sind, auf die Partikel-Zell-Interaktion. Obwohl die verwendeten Polystyrolpartikel nicht bioabbaubar sind und daher auch nicht als pharmazeutische Trägersysteme herangezogen werden können, bieten sie den Vorteil einer sehr engmaschigen Größenverteilung (in diesem Fall $1 \pm 0,031 \mu\text{m}$) sowie einer infolge von Carboxylgruppen gut funktionalisierbaren Oberfläche, weshalb sie sich für systematische Versuchsreihen sehr gut eignen. Um den Einfluss ionischer sowie biorekognitiver Wechselwirkungen auf die Partikel-Zell-Interaktionen untersuchen zu können, wurden durch Oberflächenmodifikation drei unterschiedliche Partikelarten hergestellt. Einerseits konnten dabei durch Adsorption von niedermolekularem Polyethylenimin (PEI) an die carboxylierte Oberfläche der eingesetzten Polystyrolpartikel positive Ladungen eingeführt werden. Dies war am deutlich ins Positive verschobenen Zetapotential ersichtlich (siehe Anhang, 3.1). Für eine spezifische Bioadhäsion wurde andererseits Weizenlektin aus *Triticum vulgare* (wheat germ agglutinin, WGA) an die Partikeloberfläche als Targeter gekoppelt. Als Referenz dienten nicht behandelte Polystyrolpartikel, die aufgrund ihrer endständigen Carboxylgruppen negative Oberflächenladungen aufweisen.

Zunächst wurde die generelle Tendenz der Bindungsaffinität der einzelnen Partikelarten mittels Versuchen unter stationären Bedingungen, sowohl an Einzelzellen als auch an konfluenten Caco-2 Monolayern ermittelt. Für die Bindungsstudien an den Zellmonolayern wurden die Caco-2 Zellen in 3D-Mikrokanälen aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) angezüchtet, die für die einzelnen Untersuchungen mit jeweils 500 μL der jeweiligen Partikelsuspension befüllt wurden (siehe Anhang, 2.9). Einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, folgte ein Waschschriff und die anschließende Detektion der relativen zellassoziierten Fluoreszenzintensität. Wie aus Figure 3 (siehe

Anhang) ersichtlich, konnte ein eindeutiger Unterschied zwischen WGA-gekoppelten und negativ geladenen Partikeln festgestellt werden. Sowohl an Einzelzellen als auch am Monolayer erreichten die mit Lektin modifizierten Partikel die höchsten Bindungswerte. Probleme ergaben sich jedoch bei der Auswertung der PEI-Partikel mit positiv geladener Oberfläche, da sich eine Interpretation der Messdaten aufgrund der sehr hohen Standardabweichungen schwierig gestaltete. So konnte, verglichen mit der Lektin-vermittelten biorekognitiven Interaktion, zwar eine generell niedrigere Bindungstendenz für Partikel mit ionischer Interaktion festgestellt werden, eine eindeutige Aussage darüber, ob die Zellassoziation der positiv geladenen Partikel jene der negativen Kontrollpartikel übertrifft, war jedoch nicht möglich. Bei nachfolgenden mikroskopischen Kontrollen der positiven PEI-Partikel wurde eine hohe Tendenz zur Aggregation festgestellt, worauf die hohe Variabilität in den Bindungsraten zurückzuführen sein könnte.

Als stabilitätslimitierende Faktoren bei dieser Partikelart wurden die Lagerungszeit aber auch das für die Lagerung bzw. in den Versuchsreihen verwendete Puffersystem ausgemacht. Um dahingehend bessere Einblicke zu erhalten, wurden in einem Stabilitäts-Zeit-Versuch die mit PEI behandelten Partikel in drei unterschiedlichen Puffersystemen (PBS + 0.1% Pluronic® F-68 (PBS/Pluronic), isotoner 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 + 0.1% Pluronic® F-68 (isoHEPES/Pluronic) bzw. 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 + 0.1% Pluronic® F-68 (HEPES/Pluronic)) 30 Minuten lang inkubiert. Die anschließende Bestimmung des Polydispersitätsindex, der einen Parameter für die Partikelgrößenverteilung darstellt, sowie mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die Aggregationsneigung in isotonen Puffern deutlich erhöht war (siehe Anhang, Tab. 1), während die Partikel in HEPES/Pluronic ihre monodisperse Verteilung weitgehend behielten. Da Untersuchungen an Zellen jedoch isotone Bedingungen voraussetzen, wurde in weiterer Folge ein etwaiger Einfluss der unterschiedlichen isotonen Puffer auf die Bindungsraten der Partikel an Zellmonolayern überprüft. Dazu wurden Partikelsuspensionen mit einer Konzentration von 30 µg/mL in PBS/Pluronic bzw. isoHEPES/Pluronic unter stationären Bedingungen auf den Monolayer aufgebracht und 30 Minuten lang inkubiert. Während bei den positiv geladenen PEI-Mikrosphären und den negativen Kontrollpartikeln keine signifikanten Unterschiede in der Zellbindung beobachtet wurden (siehe Anhang, Fig. 5), war die Bindungsrate der Lektin-modifizierten Partikel eindeutig vom verwendeten Puffersystem abhängig. Bei genauerer Analyse fällt allerdings auf, dass die PEI-Partikel in PBS/Pluronic ebenfalls eine erhöhte Bindungsaffinität aufzuweisen scheinen. Insbesondere ist aber die Standardabweichung der Bindungsrate in diesem Puffersystem auf das Doppelte erhöht. Interessanterweise sind jedoch sowohl pH, Osmolarität als auch Ionenstärke der verwendeten Puffer weitestgehend identisch. Auf der Suche nach einer Erklärung für die dennoch unterschiedlichen Bindungsraten wurde sowohl der Einfluss des Puffers auf die fluorimetrische Detektion als auch pufferabhängige Änderungen der Partikel- bzw. Zelloberfläche sowie deren Interaktivität in Betracht gezogen. Eine pufferinduzierte

Änderung der Fluoreszenzintensität konnte durch nähere Untersuchungen weitgehend ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher erscheint ein Einfluss der im PBS enthaltenen mehrwertigen Ionen auf die Oberflächenladung von Partikeln und Zellen sowie eine daraus folgende Änderung der Interaktion. Auch kann eine inhomogene Verteilung von PEI auf der Partikeloberfläche infolge eines unvollständigen Adsorptionsprozesses nicht ausgeschlossen werden. Befinden sich aber noch freie negative geladene Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche, würde dies Agglomerationsprozesse fördern.

Zieht man nun in Betracht, dass die Aggregationsneigung in PBS/Pluronic verglichen mit isoHEPES/Pluronic deutlich erhöht ist, ist es vorstellbar, dass die Bindung eventuell darin entstehender Partikel-Agglomerate auch zu einer Zunahme der detektierten Fluoreszenzintensität führt. Diese These wird auch durch die beobachteten hohen Standardabweichungen im Monolayer- als auch im Einzelzellversuch gestützt, die auf eine hohe Variabilität der Bindungsraten der positiven Partikel hinweisen. Um Verfälschungen der tatsächlichen Bindungstendenz durch Aggregatbildungen weitestgehend vorzubeugen, wurde für alle weiteren Versuchsreihen isoHEPES/Pluronic als Puffersystem verwendet. Zusätzlich wurden die PEI-modifizierten Partikel unmittelbar vor dem jeweiligen Versuch hergestellt und mikroskopisch kontrolliert, um das Entstehen von Agglomeraten weitestgehend auszuschließen.

Um den Einfluss hydrodynamischer Kräfte auf die Stabilität der Bindung unterschiedlich modifizierter Partikel zu untersuchen, wurde eine Reihe von Zelladhäsionsstudien an konfluenten Caco-2 Monolayern bei unterschiedlichen Pulse-Chase Inkubationsbedingungen durchgeführt. Auf die zur Beladung der Zellen mit Partikeln dienende Pulse-Inkubation folgte jeweils ein Waschschriff, um ungebundene Partikel zu entfernen, mit anschließender Detektion der relativen zellassoziierten Fluoreszenzintensität. Ebenso wurde nach Ende der Chase-Phase und zwei weiteren Waschschriffen die zellgebundene Fluoreszenz ermittelt. Die einzelnen Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei die Dauer jeweils 30 Minuten betrug.

Um einen Referenzwert bei normaler Partikelsedimentation zu erhalten und damit die Auswirkungen der Scherkräfte auf die Bindungsraten der Mikropartikel besser einschätzen zu können, wurden zunächst beide Inkubationsphasen unter allein stationären Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden die Monolayer mit den drei verschiedenen Partikeltypen (WGA-gekoppelt, positiv bzw. negativ geladen) jeweils einzeln beladen. Einer 30-minütigen stationären Inkubation und einem Waschschriff (Pulse-Phase) folgte hier eine erneute 30-minütige Chase-Inkubation unter stationären Bedingungen. In dieser Versuchsreihe konnte für alle Partikelarten eine leichte Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenzintensität im Verlauf der Chase-Phase beobachtet werden (siehe Anhang, Fig. 6 s/s). Mit einer Abweichung um 36% vom Beladungswert war die Abnahme bei den positiv

geladenen Partikeln am höchsten, während Lektin-modifizierte Partikel, mit 89% stabil gebundener Partikel nach der zweiten Inkubation, die besten Resultate erzielten.

Die Auswirkung einer Strömung auf bereits zellassoziierte Partikel wurde in einer zweiten Versuchsreihe analysiert. Dabei wurde der Zellmonolayer zunächst unter stationären Bedingungen mit Partikeln beladen, gefolgt von einer Chase-Inkubation unter Fluidikbedingungen. Hierfür wurde eine Flussgeschwindigkeit von $2000 \mu\text{m s}^{-1}$ gewählt. Wie aus Fig. 6 s/f (siehe Anhang) ersichtlich, konnte dabei kaum ein Unterschied zwischen den beiden Fluoreszenzmessungen beobachtet werden. Die Annahme, dass die durch den Fluss erzeugten Scherkräfte auf schwach adhärierte oder noch rollende Partikel desorbierend wirken, konnte also nicht bestätigt werden.

Um den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden schließlich beide Inkubationsschritte unter Flussbedingungen durchgeführt. Interessanterweise kam es dabei, verglichen mit den Ergebnissen der Pulse-Inkubation der vorangegangenen Studien unter s/s bzw. s/f Bedingungen, zu einem leichten Anstieg der Bindungsraten für WGA-modifizierte (117%) bzw. negativ geladene (126%) Partikel. Dies könnte auf eine etwaige Abwärtsströmung der Partikel, hervorgerufen durch die Scherkräfte des Flusses, zurückgeführt werden, wodurch die Kontakthäufigkeit der Partikel mit der Zelloberfläche und infolgedessen die Bindungswahrscheinlichkeit erhöht würde.

Aus den Untersuchungen unter Fluidikbedingungen lässt sich ableiten, dass hydrodynamische Kräfte kaum einen Einfluss auf die Adhäsion bereits zellassoziiierter Partikel haben, unabhängig davon, ob es sich um ionische oder biorekognitive Wechselwirkungen handelt. Erfolgt die Beladung mit den Kolloiden jedoch unter Flussbedingungen, erhöht sich sogar die Bindungswahrscheinlichkeit der Partikel an die Zelloberfläche, vermutlich durch forcierte Konvektion, die den Partikelstrom in Richtung Zelloberfläche treibt.

Betrachtet man die Auswirkung der Oberflächenmodifikation auf die Bindungsaffinität, so konnte gezeigt werden, dass an Weizenlektin gekoppelte Mikropartikel, verglichen mit den eingesetzten ionischen Kolloiden, nahezu dreifach erhöhte Bindungsraten erzielen. Ein Vergleich der Bindungseffizienz zwischen positiv und negativ geladenen Mikrosphären gestaltete sich aufgrund der hohen Standardabweichungen bei den positiven Partikeln jedoch schwierig. Dies wurde auf die starke Agglomerationstendenz der mit PEI behandelten Partikel zurückgeführt. Um daraus resultierende Verfälschungen der Ergebnisse möglichst gering zu halten, sollte bei ihrem Einsatz besonders auf das verwendete Puffersystem geachtet und die verwendeten Partikelsuspensionen mikroskopisch auf etwaige Aggregationen überprüft werden.

Generell muss man berücksichtigen, dass die eingesetzten Caco-2 Zellen an ihrer Oberfläche vor allem hinsichtlich der Membranzusammensetzung doch gewisse Unterschiede zu nativen intestinalen Epithelien aufweisen könnten. Versuche an Primärzellen könnten hier näheren Aufschluss über die

Vergleichbarkeit und den Zusammenhang der Bindungstendenzen an gesunden intestinalen Epithelzellen geben. Darüber hinaus wurden die Untersuchungen ausschließlich mit einer Partikelgröße von $1\text{ }\mu\text{m}$ und einer konstanten Flussgeschwindigkeit von $2000\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ durchgeführt. Da diese Faktoren, aufgrund größe- und dichtemäßig variierender Sedimentationsgeschwindigkeiten sowie von der Geschwindigkeit abhängiger Scherraten und Scherstress, wichtige Parameter für etwaige Änderungen der Partikel-Zell-Interaktion darstellen, sollten sie in zukünftigen Studien miteinbezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass partikuläre Drug Delivery Systeme insbesondere nach Oberflächenmodifikation mit biorekognitiven Liganden eine ausgeprägte und stabile Zelloassoziation zeigen, die auch durch Scherstress, wie er durch die im Organismus vorherrschenden dynamischen Flussbedingungen in vivo vorliegt, nicht nachweisbar negativ beeinflusst wird, sofern die Partikelgröße in einem Bereich von unter $1\mu\text{m}$ liegt.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Bindungsstudien mit unterschiedlich oberflächenmodifizierten Polystyrolmikropartikeln an Caco-2 Zellen durchgeführt. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf dem Einfluss hydrodynamischer Kräfte auf die Partikel-Zell-Interaktion, wobei die Fluidik in einem mittels akustischer Oberflächenwellen betriebenen chipbasierenden Mehrkanalsystem realisiert werden konnte.

Um die Charakteristik der Partikel-Zell-Interaktion in Abhängigkeit von der Partikeloberfläche zu untersuchen, wurden carboxylierte und dadurch negativ geladene Polystyrolpartikel mit einer Größe von 1 μm auf unterschiedliche Weise modifiziert. So konnten durch Behandlung mit Polyethylenimin (PEI) positive Ladungen eingeführt werden. Zusammen mit den nicht modifizierten und somit negativ geladenen Ausgangspartikeln wurden diese Partikel für die Untersuchung ionischer Interaktionen herangezogen. Um darüber hinaus auch Partikel mit biorekognitiven Oberflächeneigenschaften zu generieren, wurden die carboxylierten Polystyrolmikropartikel durch Kopplung an Weizenlektin (wheat germ agglutinin, WGA) funktionalisiert.

Versuche unter stationären Bedingungen ergaben, dass die für WGA-modifizierte Partikel ermittelten Zellbindungsraten sowohl bei Einzelzellen als auch bei Monolayern deutlich höher waren als bei den beiden anderen Partikelarten. Probleme ergaben sich aber bei der Auswertung der Zellassoziation der positiv geladenen PEI-Partikel, da die Ergebnisse hier sehr hohe Standardabweichungen aufwiesen. Dies dürfte vorwiegend auf eine ausgeprägte Tendenz dieser Partikel zur Aggregatbildung zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang konnte auch ein starker Einfluss des verwendeten Puffersystems sowohl auf die Stabilität als auch die Bindungseffizienz festgestellt werden. Aus diesem Grund sollte bei Verwendung derartiger Partikel besondere Sorgfalt auf die Auswahl eines geeigneten Puffersystems bzw. auf mikroskopische Kontrollen gelegt werden, um Partikelaggregationen und daraus resultierende verfälschte Ergebnisse möglichst ausschließen zu können.

Bei der Charakterisierung der Partikel-Zell-Interaktion unter Flussbedingungen ließ sich feststellen, dass hydrodynamische Kräfte bei Partikelgrößen von 1 μm und Flussgeschwindigkeiten von 2000 $\mu\text{m s}^{-1}$ keinen negativen Einfluss auf die Partikelbindung ausüben. Bei Beladung der Zellen mit Partikeln unter Flussbedingungen konnte sogar ein leicht positiver Effekt auf die Bindungshäufigkeit beobachtet werden. Erneut wurde für WGA-Partikel die höchste Zelladhäsion ermittelt. Daraus lässt sich ableiten, dass biorekognitive Wechselwirkungen im Bereich der Partikelbindung besser geeignet zu sein scheinen als ionische.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass nach peroraler Applikation von Partikeln dieser Größenordnung durch die dynamischen Bedingungen in vivo kein negativer Einfluss auf die Bindung

der Partikel an intestinale Epithelzellen, deren dortige Verweildauer und ihre etwaige Resorption zu erwarten ist, und sie sich deshalb als kolloidale Trägersysteme zur Wirkstoffverabreichung eignen sollten.

A novel cell-based microfluidic multichannel setup – impact of hydrodynamics and surface characteristics on the bioadhesion of polystyrene microspheres

Xue-Yan Wang, Clara Pichl, Franz Gabor, Michael Wirth*

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Vienna, Austria

To be submitted to Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

*Corresponding author: Michael Wirth

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Althanstraße 14, 1090 Vienna, Austria

Tel: (+43)-1-4277-55407

Fax: (+43)-1-4277-9554

E-Mail: michael.wirth@univie.ac.at

Abstract

Carboxylated polystyrene microspheres with a diameter of 1 μm were surface-modified either by coating with poly(ethyleneimine) (PEI) as cationic polyelectrolyte leading to a conversion of the surface charge from negative to positive, or by covalent immobilization of Wheat germ agglutinin (WGA) via a carbodiimide method to obtain a carbohydrate specific biorecognitive surface. To characterize the impact of the binding mechanism on the particle-cell interaction, the binding efficiencies to Caco-2 cells were investigated for both, the biorecognitive WGA-grafted particles and the positively charged PEI-microspheres, and compared to the unmodified negatively charged polystyrene particles. As a result, WGA-grafted particles exhibited the highest binding rates for single cells as well as monolayers as compared to the positive and negative particles under stationary conditions. Concerning ionic interactions, PEI-coated particles suffered from a critical agglomeration tendency leading to a high variance in cell binding. Furthermore, in order to elucidate the bioadhesion properties under flow conditions, an acoustically-driven microfluidic multichannel system was applied. Using different setups, it could be demonstrated that the hydrodynamics exerted almost no impact on cell-bound particles with a size of 1 μm at a flow velocity of 2000 $\mu\text{m s}^{-1}$. Indeed, the probability of cytoadhesion was even increased under flow conditions for these particles. Using this novel microfluidic system, it was thus possible to prove that the omnipresent hydrodynamic drag in vivo is mostly negligible for microparticulate drug delivery systems, if the diameter is in the range of 1 μm or below.

KEYWORDS: Wheat Germ Agglutinin (WGA), Poly(ethyleneimine) (PEI), Caco-2, Microfluidics, Surface acoustic waves (SAWs), Hydrodynamics

Introduction

Keeping path with the exciting progress of nanotechnology, micro- and nanoparticles have been intensively investigated regarding their potential application as drug delivery systems. At this, the surface of particulate drug formulations might be chemically and structurally modified to allow for prolonged residence times of micro- and nanoparticles in the body or to facilitate targeting specific cell types and tissues. Nowadays, various targets are exploited for a potential pharmaceutical application. In general, the underlying particle-cell interaction mechanisms can be divided into two different types; one is based on specific biorecognitive mechanism, where, for example, surface immobilized antibodies [1-3], RGD peptides [4, 5], aptamers [6], and small molecules like folat [7] could be utilized; the other mechanism relies on nonspecific adhesion including hydrophobic and ionic interactions. For hydrophobic adhesion chitosan, sodium alginate, cellulose derivates such as sodium carboxymethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose, as well as polyacrylates such as Carbopol® and polycarbophil are usually applied [8, 9]. Moreover, nonspecific interaction might be achieved via particles carrying negative or positive surface charges. At this, due to prevailing negative charges at the surface of all cell types in multicellular organisms [10], cell-binding of positively charged drug carriers might be higher due to direct ionic interactions [11, 12]. In the present work two different mechanisms of adhesion were investigated using Caco-2 cells as artificial epithelial target. As to the biorecognition approach, the particles were modified with wheat germ agglutinin (WGA) representing a plant lectin which is known to interact with specific carbohydrates at the surface of mammalian cells [13]. For the ionic interaction representing a nonspecific mechanism, the particles were either surface coated with poly(ethyleneimine) or left unmodified yielding negatively charged particles due to their carboxylated nature.

Furthermore, upon administration in humans, either peroral or parenteral, the flow of materials under physiological conditions and the associated hydrodynamic forces will affect the binding of particles applied to cells and tissues. Thus, it would be interesting to investigate the impact of hydrodynamics on the cytoadhesion of particles. Different microfluidic systems have been established for this purpose, for instance, microfluidic co-culture migration systems [14], micropatterned substrates for HUVEC culture in microfluidic channels [15], as well as membrane devices for modeling the airways [16]. In the present work, a novel microfluidic system was employed to mimic physiological flow conditions recently described by Fillafer et al. [17]. This setup is operated by a chip-based pumping technology, which is based on surface acoustic waves (SAW) induced on a piezoelectric chip substrate. In an effort to allow for parallelization, four interdigital transducers (IDTs) instead of one were now operated simultaneously in a contact-free manner

without the need for tubing. Upon using Caco-2 cell monolayers, which are a well-established model of the human intestinal epithelium, grown in microchannels and combined with this SAW-chip, the impact of flow on the cytoadhesion of different modified microparticles to intestinal tissues could be investigated.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Yellow-green fluorescent carboxylated polystyrene particles with a diameter of 1000nm as well as poly(ethyleneimine) (PEI) (branched, MW 10 kDa) were purchased from Polysciences Europe GmbH (Eppelheim, Germany). Wheat germ agglutinin (WGA) was obtained from Vector Laboratories (Burlingame, USA). Sylgard® 184 Elastomer Kit was from Baltres (Baden, Austria). All other chemicals were of analytical purity.

2.2 Preparation of PEI coated carboxylated microspheres

100 μL of a suspension of 1 μm sized polystyrene microspheres (10 mg mL^{-1}) were added dropwise to 400 μL of a PEI solution in 100 mM phosphate buffer pH 5.8 (5 mg mL^{-1}) under ultrasonication (sonifier, Bandelin electronic UW 70/HD 70; tip, MS 72/D, Berlin, Germany). After adding 1 mL phosphate buffer pH 5.8, the particle suspension was purified by centrifugation (14000 rpm, 2 min, 4°C). Finally, after another washing step with 1500 μL of the same buffer, the particles were resuspended in 1 mL 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 and stored at 4°C until use. Control particles were treated as described above but using solely buffer instead of PEI. Zeta-potential analysis of the plain and PEI coated microspheres was performed after 12.5 fold dilution of the particle suspension with HEPES/NaOH pH 7.4 using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). Additionally, the particle suspension was checked for agglomerates under fluorescence microscope just before the binding studies.

2.3 Preparation of Wheat Germ Agglutinin functionalized microspheres

The covalent coupling of Wheat Germ Agglutinin to the surface of polystyrene microspheres was achieved via a carbodiimide method. 1 mg polystyrene microspheres was suspended in 20mM HEPES/NaOH pH 7.0 containing 0.1% Pluronic® F-68 and activated by adding 500 μL of a freshly prepared solution of 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (721 mg mL^{-1}) and N-hydroxysuccinimide (30 mg mL^{-1}) in the same buffer. After end-over-end incubation for 2h at room temperature, the microspheres were washed with 1000 μL HEPES/NaOH pH 7.4 containing 0.1% Pluronic® F-68 by centrifugation (14000 rpm, 2 min, 4°C) to remove excess reagents. After two additional washing steps with 1500 μL of the same buffer, the activated microspheres were resuspended in 500 μL HEPES/NaOH pH 7.4 containing 0.1% Pluronic® F-68 and mixed with 118.6 μL of a Wheat Germ Agglutinin solution (5 mg mL^{-1}). After end-over-end incubation overnight at room temperature, unreacted binding sites at the particle surface were saturated by incubation with 160 μL aqueous glycine solution (100 mg mL^{-1}) for 30 min at room temperature. Subsequently, the

microspheres were washed three times by centrifugation (14000 rpm, 2 min, 4°C) as above. Finally, the particles were resuspended in 1000 µL 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 containing 0.1% Pluronic® F-68 and stored at 4°C until use.

2.4 Production of sterile 3D-microchannels

The applied 3D-microchannels were composed of poly(dimethylsiloxane) (PDMS). Using the Sylgard® 184 Elastomer Kit as described by Fillafer [17], a mixture of 10 g base and 1 g curing agent was vigorously stirred and evacuated for 30 min to remove gas bubbles. The liquid prepolymer was then poured into pre-shaped aluminium molds and hardened over night at 120°C. In order to gain a hydrophilic surface, glass plates dimensioned 127 x 85 x 1.1 mm (length x width x height) were purified in piranha solution, representing a mixture of sulfuric acid and hydrogen peroxide 30% (7+3). After the PDMS replicas were carefully peeled off the molds, four identical 3D-microchannels were attached to the pretreated glass plate by using the same liquid prepolymer as adhesive and a template for reproducible positioning. To guarantee proper adhesion of the PDMS to the glass, the assembly was finally heated to 100°C for 30 min followed by disinfection in EtOH 70% and drying under laminar flow conditions prior to cell seeding.

2.5 Cell culture

The human intestinal epithelial cell line Caco-2 was purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Culture (DSMZ, Braunschweig, Germany). Cells were cultivated in RPMI 1640 cell culture medium containing 10% fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine and 150 mg mL⁻¹ gentamycine in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C and were subcultured by TrypLE® select. All tissue culture reagents were obtained from Sigma (St. Louis, USA) and Gibco Life Technologies Ltd. (Invitrogen Corp., Carlsbad, USA). For cell culture in 3D-microchannels, each disinfected microchannel was preincubated for 30 min with 500 µL sterile PBS at room temperature thus allowing the PDMS to reach its final size by swelling. Then, 500 µL Caco-2 single cell suspension (1.36 x 10⁵ cells mL⁻¹) were added and the cells were cultivated for 6 to 7 days until a confluent monolayer has formed. Cells between passage 43 and 52 were used throughout the study.

2.6 Microsphere binding to single cells

In order to determine the amount of single cell associated microparticles, 50 µL particle suspension (120 µg mL⁻¹, 60 µg mL⁻¹, and 30 µg mL⁻¹ respectively) were mixed with 50 µL Caco-2 cell suspension (5x10⁶ cells mL⁻¹) and incubated for 30 min at room temperature. Unbound or loosely associated particles were removed by centrifugation (5 min, 1000 rpm, 4°C) and a washing step with 500 µL PBS containing 0.1% Pluronic® (PBS/Pluronic®). The cells were resuspended in 500 µL PBS and analyzed on an EPICS XL-MCL analytical flow cytometer (Coulter, Miami, USA) using a forward-versus-side

scatter gate for inclusion of the single-cell population and exclusion of debris and cell aggregates. Fluorescence was detected at 525 nm (10 nm bandwidth) and the mean channel number of the logarithmic intensities of individual peaks was used for further calculations. Amplification of the fluorescence signals was adjusted to put the auto fluorescence signal of unlabeled cells in the first decade of the four decade log range. Data of 3000 cells were collected for each measurement and assays were performed in triplicate.

2.7 Carbohydrate binding specificity of WGA-functionalized microspheres

To assess the carbohydrate-binding specificity of functionalized microspheres, 50 μL particle suspension (120 $\mu\text{g/mL}$) were mixed with 100 μL N,N',N''-triacetylchitotriose solution (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ in PBS/Pluronic®) and 50 μL cell suspension (5×10^6 cells mL^{-1}). The mixture was incubated for 30 min at 4°C and washed once with 500 μL PBS/Pluronic® by centrifugation (5 min, 1000 rpm, 4°C) in order to remove unbound or loosely associated microspheres. Cells were resuspended in 500 μL PBS and analyzed by flow cytometry in triplicate as described above.

2.8 Preparation of the multichannel SAW-chip

The multichannel SAW-chip used for the present work had a similar set-up as described by Fillafer [17]. Briefly, four interdigital transducers (IDTs) were glued into a prestructured aluminium block and connected with ports for cabling. Windows in the aluminium block allow microscopic inspection with inverted or upright microscopes during experiments (Fig. 1). The system is operated via a radio frequency generator (SMB100A, Rohde&Schwarz GmbH, Austria) connected in series to a self-cooled high power amplifier (LZY-1, Mini Circuits, Brooklyn, USA) and a fixed attenuator (VAT-3W2+, Mini Circuits, Brooklyn, USA). Finally, the RF signal is distributed to the four IDTs by a 4-way divider (D1572-102, Werlatone, Brewster, USA).

2.9 Pulse-chase binding studies on Caco-2 cell monolayers at stationary and flow conditions

In order to characterize the interaction between polystyrene microparticles with different surface coatings and Caco-2 cell layers as well as the impact of flow on the adhesion, the particle suspensions were diluted in respective buffers to achieve working concentrations of 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively. Prior to the experiments, the cell culture medium was removed from the 3D-microchannels and the cell monolayers were washed once with 500 μL of the respective buffer. Each microchannel was filled with 500 μL of the particle suspension and covered with a glass cover slip. Then, 200 μL of water were pipetted on each IDT as coupling medium and the glass plate was placed on the SAW-chip. The pulse-incubation was performed for 30 minutes at room temperature either under stationary conditions or under flow conditions with a flow velocity of 2000 $\mu\text{m s}^{-1}$. After removal of unbound or loosely adhered particles by two washing steps with 500 μL of the respective

buffer per channel, the relative cell-associated fluorescence intensities were analyzed at 440/485 nm using a microplate fluorimeter (Infinite M200, Tecan, Grödig, Austria). Subsequently, the cell monolayers were further incubated for 30 minutes at room temperature either under stationary conditions or under flow conditions at a flow velocity of $2000 \mu\text{m s}^{-1}$ (chase-incubation). Finally, after one washing step, the relative cell-associated fluorescence intensities were assessed again as described above.

2.10 Fluorescence microscopy

To visualize the microparticle distribution on the Caco-2 cell surface at the end of the pulse-chase-experiments and to validate confluence of the cell monolayer after exposure to flow, fluorescence together with differential interference contrast (DIC) microscopy was applied. Images of the cell layers were acquired without any specific preparation immediately after fluorescence quantification using a Zeiss Axio Observer.Z1 microscopy system equipped with the LED illumination system “Colibri” and the AxioVision Rel. 4.8.2 software (Zeiss, Göttingen, Germany). That way, the amount of cell-associated microspheres could also be correlated to the quantified fluorescence intensities.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of the surface modification of the polystyrene microspheres

Although the polystyrene particles used in this work are not biodegradable and consequently not suitable for administration as drug carriers, they are well suited for basic systematic studies on particulate drug formulations due to some interesting characteristics such as the well defined size class and the potentially functionalized surface. Since many polymers used for drug delivery purposes feature carboxyl end groups, carboxylated polystyrene microspheres were used in the present work carrying negatively charged groups at their surface. According to measurements, this results in a negative zeta potential of -85.2 ± 6.1 mV at pH 7.4. Utilizing these negative charges, cationic polyelectrolytes might thus be adsorbed onto the surface of carboxylated microspheres. A series of natural and synthetic polyelectrolytes have been employed for this purpose, including protamine [18], chitosan [19-21], Eudragit®RL [22], and poly(L-lysine) [5, 23]. However, due to the high density of amino groups [24] low molecular weight branched PEI was used in the current study. Following a modified protocol from Trimaille et al. [25], positive charges could be introduced at the surface of the particles as confirmed by an inversion of the zeta potential to 71.2 ± 1.4 mV at the same pH.

Furthermore, wheat germ agglutinin (WGA), which can specifically bind to sialic acid and N-acetyl-D-glucosamine, was covalently coupled to the surface of the microparticles using a carbodiimide method. In order to assess the binding specificity of WGA-functionalized microspheres, an inhibition test was performed. At this, the free complementary carbohydrate N,N',N''-triacetylchitotriose competed with oligosaccharides within the glycocalyx of the Caco-2 cells for the binding to WGA-modified particles. As shown in figure 2, the number of cell-associated particles decreased in presence of increasing amounts of chitotriose to a minimum of 26.6% of the initial value at 40 nmol carbohydrate per 2.5×10^5 cells. This confirms that the interaction between cells and WGA-modified particles was mostly due to the lectin-coat of the microspheres representing a specific carbohydrate-binding moiety.

3.2 Binding characteristics of surface modified polystyrene microspheres to Caco-2 single cells and monolayers under stationary conditions

In order to study the impact of the different coatings, the binding rates of polystyrene microspheres either via ionic (positively, negatively charged) or biorecognitive interactions to Caco-2 single cells (Figure 3A) as well as to Caco-2 cell monolayers (Figure 3B) were assessed under stationary conditions. As illustrated in Figure 3, WGA-functionalized microparticles revealed the highest binding efficiency concerning both, single cells and monolayers.

In case of PEI-coated particles, the determined relative cell-associated fluorescence intensities showed a very high variance in both assays as indicated by the large error bars. This might be due to the strong agglomeration tendency of PEI-coated particles in PBS buffer. As shown in figure 4, fluorescence imaging of the particle binding to Caco-2 cells also confirmed the potential formation of large aggregates in single cell as well as in monolayer experiments for PEI-microspheres as compared to WGA-grafted or negatively charged particles.

Detailed studies on the stability of PEI-coated microspheres revealed that their agglomeration tendency was highly depending on the storage time as well as the buffer system used for the particle suspension. In order to characterize the aggregation behaviour of PEI-particles, the polydispersity index (PDI) was assessed in different buffer systems. According to the literature [26-29], the PDI is a width parameter describing the size distribution of particles with a value between 0 and 1. A PDI value of 0.1 or below indicates monodisperse particles; a PDI between 0.1 and 0.5 represents particles with small variations in size; more than 0.5 signalizes a very broad size distribution rendering the suspension rather useless. As illustrated in table 1, the PDI of PEI-microspheres rose within 30 min after coating in all buffers tested. However, using 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 (HEPES) as buffer system, the increase in PDI was only 1.8 fold as compared to the initial values immediately after coating and remained around 0.1 pointing at a narrow size-distribution. In contrast, using isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 (isoHEPES) and PBS the PDI increased 4.0 fold and 7.4 fold, respectively. However, in isoHEPES the PDI after 30 min was still smaller than 0.5 indicating that the particles retained a still acceptable size distribution. After 30 min in PBS, large variations in particle size were detected as represented by a PDI of almost 1, which means that the samples might obtain many agglomerated particles. The different size distributions could also be verified by fluorescence microscopy as shown in table 1 (last row), clearly indicating different aggregation tendencies. Although the PDI was smaller than 0.5 in case of all three buffer systems directly after coating, PBS still exhibited the largest PDI as compared to isoHEPES and HEPES, which again confirms the larger agglomeration trend in PBS buffer. In order to avoid formation of aggregates, the microspheres were coated with PEI directly before use and stored in 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 which emerged to be the best storage medium. However, this buffer system could not be used for the cell-binding studies due to the restricted viability of cells in non-isotonic environment. Although the isotonisation of 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 also seemed to foster the aggregation process of PEI-coated particles, compared with PBS the PDI of 0.423 was within an acceptable range thus rendering isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 potentially suitable for further particle-cell experiments.

Although human cells obtain a net negatively charged surface, it is difficult to conclude if positive particles actually implicate a higher cell binding than negatively charged particles due to the

pronounced agglomeration problem. Nevertheless, the results clearly indicate that both ionic interactions (positive and negative particles) were characterized by a lower binding efficiency for Caco-2 cells in comparison with WGA-mediated biorecognitive interactions.

3.3 Influence of different buffers on the binding properties of surface modified microparticles

In order to evaluate the impact of cell-compatible buffers on the particle-cell interaction and to select a suitable buffer system for the upcoming experiments, binding studies on Caco-2 cell monolayers were performed with particle suspensions in PBS containing 0.1% Pluronic® F-68 (PBS/Pluronic®) as well as isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 containing 0.1% Pluronic® F-68 (isoHEPES/Pluronic®) pursuing the same protocol as described above (section 3.2 monolayer experiments). These assays were carried out under stationary conditions with particle concentrations of 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for 30 min.

As illustrated in Figure 5, the cell binding rates of WGA-grafted particles were clearly influenced by the buffer system used for the assay. Interestingly, no significant difference could be detected for the positively and the negatively charged particles. However, when the mean relative cell-associated fluorescence intensities of PEI-coated particles in isoHEPES/Pluronic® were compared with those in PBS/Pluronic®, the quantity of cell associated microspheres decreased by about a third at the mean. This finding is in accordance with previous studies on the PDI revealing that positive particles were more likely to agglomerate in PBS/Pluronic® than in isoHEPES/Pluronic®. Due to this pronounced agglomeration tendency of PEI-coated particles, the observed increase in cell associated fluorescence in case of PBS assays as already discussed in section 3.2 can be explained by binding of particle clusters instead of single particles. This hypothesis is also supported by the huge standard deviations in the single cell and monolayer assays indicating a high variability in the interplay between particle aggregation and cell binding. Interestingly, according to measurements the pH as well as the osmolarity and according to calculations the ionic strength of PBS and isoHEPES are identical. Thus, there was another impact of the buffer system on the particle-cell interaction. For that purpose the influence of the buffers on the fluorimetric detection or alterations of the surface charge of particles and cells as well as the interactions between them were taken into consideration. According to detailed experiments, a buffer-induced alteration of fluorescence intensity is very unlikely (data not shown). However, the surface charge of cells and particles could probably be affected or altered provoking different interaction kinetic, since PBS contains multivalent ions as compared to isoHEPES. Furthermore, due to the probably insufficient charge compensations at the particle surface during the PEI-coating process, locally negative and positive surface areas might be created promoting the agglomeration process.

Considering the variation of the determined MFI as shown in Figure 5, the calculated standard deviation for the PEI-particle binding was considerably lower in case of isoHEPES. In line with the reduced tendency for aggregate formation, isoHEPES/Pluronic® instead of PBS/Pluronic® was thus used as standard buffer for the binding studies in 3D-microchannels, although adhesion of WGA-modified microspheres is significantly reduced in this buffer which might lead to an underestimation of the actual binding capability of these particles. Additionally, PEI-coated particles were prepared immediately before the experiments and all particles were sonified for resuspension to exclude agglomerations as well as checked by fluorescence microscopy to guarantee proper conditions.

3.4 Pulse-chase cytoadhesion studies of modified polystyrene microspheres in a multichannel acoustically-driven microfluidic system

Upon administration in humans, either peroral or parenteral, the flow of materials under physiological conditions and the associated hydrodynamic forces will affect the binding of particles to cells and tissues. To investigate the impact of hydrodynamics on the cytoadhesion of particles, a microfluidic setup similar to that described by Fillafer [Lit] was used to characterize the cytoadhesion under flow conditions. This microfluidic platform is based on surface acoustic waves (SAW), which nowadays can be generated and controlled precisely in nanometer scale using chip-technology. In the present work, the SAW-chip consisted of interdigital electrodes structured on a piezoelectric substrate (lithium niobate) and serves as an interdigital transducer (IDT), which could be excited at appropriate frequencies. Due to the resulting deformation of the substrate surface the SAW is generated. Furthermore, when a liquid is in contact with the IDT surface, the SAW is coupled into the liquid and the resulting pressure gradient acts as a pumping force, which provokes streaming and mixing inside the liquid. In order to confine the flow of the liquid to vessel-like structures, poly(dimethylsiloxane) (PDMS)-based channels with a size of 44 mm x 4 mm x 3 mm (length x width x height) made by replica molding were used. To improve reproducibility and to enhance versatile applicability of acoustically-driven microfluidics, a SAW platform with four identical IDTs, which were assembled on an aluminium block (Figure 1) and could be operated in parallel, has recently been developed in our group. Moreover, the device was designed in a way that the applied glass plates, which serve as a support for the PDMS-channels and allow cell growth, were of the same size as standard microplates. That way, it is possible to detect plate-associated luminescence, absorbance or fluorescence with high spatiotemporal resolution in standard microplate readers.

Using this multichannel acoustically-driven microfluidic system, a series of cytoadhesion studies of surface modified particles was performed following different pulse-chase incubation setups. Throughout the experiments Caco-2 cell monolayers grown to confluence in 3D-microchannels were used. At first, the cells were incubated with all three types of polystyrene microspheres (WGA-

grafted, PEI-coated and negatively charged) under stationary conditions. Both phases, the pulse- and the chase-incubation, were lasting for 30 min at RT each (s/s). After the pulse-incubation but prior to the fluorescence readout of the pulse-phase a washing step was performed in order to remove unbound or loosely attached particles. As illustrated in Figure 6, at the mean, a slight difference of the cell-associated fluorescence could be observed between the pulse- and the chase-step for each kind of particle. The decrease in particle binding after the chase incubation was highest for the positively charged microspheres amounting to 36% of the pulse-phase value. WGA-modified particles yielded the best results with 89% of stably bound particles after the chase-phase. However, this s/s assays could not reflect the impacts of flow. Therefore, microsphere binding to Caco-2 cells was also assessed using a s/f setup, where a stationary pulse-incubation as a preloading step was followed by a chase-incubation under flow conditions. That way, loosely bound microspheres were supposed to detach from the cell monolayers due to the streaming. Interestingly, as shown in Figure 6, almost no difference between the two phases could be observed despite shear stress was applied to the preloaded monolayers. Finally, to simulate in-vivo conditions, the pulse-chase assay was performed with both incubation-steps under flow conditions (f/f). As to the s/s and s/f studies, the impact of hydrodynamic drag during the chase-phase on the cell-binding of the particles was rather low. As compared to the other assay setups, however, it was interesting to observe that the binding rates after the pulse-incubation in f/f studies were slightly higher for WGA-grafted and negatively charged spheres amounting to 117% and 126%, respectively. Considering the size of the polystyrene microparticles used in this work being 1 μm , only about 1% of the added particles were calculated to be deposited during 30 min of incubation. Thus, the shear stress of flow might lead to a down-drift of the microspheres, which brings more particles in near contact with the cells and results in a higher number of cell-associated particles.

All in all, the series of pulse-chase incubation studies about cytoadhesion of different types of polystyrene microspheres revealed that the impact of hydrodynamic stress on pre-bound particles at the surface of cell monolayers is rather low. Loading of the colloids under flow conditions, however, might increase the probability of access of particles to the cell surface due to additional effects of the shear stress of flow.

Concerning the kind of surface modification, WGA-grafted particles exhibited the highest binding rates to Caco-2 monolayers, independent from the type of assay performed, exceeding that of positively and negatively charged particles between 2.13 to 2.98 fold (Figure 6). Hence, as also demonstrated in section 3.2, biorecognitive interactions seem to provide a higher binding efficiency to cells than ionic interactions. A final comparison between the cytoadhesion efficiencies of positive and negative particles was difficult because of the high standard deviations of positively charged

particles due to the fact that the storage time after modification as well as the buffer systems used might further influence the results significantly.

However, it should be kept in mind that Caco-2 cells representing colon carcinoma cells feature surface characteristics which might be different to their healthy counterparts. Thus, the presented binding efficiencies of particles might not exactly reflect the binding to healthy intestinal epithelium. Using primary cells might clarify this question. Additionally, during this work particles of only one single size (1 μm) were applied and the flow velocity was set to a constant value of 2000 $\mu\text{m s}^{-1}$. However, the dimension of the particle surface, the mass of particles, and the deposition rates alter according to the diameter of the colloids. Moreover, according to Decuzzi et al. [30] the role of particle shape should be considered for the bioadhesive behaviour of particulate formulations. Hence, it might be interesting to use particles with different sizes as well as shapes in further studies. Moreover, also the flow velocities should be varied, since they determine the shear rates and shear stress which represent the most important parameters of hydrodynamic drag. In addition, it would be interesting to perform these studies with different types of cells as the properties of the monolayer surface might also influence the interaction between particles and the cells.

4. Conclusion

Carboxylated polystyrene microspheres with 1 μm in diameter were either coated with PEI to achieve a conversion of the surface charge from negative to positive or modified with WGA to obtain a carbohydrate specific surface. As to the influence of different binding mechanisms on the characteristics of particle-cell interactions, WGA-grafted particles relying on biorecognition exhibited a higher cell binding efficiency as compared to PEI-coated or unmodified carboxylated microspheres which provoke ionic interactions. For positively charged PEI-particles a buffer system which provides stability and impedes agglomeration has to be selected. Moreover, these particles should be carefully controlled under the microscope to check for potential aggregation prior to use. Studying the cytoadhesive properties of particles under flow conditions in an acoustically-driven microfluidic multichannel system demonstrated, that the hydrodynamic drag, which is likely to occur throughout the organism during drug administration, has no negative impact on cell-bound particles at a flow velocity of 2000 $\mu\text{m s}^{-1}$ independent from the type of particle preloading, but even leads to an increased probability of binding. Thus, application of particulate drug formulations with a size smaller than 1 μm might offer stable adhesion of the drug delivery system to the pharmaceutical target also in vivo. That way, localized or targeted particulate therapy concepts relying on specific interactions with cell membrane components should prevail provided that the size of the formulation is appropriate. All in all, the impact of flow on the bioadhesive properties of different drug formulations has to be further investigated in more detail due to the ubiquitous presence of hydrodynamic forces under physiological conditions. Thus, it might be advisable to enhance the current results with studies using particles of different sizes as well as shapes and under different flow velocities.

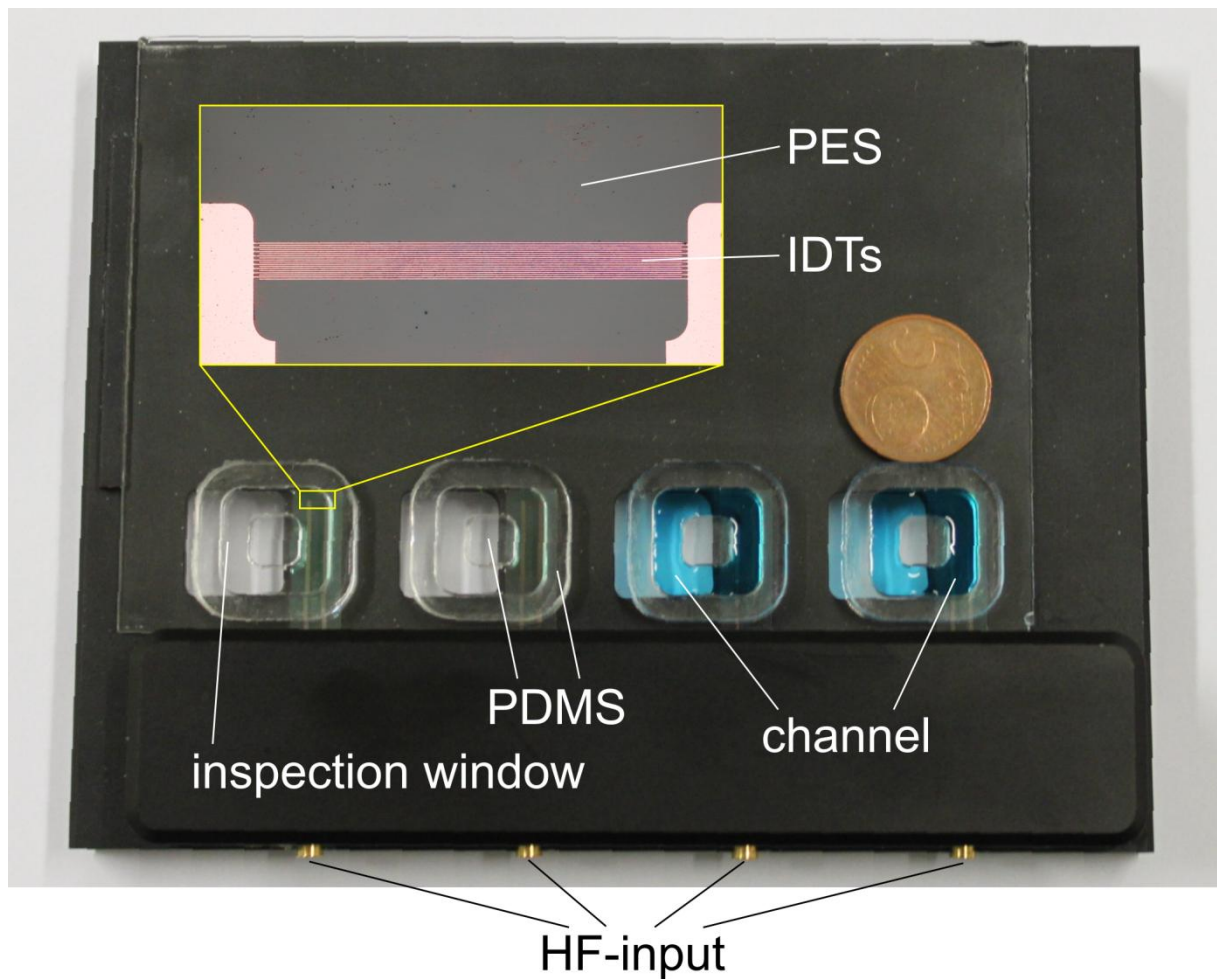


Figure 1. Acoustically-driven microfluidic multichannel system. The surface acoustic wave (SAW) - chip consists of four parallelized interdigital electrodes, which are structured on a piezoelectric substrate (PES) and connected with a high frequency connector (HF-input) each, thus serving as four identical interdigital transducers (IDTs). Four 3D-microchannels composed of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) are attached to a glass plate dimensioned 127 x 85 x 1.1 mm (length x width x height) for the cultivation of cells. Inspection windows in the aluminium block allow microscopic observation during experiments.

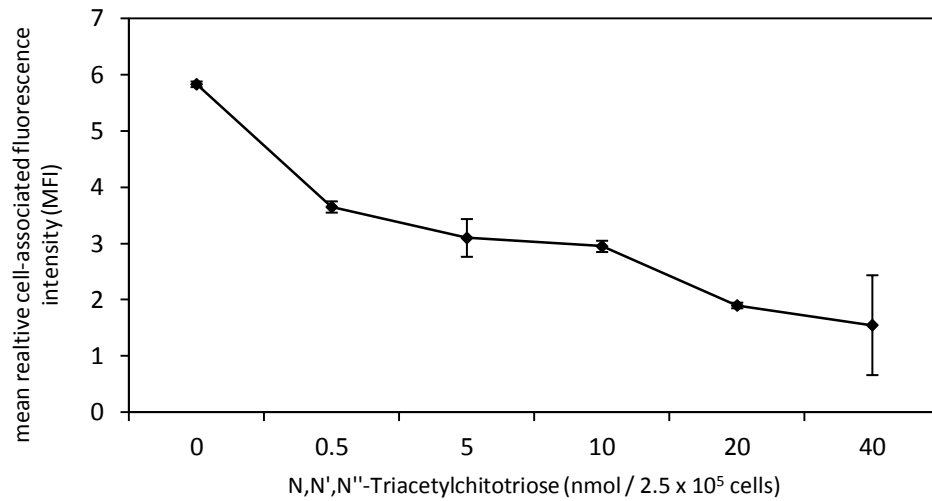


Figure 2. Competitive inhibition of the binding of WGA-functionalized microspheres to Caco-2 single cells using N,N',N''-Triacetylchitotriose at different concentrations. Particle binding was determined by flow cytometry (mean $\pm$ SD, n=3).

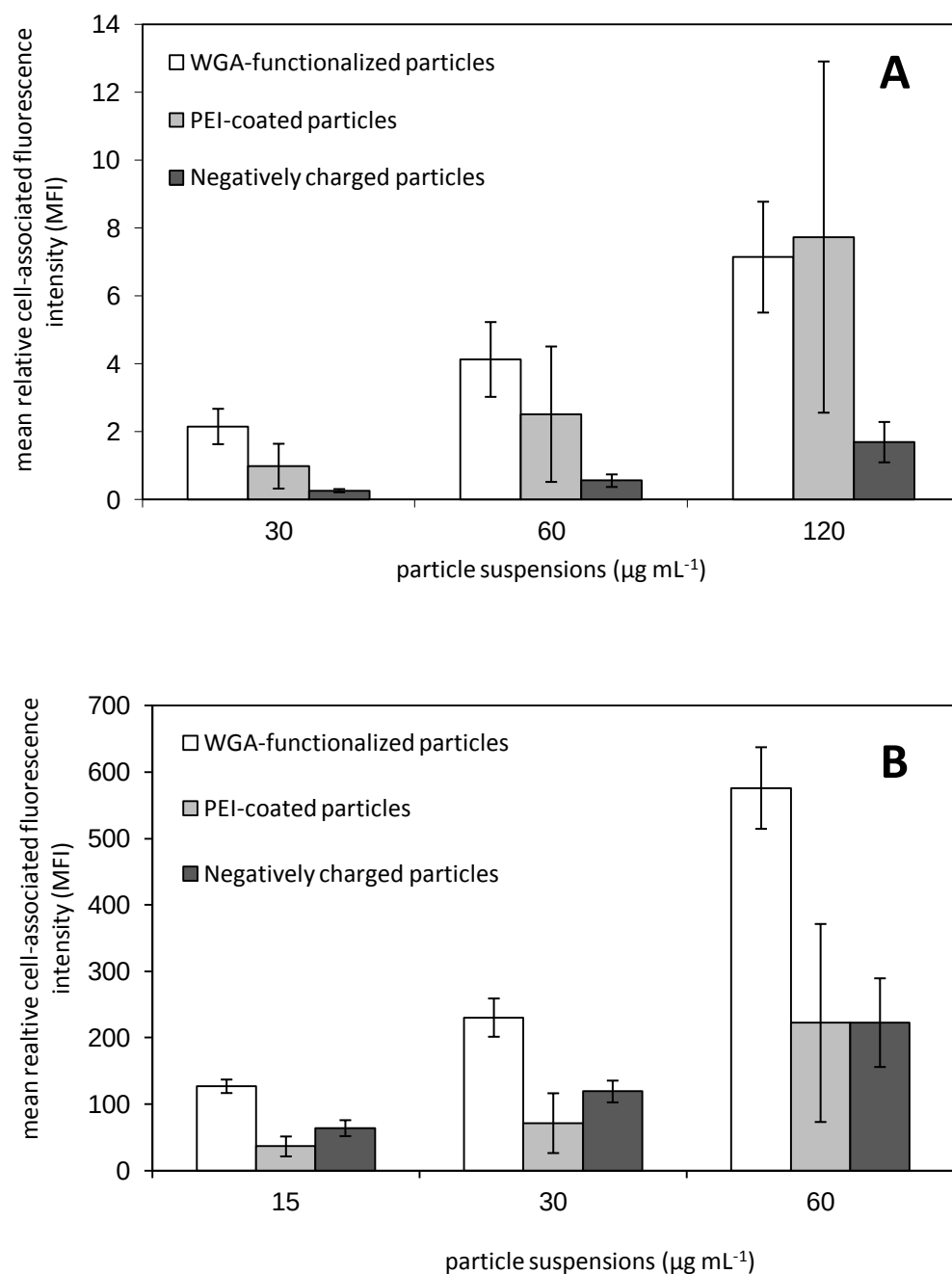


Figure 3. Binding of polystyrene microspheres with different surface modifications to Caco-2 single cells (A) and to Caco-2 monolayers (B) (n=3). Cells were incubated for 30 min at RT under stationary conditions and analysed by flow cytometry (single cells) or fluorimetry (monolayers).

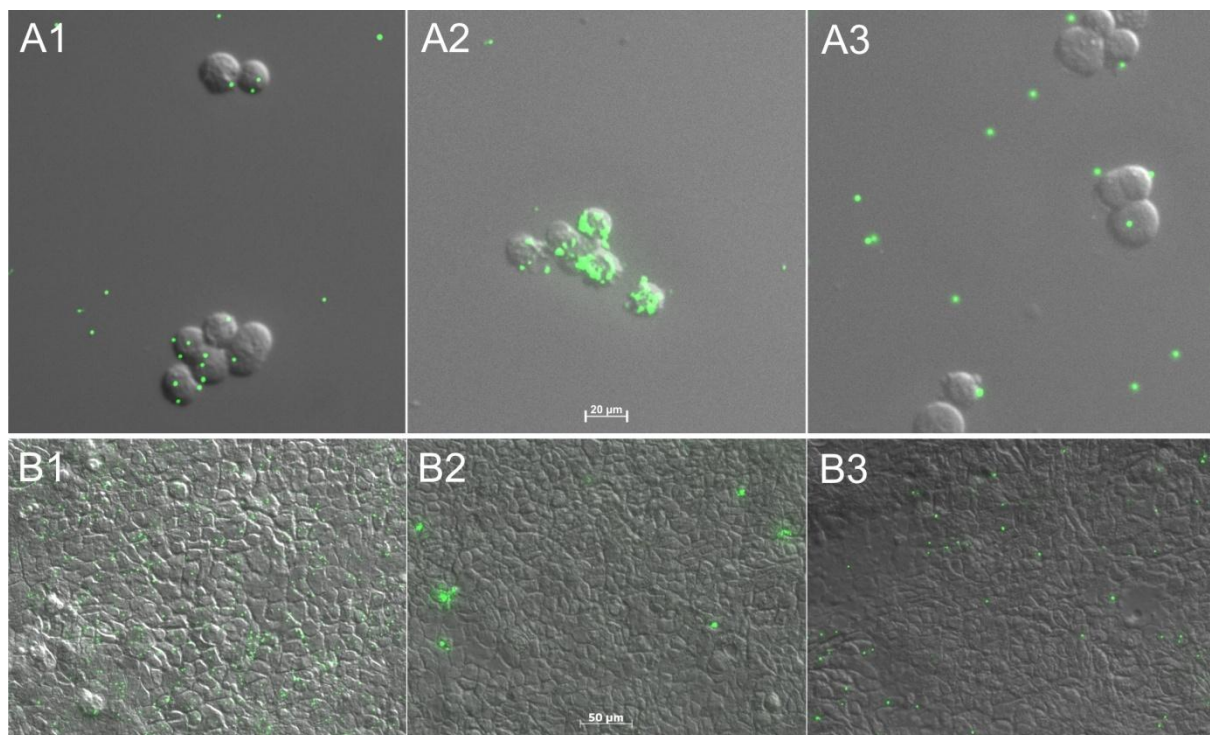


Figure 4. Fluorescence imaging of the particle binding to Caco-2 single cells (A) and monolayers (B) under stationary conditions: WGA-grafted microparticles (1), PEI-coated microparticles (2), negatively charged microparticles (3).

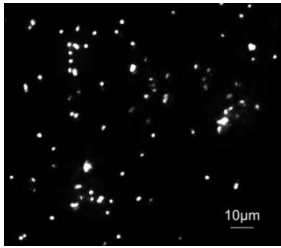
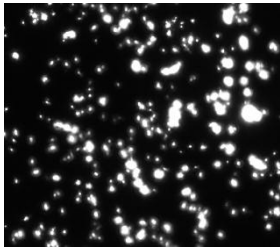
Polydispersity Index (PDI)	HEPES	isoHEPES	PBS
immediately after coating	0.063	0.105	0.121
30 min after coating	0.112	0.423	0.893
			

Table 1. Polydispersity index of PEI-coated microspheres in different buffer systems as well as microscopic fluorescence images of these particles 30 min after the coating process.

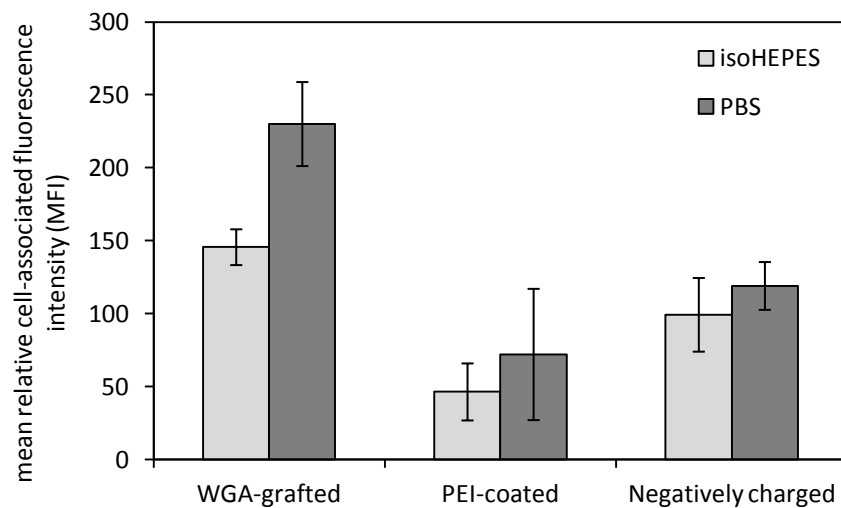


Figure 5. Influence of the buffer system on the binding characteristics of surface modified polystyrene microspheres ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) to Caco-2 cell monolayers after incubation for 30 min at RT under stationary conditions.

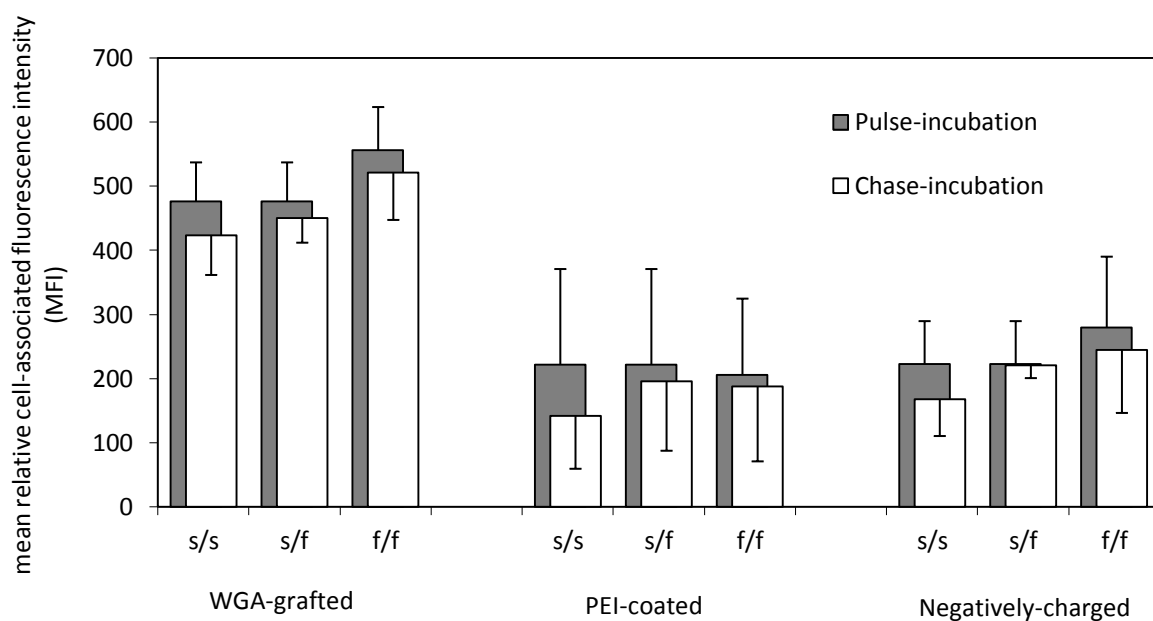


Figure 6. Pulse-chase binding studies of WGA-grafted, positively and negatively charged microspheres ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) to Caco-2 cell monolayers at stationary and flow conditions. s/s represents a setup where the incubation was identical for both phases: 30 min, RT, stationary conditions; s/f represents a setup with a pulse-incubation for 30 min at RT under stationary conditions followed by a chase-incubation for 30 min at RT under flow conditions. f/f represents a setup where the incubation was identical for both phases: 30 min, RT, flow conditions. After the pulse- as well as after the chase-incubation but prior to fluorescence readout washing steps using isoHEPES/Pluronic® were performed.

References

- (1) B. Sun, B. Ranganathan and S.S. Feng, *Biomaterials*, 29 (2008) 475.
- (2) S. Acharya, F. Dilnawaz and S.K. Sahoo, *Biomaterials*, 30 (2009) 5737.
- (3) J. Lu, J.K. Jackson, M.E. Gleave and H.M. Burt, *Cancer Chemoth. Pharm.*, 61 (2008) 997.
- (4) Z. Wang, W.K. Chui and P.C. Ho, *Pharm. Res.*, 26 (2009) 1162.
- (5) S. Faraasen, J. Voros, G. Csucs, M. Textor, H.P. Merkle and E. Walter, *Pharm. Res.*, 20 (2003) 237.
- (6) O.C. Farokhzad, J. Cheng, B.A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P.W. Kantoff, J.P. Richie and R.P. Langer, *Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103 (2006) 6315.
- (7) A.R. Hilgenbrink and P.S. Low, *J. Pharm. Sci.*, 94 (2005) 2135.
- (8) J. D. Smart, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, 57 (2005) 1556.
- (9) V. Grabovac, D. Guggi and A. Bernkop-Schnuerch, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, 57 (2005) 1713.
- (10) J.N. Mehrishi and J. Bauer, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1984.
- (11) L. Thiele, B. Rothen-Rutishauser, S. Jilek, H. Wunderli-Allenspach, H.P.Merkle and E. J. Walter, *Control. Release*, 76 (2001) 59.
- (12) L. Thiele, J.E. Diederichs, R. Reszka, H.P. Merkle and E. Walter, *Biomaterials*, 24 (2003) 1409.
- (13) C. Bies, C.-M. Lehr and J.F. Woodley, *Adv. Drug. Del. Rev.*, 56 (2004) 425.
- (14) E. Gutierrez and A. Groisman, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 2249.
- (15) W.S. Rhee, A.M. Taylor, C.H.Tu, D.H. Cribbs, C.W. Cotman and N.L. Jeon, *Lab. Chip.*, 5 (2005) 102.
- (16) D. Huh, H. Fujioka, Y.C. Tung, N. Futai, R. Paine, J.B. Grotberg and S. Takayama, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 1369.
- (17) C. Fillafer, G. Ratzinger, J. Neumann, Z. Guttenberg, S. Dissauer, I.K. Lichtscheidl, M. Wirth, F. Gabor and M.F. Schneider, *Lab. Chip*, 9 (2009) 2782.
- (18) J.M. Martínez Gómez, N. Csaba, S. Fischer, A. Sichelstiel, T.M. Kündig, B. Gander and P. Johansen, *J. Control. Release*, 130 (2008) 161.
- (19) A. Vila, A. Sánchez, M. Tobío, P. Calvo and M. J. Alonso, *J. Control. Release*, 78 (2002) 15.
- (20) H. Yamamoto, Y. Kuno, S. Sugimoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima, *J. Control. Release*, 102 (2005) 373.
- (21) R. Yang, S.G. Yang, W.S. Shim, F. Cui, G. Cheng, I.W. Kim, D.D. Kim, S.J. Chung and C.K. Shim, *J. Pharm. Sci.*, 98 (2009) 970.
- (22) K. Dillen, J. Vandervoort, G. Van den Mooter and A. Ludwig, *Int. J. Pharm.*, 314 (2006) 72.
- (23) M. Müller, J. Voros, G. Csucs, E. Walter, G. Danuser, H.P. Merkle, N.D. Spencer and M. Textor, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 66 (2003) 55.

- (24) O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J.P. Behr, P. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92 (1995) 7297.
- (25) T. Trimaille, C. Pichot and T. Delair, Colloid. Surface. A, 221 (2003) 39.
- (26) R.M. Schiffelers, J.M. Metselaar, M.H.A.M. Fens, A.P.C A. Janssen, G. Molemay and G. Storm, Neoplasia, 7 (2005) 118.
- (27) M. Nidhin, R. Indumathy, K.J. Sreeram and B.U. Nair, Indian. Acad. Sci., 31 (2008) 93.
- (28) A.S. Lawrie, A. Albanyan, R.A. Cardigan, I.J. Mackie and P. Harrison, Vox. Sang. 96 (2009) 206.
- (29) R.H. Müller and R. Schuhmann, Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Band 38, 1st ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1996, Chapter 3.
- (30) P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap and M. Ferrari, Pharm. Res., 26 (2009) 235.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Clara Maria Pichl

Geburtsdatum/-ort: 29. 12. 1984, Hainburg

Staatsangehörigkeit: Österreich

Familienstand: ledig

Eltern: Brigitte und Robert Pichl

Bildungsgang:

2003-dato: Diplomstudium der Pharmazie; Universität Wien

Sommersemester 2010: Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und
Biopharmazie Wien

06.2003: Matura mit ausgezeichnetem Erfolg bestanden

06.2003: University of Cambridge ESOL Examinations; Level 1 Certificate in English

1995-2003: Gymnasium St. Ursula (Wien 1230)

1991-1995: Volksschule St. Ursula (Wien 1230)

Berufliche Tätigkeiten:

Seit 08.2004: Heilfried-Apotheke (Wien 1100)

10.2010-06.2011: Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Wien

Tutorin der Lehrveranstaltung Industrielle Arzneimittelherstellung

03.2010-06.2010: Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Wien

Tutorin der Lehrveranstaltung Grundpraktikum aus pharmazeutischer Technologie

07.2009: Voluntariat Idex (Indian Network for Development Exchange) (Indien, Goa)

09.2008-04.2009: Praxis Dr. Liselotte Preschitz (Wien 1070); Karenzvertretung Orthoptistin

10.2007-03.2009: United Chocolates (Wien 1010)

07.2001 und 07.2002: Apotheke zum Engel, heute Armonia Apotheke (1170 Wien)

