

ORGANI NA ČIPU IN NJIHOV POTENCIAL PRI VREDNOTENJU NANODOSTAVNIH SISTEMOV

ORGANS-ON-A-CHIP AND THEIR POTENTIAL IN CHARACTERIZATION OF NANODELIVERY SYSTEMS

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Klemen Kirbus, mag. farm.^{1, 2}
izr. prof. dr. Lovro Žibera, mag. farm.²
prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm.¹

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko tehnologijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: petra.kocbek@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Napredek farmacevtske nanotehnologije spremlja potreba po vrednotenju razvitih nanodostavnih sistemov in nanozdravil na modelih, ki posnemajo pogoje *in vivo*. To omogočajo organi na čipu, ki temeljijo na gojenju različnih vrst celic v tridimenzionalnem ogrodju v pretočnem sistemu. Prednost te tehnologije je možnost gojenja celic v bolj biorelevantnem okolju, kot so pogoji v klasičnih statičnih dvodimenzionalnih celičnih kulturah, in sicer v prisotnosti biomehanskih sil, ki delujejo na celice v čipih, kar vodi v spremenjeno izražanje genov in spremenjen fenotip celic. Organi na čipu se v raziskavah največ uporabljajo z namenom postavljanja modelov bolezni in za vrednotenje zdravilnih učinkovin *in vitro*. Z razvojem tehnologije se njihova uporaba širi tudi na vrednotenje nanodostavnih sistemov in nanozdravil, predvsem za vrednotenje njihovega prehanja skozi biološke bariere ter proučevanje njihovega protitumornega delovanja *in vitro*. Z nadaljnjim razvojem lahko pričakujemo prenos tehnologije organov na čipu iz raziskovalnih laboratorijev v širšo uporabo v farmacevtski industriji.

KLJUČNE BESEDE:

dostavni sistemi, nanodelci, organ na čipu, tumor na čipu, vrednotenje *in vitro*

ABSTRACT

The advancement of pharmaceutical nanotechnology is accompanied by the need to evaluate nanodelivery systems, especially nanoparticles, on models that mimic *in vivo* conditions. This is enabled by organs-on-a-chip, which represent cells cultured in a three-dimensional extracellular matrix with relevant fluidics. This setup offers a more biorelevant environment than traditional two-dimensional static cell cultures due to the biomechanical forces that influence gene expression and cell phenotype. Most research in the field is focused on establishing complex disease models or *in vitro* drug evaluation. Moreover, their use is expanding to include the evaluation of nanodelivery systems and nanomedicines. These chips are primarily used to study nanoparticle transport across biological barriers and the efficacy of nanodelivery systems against tumors *in vitro*. Continued development is expected to expand the



use of organs-on-a-chip from primarily research labs to broader applications within the pharmaceutical industry.

KEY WORDS:

drug delivery systems, nanoparticles, organ-on-a-chip, tumor-on-a-chip, *in vitro* characterisation

1 UVOD

Farmacevtska nanotehnologija je hitro razvijajoče področje, s pomočjo katerega lahko dosežemo tarčno dostavo zdravilnih učinkovin, zmanjšamo pojavnost neželenih učinkov ter izboljšamo topnost in hitrost raztapljanja zdravilnih učinkovin, njihovo permeabilnost skozi biološke membrane in prilagajamo farmakokinetiko zdravilnih učinkovin. Intenziven razvoj na področju farmacevtske nanotehnologije kaže porast števila kliničnih študij ter registriranih (nano)formulacij, saj je bilo leta 2015 na amerškem trgu registriranih le 13 nanozdravil, do leta 2021 pa je to število naraslo na več kot 100, hkrati pa je potekalo tudi več kot 550 kliničnih študij za registracijo novih nanozdravil. Več kot polovica nanozdravil je namenjena zdravljenju raka, preostanek pa predvsem zdravljenju infektivnih bolezni ter endokrinih in presnovnih motenj. Večina registriranih nanozdravil temelji na nanodelcih, torej delcih z velikostjo v nanometriškem območju, ki po ožji definiciji obsega območje velikosti 1–100 nm, v razširjeni definiciji pa vse do 1000 nm (1–3).

Nanodostavni sistemi imajo številne prednosti pred aplikacijo klasičnih parenteralnih formulacij. Omogočajo (i) zaščito vgrajene zdravilne učinkovine, (ii) prirejanje sproščanja, (iii) podaljšanje zadrževanja v organizmu in (iv) možnost koncentriranja in nalaganja na tarčnem mestu s pomočjo pasivnega ali aktivnega ciljanja (4). Poznamo različne vrste nanodostavnih sistemov, kot so npr. polimerni nanodelci, trdni lipidni nanodelci, liposomi, anorganski nanodelci, miceli, dendrimeri, konjugati protiteles s polimeri in konjugati nizkomolekularnih zdravilnih učinkovin s polimeri (1, 3). Zaradi razlik med vrstami nanodostavnih sistemov in kompleksnosti njihovega obnašanja v organizmu predstavljata zagotavljanje njihove varnosti in učinkovitosti velik izziv, saj so regulatorne smernice in zahteve za registracijo nanozdravil pomanjkljive ali nejasne (5). Glavni izziv pri registraciji nanozdravil predstavljajo razlike v farmakokinetiki zdravilne

učinkovine, vgrajene v nanodostavni sistem, v primerjavi z zdravilno učinkovino v klasični formulaciji, še posebej razlike v porazdeljevanju v organizmu in izločanju iz organizma. Poleg tega so predklinične študije pogosto nezadostne za zanesljivo napovedovanje obnašanja in delovanja nanozdravil pri ljudeh (5). Na obnašanje nanodostavnih sistemov v organizmu vplivajo njihova velikost in z njo povezana specifična površina, oblika, sestava in naboj na površini, pomembna pa je tudi njihova topnost ter biorazgradljivost (6). Za zagotavljanje varnosti nanozdravil, ki temeljijo na nanodelcih, je zato treba ovrednotiti njihovo porazdeljevanje v organizmu, presnovo, imunogenost, toksičnost ter izločanje, kar se v začetnih fazah farmacevtskega razvoja navadno izvaja na celičnih kulturah, nato pa nadaljuje v predkliničnih študijah na živalskih modelih (5, 6). Velik izziv pri uporabi celičnih kultur in živalskih modelov za vrednotenje nanodostavnih sistemov predstavljajo velike razlike v odzivih na isto vrsto nanodostavnega sistema med različnimi celi-

SLOVAR:

Učinek povečane prepustnosti in zadrževanja

(EPR): učinek, ki povzroči kopičenje nanodelcev v tumorskem tkivu zaradi povečane prepustnosti tumorskega žilja in sočasno zmanjšane limfne drenaže tumorskega tkiva

Mikrofluidika: veda, ki se ukvarja z manipulacijo zelo majhnih volumnov (mikro-, nano-, pikolitri) tekočin

Inducirane pluripotentne matične celice: matične celice, pripravljene iz telesnih celic s ponovno aktivacijo utišanih genov

Organi na čipu: čipi velikosti, ki je primerljiva velikosti mikroskopskega objektnega stekla, iz različnih materialov, v katerih gojimo celice v pretočnem sistemu

Telo na čipu: sistem sklopljenih organov na čipu z ohranjenimi fiziološkimi razmerji med posameznimi organi

Sferoid: skupek celic, ki se v tridimenzionalnem ogrodju samodejno organizirajo v sferično strukturo

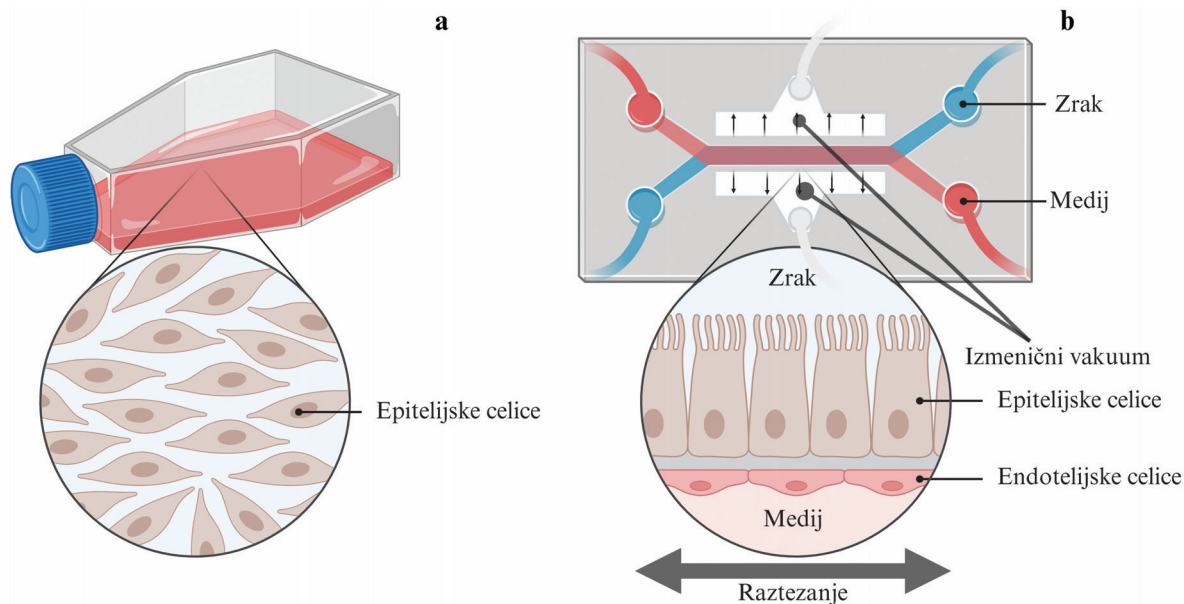
PEGilirani nanodelci: nanodelci z na površino vezanimi molekulami polietilenglikola, ki nanodelce prikrijejo celicam imunskega sistema in tako omogočajo njihovo podaljšano zadrževanje v krvnem obtoku ter upočasneno izločanje iz organizma

camii in organizmi, kar pogosto otežuje prenos rezultatov raziskav iz predkliničnih modelov na ljudi (6). Majhna je tudi napovedna vrednost rezultatov vrednotenja učinka povečane prepustnosti in zadrževanja (angl. *enhanced permeability and retention effect*, EPR) pri prenosu z živalskih modelov na ljudi. Učinek EPR je osnovni mehanizem za pasivno ciljanje nanodostavnih sistemov v tumorje (5). Za izboljšanje napovedne moči predkliničnih modelov je zato ključen razvoj novih, kompleksnejših modelov na osnovi človeških celic. V to skupino sodijo tudi organi na čipu. Ti predstavljajo mikrofluidne sisteme, ki omogočajo boljše posnemanje fizioloških pogojev in boljšo napoved učinkovitosti in varnosti nanodostavnih sistemov pri ljudeh.

2 ORGANI NA ČIPU

Organi na čipu temeljijo na mikrofluidnih sistemih, ki omogočajo zelo majhne pretoke tekočin (od pikolitrov do mililitrov na uro) skozi čip, v katerem so pritrjene celice. Organi

na čipu so tako nadgradnja klasičnih, dvodimenzionalnih (2D) celičnih kultur, saj omogočajo gojenje celic v pretočnih pogojih in dolgotrajnejše gojenje kot klasični sistemi (slika 1). Predstavljajo miniaturne modele tkiv, ki omogočajo učinkovito posnemanje fizioloških in patofizioloških pogojev *in vivo*, in navadno predstavljajo najmanjšo funkcionalno enoto organa (7). Preboj tehnologije organov na čipu predstavljajo pljuča na čipu, ki so jih razvili v raziskovalni skupini Ingberja in sodelavcev leta 2010 (8). Ta model je sestavljen iz epitelijske strani, na kateri so humane pljučne epitelijske celice. Le-te do dosežene konfluente gojijo v mediju, nato pa medij iz enega kanala odstranijo in apikalno stran konfluentnega sloja epitelijskih celic izpostavijo zraku, kar spodbudi njihovo diferenciacijo in izločanje surfaktantov. Na drugi strani fenestrirane membrane gojijo endotelijske celice pljučnih kapilar, ki so izpostavljene pretoku mimetika krvi (slika 1b). Model je sposoben raztezanja in krčenja, kar posnema biomehanske sile, ki so jim izpostavljene epitelijske celice v alveolih med dihanjem. Celice v modelu so ohranile viabilnost v obdobju več kot 14 dni po vzpostavitvi krvno-zračne bariere in so na epitelijski strani sproščale več surfaktantov kot v statičnih pogojih. Na postavljenem modelu pljuč na čipu so preskusili toksikološki odziv na



Slika 1: Shematski prikaz (a) klasične dvodimenzionalne celične kulture epitelijskih celic in (b) pljuč na čipu, s kokulturo epitelijskih celic ter endotelijskih celic, ki omogočajo aplikacijo izmeničnega vakuuma v stranskih komorah in simulacijo raztezanja in krčenja epitelijskega tkiva med dihanjem *in vivo*. Slika je narejena s pomočjo programa BioRender (<https://BioRender.com/j78w714>).

Figure 1: Schematic presentation of (a) a traditional two-dimensional epithelial cell culture and (b) lungs-on-a-chip with a co-culture of epithelial and endothelial cells, capable of expansion and contraction by the application of alternating vacuum. Created in BioRender (<https://BioRender.com/j78w714>).



12 nm nanodelce silicijevega dioksida, ki so jih aplicirali na alveolarni (zračni) strani. To je sprožilo vnetni odziv v endoteliju, ki ga v klasičnih statičnem modelu pljuč *in vitro* ni mogoče posnemati (8). Modelu pljuč na čipu je sledil razvoj modela črevesa na čipu ter razvoj drugih organov na čipu, in sicer jeter na čipu, različnih tumorjev na čipu, krvno možganske bariere na čipu in nenazadnje modela celotnega telesa, kot sta žival na čipu in človek na čipu (7, 9, 10).

Hiter razvoj organov na čipu je posledica številnih prednosti, ki jih ta tehnologija ponuja. Celice so v organih na čipu podvržene mehanskim vplivom (npr. pretoku medija), ki so jim izpostavljene tudi v telesu, kar vodi do sprememb v izražanju genov in spremenjenega fenotipa celic glede na celice gojene v statičnih pogojih (11). Prav tako je v organih na čipu navadno prisotna tridimenzionalna (3D) razporeditev celic glede na njihovo specifično funkcijo, kar omogoča združevanje različnih vrst celic v istem čipu. Pretok medija skozi organ na čipu omogoča tudi vključevanje imunskih celic v cirkulirajoč medij ter proučevanje njihove ekstravazacije iz žilnega kanala na čipu. S sistemi organov na čipu lahko z ustrezno zasnovo samega čipa dosežemo gradiente, npr. hranil, kisika ali zdravilnih učinkovin, ki omogočajo poustvarjanje kompleksnosti zgradbe tkiv, kot so tumorji ali jetrni lobuli. Kompleksne celične kokulture v organih na čipu omogočajo tudi posnemanje angiogeneze v tkivih in neovaskularizacije tumorjev, saj sistemi tumorjev na čipu pogosto vključujejo tudi endotelijske celice, ki se lahko razraščajo v tumorsko tkivo na čipu. Nadalje omogočajo organi na čipu vgrajevanje elektrod ali drugih senzorjev, s katerimi lahko spremljamo celične poskuse v realnem času; večina čipov pa je tudi optično transparentnih, kar omogoča spremljanje celic z različnimi vrstami mikroskopije (7, 9).

Po drugi strani je delo z organi na čipu veliko bolj zahtevno od dela s celicami v statičnih 2D-kulturah, prav tako pa potrebujemo specializirano opremo, ki s seboj prinaša višje stroške. Klasične celične kulture omogočajo visoko zmogljivo reševanje (angl. *high throughput screening*) in imajo validirane protokole za proučevanje toksikoloških in farmakoloških odzivov celic na potencialne nove učinkovine ali formulacije (12). Celice v 2D-kulturah rastejo v monosloju, kar jim zagotavlja enakomeren dostop do hranil in rastnih dejavnikov (13). Kljub široki uporabi imajo klasične celične kulture precej pomanjkljivosti, ki so povezane z odsotnostjo zunajceličnega ogrodja, odsotnostjo 3D-organizacije celic v biorelevantne barierne sisteme ter odsotnostjo biomehanskih dejavnikov. Po drugi strani lahko z organi na čipu dosežemo 3D-organizacijo celic, ki je podobna

zgradbi tkiv *in vivo*, omogočajo pa tudi gojenje primarnih celic ter diferenciacijo induciranih pluripotentnih matičnih celic (angl. *induced pluripotent stem cell*, iPSC), ki v 2D-kulturah ostanejo v stadiju nepopolne diferenciacije zaradi odsotnosti zunajceličnega ogrodja in pretoka medija (12). Organi na čipu omogočajo vključevanje različnih vrst celic. Najpogosteje uporabljamo celice nesmrtnih celičnih linij, saj so najbolj enostavne za rokovanje in gojenje. Zaradi njihovih slabosti z vidika spremenjenega izražanja genov in posledično fenotipa lahko celice nesmrtnih celičnih linij zamenjamo s primarnimi celicami ali izoliranimi vzorci tkiv (14). Primarne celice so izolirane iz tkiva odvzetega določenemu bolniku in ohranijo njegov genotip in fenotip, a so drage, zahtevne za rokovanje ter sposobne manjšega števila delitev *in vitro* pred izgubo funkcije in dediferenciacijo (15). Zato že vse od njihovega odkritja leta 2006 narašča uporaba iPSC, ki jih pripravimo z dediferenciacijo in ponovno diferenciacijo celic iz krvi določenega bolnika. Podobno kot primarne celice tudi iPSC ohranijo bolnikov genotip in fenotip, kar omogoča izvedbo personaliziranih poskusov na bolnikovih celicah. Diferenciacija iPSC v 2D-kulturah je zahtevna in pogosto nepopolna, zato se razvijajo alternativne metode za njihovo gojenje, med katere sodijo organoidi in organi na čipu (16).

Kompleksnost organov na čipu je zelo različna, vse od enostavnega sistema žile na čipu, ki jo predstavlja kanal s pretokom celičnega medija oziroma mimetika krvi, v katerem rastejo endotelijske celice, do zelo kompleksnih modelov, ki med seboj povežejo več organov na čipu v tako imenovano telo na čipu (16). Prilagodljiva kompleksnost organov na čipu ter celotnega sistema omogoča uporabo organov na čipu v različnih fazah farmacevtskega razvoja, od odkrivanja novih zdravilnih učinkovin do preskušanja kompleksnih odmernih intervalov ali polifarmakoterapije (9, 17). V vmesnih fazah razvoja omogočajo napovedovanje farmakokinetike ter toksikoloških parametrov potencialnih novih zdravilnih učinkovin (17). Sklopitev organov na čipu s tehnologijo iPSC omogoča uporabo organov na čipu na področju personalizirane medicine, saj lahko učinkovitost izbrane zdravilne učinkovine pri posameznem bolniku pred aplikacijo preskusimo na organu na čipu, ki temelji na bolniku lastnim celicam. S takšnim pristopom lahko ugotovljamo npr. z uporabo tumorja na čipu učinkovitost protitumorskih zdravil pri določenemu bolniku ali preverjamo varnost apliciranega zdravila z vrednotenjem njegovega toksičnega vpliva, npr. na kardiomiocite v modelu srca na čipu (18, 19). To je posebej pomembno pri protitumorskih zdravilih, katerih odmerik je pogosto omejen zaradi njihovega toksičnega delovanja na netarčna (zdrava) tkiva (20).

3 VREDNOTENJE NANODOSTAVNIH SISTEMOV S POMOČJO ORGANOV NA ČIPU

Tehnologija organov na čipu omogoča poleg vzpostavljanja kompleksnih modelov bolezni (21) tudi napovedovanje farmakokinetičnih lastnosti novih zdravilnih učinkovin (22) ter določanje njihovih toksikoloških profilov (17). Prav tako lahko organe na čipu uporabimo za testiranje nanodostavnih sistemov, zlasti za raziskave njihovega prodiranja in zadrževanja v tumorjih ter prehajanja bioloških barrier (23).

3.1 PREHAJANJE NANODELCEV SKOZI BIOLOŠKE BARIERE

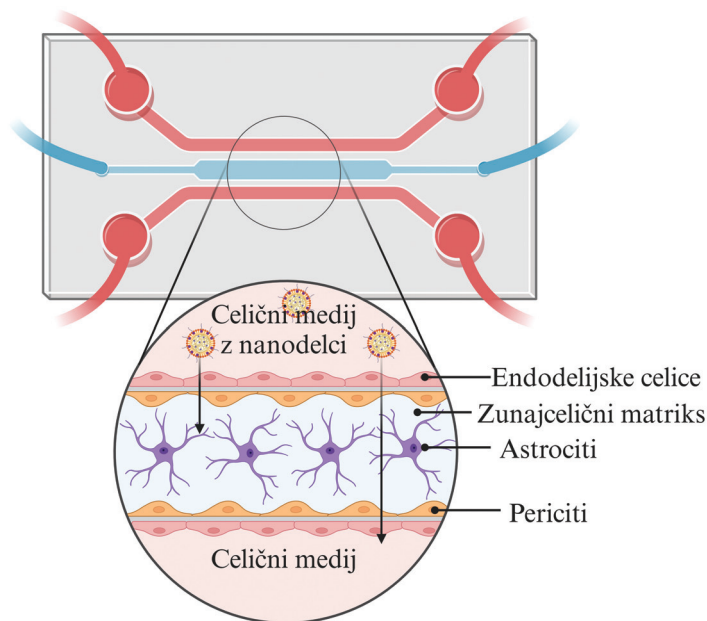
Organi na čipu omogočajo proučevanje obnašanja različnih nanodostavnih sistemov v organizmu *in vitro*. Z njimi lahko vrednotimo prodiranje nanodelcev skozi žilno steno v tumorje ali limfo (24), ali jih uporabimo za proučevanje sprememb prepustnosti tkiv zaradi vnetnih procesov (25). Poleg proučevanja vpliva velikosti nanodostavnih sistemov lahko z uporabo organov na čipu proučujemo tudi vpliv oblike nanodostavnih sistemov na prehajanje barrier. Primerjava prehajanja sferičnih in paličastih polistirenskih nanodelcev, obloženih z albuminom ali vezanimi protitelesi, preko možganskega in pljučnega epitelijskega na čipu je pokazala, da se paličasti nanodelci močneje pritrjujejo na možganski endotelij kot na pljučni endotelij v primerjavi z okroglimi nanodelci z enako naravo površine. To potrjuje, da je prilaganje oblike nanodelcev pomemben dejavnik za njihovo obnašanje v organizmu in omogoča tudi doseganje selektivnosti mesta vezave in prehajanja skozi žilno steno (26). Z organi na čipu lahko proučujemo tudi vlogo strižnih sil, ki jih simuliramo s pomočjo pretokov medija in oblike čipa, na permeabilnost žilnega endotelija. Samuel in sodelavci so na endoteliju na čipu proučevali endotelijski privzem kvantnih pik in nanodelcev silicijevega dioksida pri različnih strižnih silah. V statičnih pogojih niso zaznali prehajanja nanodelcev, medtem ko je bil privzem v endotelijske celice največji pri uporabi pretoka, ki je posnemal izpostavitve strižni sili 0,05 Pa, kar ustreza razmeram fiziološkega pretoka v venskem sistemu. S povečevanjem strižne sile se je privzem nanodelcev v celice zmanjševal do največje preizkušene strižne sile 0,5 Pa. To odpira možnosti za ciljano dostavo nanodostavnih sistemov v žile, kot so venule in vene, na katere delujejo manjše strižne sile, medtem ko se

izognemo ekstrasvazaciji nanodostavnih sistemov iz arterij in arteriol (27). Poleg strižnih sil lahko propustnost endotelija moduliramo tudi biokemično, npr. s pomočjo dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α). Kim in sodelavci so z uporabo različnih koncentracij TNF- α zasnovali model vnetja endotelija pri aterosklerozi, ki je imel povečano prepustnost za nanodelce na osnovi kopolimera mlečne in glikolne kisline z molekulami polietilenglikola vezanimi na površino (PEGilirane nanodelce), kar bi bilo potencialno uporabno za ciljanje vnetega tkiva (25).

Podobne poskuse kot na endoteliju na čipu lahko izvajamo tudi na krvno-možganski barieri na čipu (slika 2). Prvi model krvno-možganske barriere na čipu, ki je bil funkcionalen *in vitro* več kot 14 dni, je vzpostavil Park s sodelavci. Za izboljšanje diferenciacije celic krvno-možganske barriere na čipu so uporabili hipoksijo. Model *in vitro* je bil primerljiv s krvno-možgansko bariero *in vivo* z vidika zelo nizke permeabilnosti, ki so jo ovrednotili z meritvami transepiteljskega potenciala in permeabilnosti za fluorescentne označevalce. Preskusili so tudi permeabilnost modela za protitelesa ter kvantne pike, obložene s proteinom Angiopep-2, ki sodeluje pri prenosu molekul preko krvno-možganske barriere. Prepustnost modela za 20 nm kvantne pike je bila večja, če so bile le-te obložene s proteinom Angiopep-2, v primerjavi s kontrolnimi kvantnimi pikami, ki so bile obložene z drugim proteinom enake molekulske mase (28). Njihov model je nadgradila raziskovalna skupina Ahna s sodelavci, ki je namesto primarnih astrocitov in pericitov za vzpostavitev modela krvno-možganske barriere na čipu uporabila iPSC. Na modelu so preskusili permeabilnost za nanodelce, ki so oponašali lipoproteine visoke gostote (angl. *high density lipoprotein*, HDL) in so vsebovali apolipoprotein A1. Delež nanodelcev, ki so se naložili v možganskem predelu organa na čipu, je znašal 3 % aplicirane količine. S temi poskusi so ugotovili tudi mehanizem prehajanja nanodelcev skozi bariero in ga potrdili na živalskih modelih (29).

Organi na čipu omogočajo tudi vzpostavitev črevesa na čipu, ki izloča mukus in tako predstavlja boljši približek črevesne barriere *in vivo* v primerjavi s celicami v 2D-kulturah, ki jih gojimo v pogojih brez pretoka. Dodatno lahko v črevesu na čipu vzpostavimo ciklično raztezanje, ki oponaša peristaltiko. Celice celične linije karcinoma debelega črevesa Caco-2 se zaradi pretoka medija in cikličnega raztezanja organizirajo v polariziran visokoprizmatški epitelij, podoben črevesnemu epiteliju *in vivo*, medtem ko so v statičnih pogojih te celice sploščene in niso polarizirane. Ciklično raztezanje povečuje paracelularno permeabilnost črevesa na čipu, kar izboljša podobnost prepustnosti mo-





Slika 2: Shematski prikaz krvno-možganske bariere na čipu s dvema pretočnima kanaloma in statičnim srednjim kanalom, s celicami v zunajceličnem ogrodju. Slika je narejena s programom BioRender (<https://BioRender.com/y30c483>).

Figure 2: Schematic of a blood-brain barrier on a chip with two channels under flow and a static middle channel with cells in extracellular matrix. Created in BioRender (<https://BioRender.com/y30c483>).

dela s prepustnostjo črevesa *in vivo* (30). Lee in sodelavci so vzpostavili sistem črevesa na čipu na osnovi celic Caco-2, kot najpogosteje uporabljene celične linije za vrednotenje absorpcije zdravilnih učinkovin *in vitro*. Konfluenten monosloj celic so pred poskusi permeabilnosti prekrili s plastjo mucinov, ki je ostala pritrjena na celice tudi v pretočnih pogojih. Na modelu so proučevali adhezijo polimernih nanodelcev na osnovi metakrilne kisline in želatine ter nanodelcev na osnovi polietilenglikoldiakrilata. Nanodelci na osnovi metakrilne kisline in želatine so izkazovali mukoadhezijo, saj je ostalo več kot 50 % apliciranih nanodelcev pritrjenih na mukus pri pretoku medija 64 $\mu\text{L}/\text{h}$, medtem ko je večino nanodelcev na osnovi polietilenglikoldiakrilata pri enakem pretoku odplavilo (31).

Sistem črevesa na čipu lahko sklopimo tudi z jetri na čipu, kar omogoča vrednotenje toksikoloških lastnosti nanodostavnih sistemov po peroralni aplikaciji. Tak sistem so uporabili Esch in sodelavci, ki so za črevesje na čipu uporabili model na osnovi kokulture celic Caco-2 in celic z metotreksatom modificirane humane celične linije karcinoma debelega črevesa HT29-MTX, ki proizvajajo mukus. Črevo na čipu so sklopili z jetri na čipu na osnovi celične linije hepatocelicega karcinoma HepG2/C3A ter celoten sistem izpostavili 50 nm karboksiliranim polistirenskim nanodel-

cem. Delež absorpcije teh nanodelcev skozi črevesno bariero po 24 h kroženja medija je znašal ($9,5 \pm 2,9$) %, večina apliciranih nanodelcev pa se je naložila v mukusu na apikalni strani črevesa na čipu. Absorbirani polistirenski nanodelci so povzročili dvig koncentracij aspartat aminotransferaze (AST) v mediju, kar nakazuje na poškodbo jetrnih celic, ki so jo povzročili polistirenski nanodelci (32).

3.2 TUMORJI NA ČIPU

Zaradi kompleksnega zunajceličnega 3D-ogrodja, spremenjenega ožilja ter prisotnosti imunskih celic se obnašanje tumorjev *in vivo* razlikuje od obnašanja celic celičnih linij, ki jih gojimo v polistirenskih gojitvenih posodah. Tumorska rast in metastaziranje sta povezana z mehanskimi in biokemijskimi dejavniki mikrookolja, zato je ključno, da te specifične dejavnike posnemamo tudi v raziskavah *in vitro*. Za izboljšanje biorelevantnosti rezultatov je smiselna uporaba kombinacije 3D-kultur in različnih zunajceličnih ogrodij ter imunskih celic v pretočnem sistemu oziroma tumorjev na čipu (33). Z mikrofiziološkimi sistemi, ki bolje posnemajo tumorsko mikrookolje *in vivo*, za katerega je značilen povišan intersticijski tlak, visoka gostota celic ter spremenjena funkcija limfnih žil, se močno poveča tudi potencial za

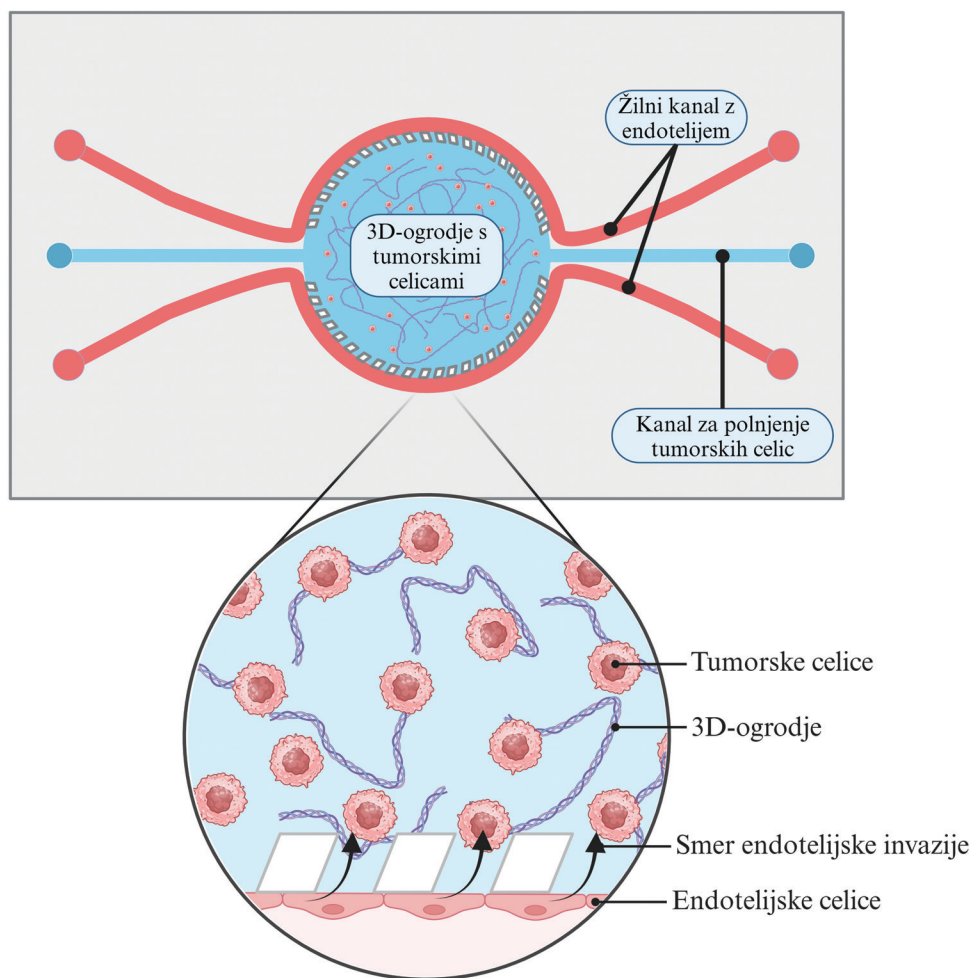
razvoj nanodostavnih sistemov za ciljano zdravljenje. Takšni modeli omogočajo proučevanje obnašanja nanodostavnih sistemov *in vitro* in napovedovanje njihovega obnašanja *in vivo*, kar lahko nadomesti dražje in zahtevnejše raziskave na živalskih modelih. Dodatni razlogi, ki potrjujejo potrebo po alternativni živalskim modelom rakavih bolezni, so tudi zahtevne metode prenosa rezultatov meritev iz živalskih modelov na ljudi, razlike med človeškim in živalskim zunajceličnim ogrodjem tumorjev ter slaba ponovljivost tumorskega mikrokolju v živalskih modelih. Za izboljšanje biorelevantnosti dobljenih rezultatov poteka razvoj različnih sistemov tumorjev na čipu, med drugim tumorskih celic v monosloju v pretočnem sistemu, pretočnih sistemov s tumorskimi celicami v 3D-ogrodju ter pretočnih sistemov s tumorskimi sferoidi, vključenimi v mikrokanale (24, 34). Sistemi tumorjev na čipu so najpogosteje sestavljeni iz celic določene celične linije, vgrajene v zunajcelično ogrodje, ki ga obdajajo kanali z endotelijskimi celicami mikrožilja. To omogoča proučevanje tumorske angiogeneze, transporta zdravilnih učinkovin in nanodostavnih sistemov skozi žilni endotelij in vrednotenje njihovega prodiranja v globino tumorja (19, 24, 35). Tak model so Kwak in sodelavci nadgradili z vključitvijo dodatnih limfnih žil ter vzpostavitev tlačnega gradienta od krvnega kanala, preko tumorja do limfnih žil za doseganje boljše biorelevantnosti dobljenih rezultatov in simulacije učinka EPR (24). Uporaba tlačnega gradienta in možnosti njegovega spreminjanja omogoča posnemanje intersticijske hipertenzije, ki je zaradi spremenejenega mikrožilja prisotna tudi v tumorjih *in vivo*. Njihov model tumorja na čipu vključuje celice celične linije raka dojke MCF-7 in mikrovaskularne endotelijske celice. V modelu so s fluorescenčno mikroskopijo spremljali prehajanje fluorescenčno označenih nanodelcev premerov 100 nm, 200 nm in 500 nm iz endotelijskega (žilnega) kanala v globino tumorja. Največji vpliv na ekstravazacijo in prodiranje nanodelcev v tumor je imela velikost nanodelcev, saj so 100 nm nanodelci prodirali hitreje in globlje v primerjavi z 200 nm nanodelci, medtem ko je bil obseg ekstravazacije 500 nm nanodelcev minimalen. Koncentracija kolagenskega gela, ki je posnemal zunajcelično ogrodje tumorja, na ekstravazacijo nanodelcev ni imela znatnega vpliva, medtem ko je prisotnost tumorskih celic v kolagenskem gelu neodvisno od koncentracije gela zmanjšala ekstravazacijo nanodelcev za več kot 80 %. Razlike v obsegu ekstravazacije nanodelcev so opazili tudi ob spreminjanju tlačnega gradienta med krvnim in limfnim kanalom, saj nanodelci žilnega kanala niso zapuščali, če je bil tlak v tumorju višji kot v žilnem kanalu, medtem ko je bila pri izenačenem tlaku ekstravazacija nanodelcev še prisotna (24).

Namesto posameznih tumorskih celic lahko v organe na čipu nasadimo tudi njihove skupke oziroma sferoide. Tako so Wang in sodelavci ustvarili model tumorja na čipu z žilnim kanalom z endotelijem, ki je s porozno membrano ločen od kanala s tumorskimi sferoidi (35). Vnetje v tumorskem mikrokolju *in vivo* so posnemali s povečanjem prepustnosti žilnega kanala z dodatkom TNF- α . Na modelu so vrednotili prodiranje PEGiliranih liposomov in PEGiliranih nanodelcev iz kopolimera mlečne in glikolne kisline. Prehajanje obeh vrst nanodostavnih sistemov je bilo v primerjavi s fluorescenčno označenim dekstranom velikosti 70 kDa veliko počasnejše. Ekstravazacija nanodelcev in njihovo prodiranje v tumor je bila minimalno zavrt v primeru modela s prisotnim zunajceličnim ogrodjem in modela z endotelijem, medtem ko je bila prepustnost modela, ki je vseboval tako zunajcelično ogrodje kot endotelij, zmanjšana za več kot 10-krat glede na statične pogoje in primerljiva s prepustnostjo v živalskem modelu (35). Poleg uporabe za splošno vrednotenje nanodostavnih sistemov tekom razvoja se pojavljajo platforme tumorjev na čipu kot orodje za uporabo v personalizirani medicini, saj omogočajo vrednotenje nanodostavnih sistemov pred samo aplikacijo določenemu bolniku. Pristop, ki temelji na odvzemu vzorca tumorja z biopsijo in gojenju primarnih tumorskih celic na čipu, omogoča preskušanje razpoložljivih terapij in optimizacijo terapije za posameznika. Takšen model so razvili Carvalho in sodelavci (19), pri čemer so za razvoj kolorektalnega tumorja na čipu uporabili celice kolorektalnega raka ter jih obdali s humanimi celicami mikrožilja debelega črevesa (slika 3). Vzpostavljen model je omogočal spremljanje invazije endotelijskih celic mikrožilja v jedro tumorja ter vrednotenje prodiranja fluorescentno označene učinkovine (gemcitabina) ter nanodelcev iz poliamidinoamina ter hitosana z gemcitabinom. Z vgrajevanjem zdravilne učinkovine v nanodelce so uspeli izboljšati prodiranje učinkovine v globino tumorja ter dosegli značilno večje zmanjšanje viabilnosti tumorskih celic v primerjavi z uporabo raztopine gemcitabina, ki je zelo slabo vodotopen (19).

4 IZZIVI PRI UPORABI ORGANOV NA ČIPU

Organi na čipu izkazujejo velik potencial za vrednotenje obnašanja nanodostavnih sistemov v nadzorovanem okolju, a ima njihova uporaba zaenkrat še določene omejitve. Prva izmed njih je odsotnost imunskega sistema, ki po-





Slika 3: Model tumorja na čipu, ki omogoča proučevanje invazije endotelijskih celic v tumor in ustvarjanje gradientov učinkovin, prirejeno po Carvalho in sodelavci (19). Slika je narejena s programom BioRender.

Figure 3: Tumor-on-a-chip model for the study of endothelial invasion into tumor tissue, which enables study of concentration gradients of anti-tumor drugs and nanoparticles. Adapted from Carvalho et al (19). Created in BioRender.

membrno vpliva na obnašanje nanodostavnih sistemov v organizmu in ga modeli *in vitro* še ne vključujejo. Zato se razvijajo modeli bezgavk na čipu, ki bodo omogočali vključitev imunskega sistema v model telesa na čipu z izboljšano napovedno vrednostjo za vrednotenje nanodostavnih sistemov (36, 37). Po drugi strani pa se z naraščajočo kompleksnostjo sistemov organov na čipu pojavlja tudi potreba po njihovi standardizaciji in validaciji. Za širšo uporabo organov na čipu je pomembna ponovljivost dobljenih rezultatov, ki izhaja iz uporabe standardiziranih in validiranih sistemov. Ponovljivost sistemov organov na čipu je odvisna predvsem od njihove kompleksnosti in se s povečevanjem števila elementov v sistemu slabša. Kljub temu je ponovljivi-

vost organov na čipu zaradi visoke organiziranosti in strukturiranosti okolja boljše od ponovljivosti organoidov in sferoidov, ki se v 3D-strukture organizirajo samodejno in zato bolj variabilno (7, 9).

Naslednji izziv je prenosljivost rezultatov iz raziskav z uporabo organov na čipu na ljudi. Število raziskav, ki primerjajo rezultate, pridobljene v raziskavah z organi na čipu, z rezultati kliničnih študij, je minimalno. Dobljene rezultate navadno primerjajo z rezultati, pridobljenimi na živalskih modelih, ki naj bi jih organi na čipu dopolnjevali in nadomestili (38). Za večjo napovedno vrednost mikrofizioloških sistemov bi bilo smiselno razviti modele 3D-žil na čipu, ki bi povezovali različne organe na čipu in tako posnemali si-

stemsko kroženje krvi. Nadaljnjo nadgradnjo organov na čipu bi predstavljala tudi vgradnja senzorjev neposredno v same organe na čipu, kar bi omogočilo spremljanje celičnih in molekularnih procesov v realnem času. Z napredkom tehnologije organov na čipu lahko pričakujemo tudi zmanjšanje uporabe živalskih modelov v predkliničnih študijah, kar je v skladu s pravilom 3R (zmanjšanje, izboljšanje in nadomestitev), ki sta ga že leta 1959 postavila Russel in Burch ter spodbuja racionalno zmanjšanje uporabe laboratorijskih živali v raziskavah in razvoju (39).

5 SKLEP

Organi na čipu so obetavna tehnologija, ki predstavlja nadgradnjo klasičnih celičnih kultur. Njihov razvoj poteka predvsem v smeri postavljanja kompleksnih modelov bolezni za odkrivanje novih zdravilnih učinkovin, a se njihova uporaba širi tudi na proučevanje vrednotenja nanodostavnih sistemov, kjer so v ospredju modeli organov na čipu za proučevanje interakcij nanodelcev s tumorskim mikrookoljem in modeli za proučevanje permeabilnosti nanodelcev skozi biološke bariere. Z napredkom tehnologije organov na čipu lahko v bližnji prihodnosti pričakujemo tudi pospešeno predklinično testiranje novih (nano)zdravil.

6 IZJAVA

Delo je nastalo v okviru raziskovalnih programov P1-0189, P1-0420 in P3-0067, ki jih sofinancira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije.

7 LITERATURA

1. Thapa RK, Kim JO. Nanomedicine-based commercial formulations: current developments and future prospects. *J Pharm Investig.* 2023;53(1):19–33.
2. Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology [Internet]. FDA; 2019 [citirano 9. maj 2024]. Dostopno na: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology>
3. Perrie Y. *Pharmaceutical nanotechnology and nanomedicines. V: Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines.* 5. izd. Elsevier; 2018. str. 784–803.
4. Wolfram J, Zhu M, Yang Y, Shen J, Gentile E, Paolino D, idr. Safety of nanoparticles in medicine. *Curr Drug Targets.* 2015;16(14):1671–81.
5. Dorđević S, Gonzalez MM, Conejos-Sánchez I, Carreira B, Pozzi S, Acúrcio RC, idr. Current hurdles to the translation of nanomedicines from bench to the clinic. *Drug Deliv and Transl Res.* 2022;12(3):500–25.
6. Ali M. What function of nanoparticles is the primary factor for their hyper-toxicity? *Advances in Colloid and Interface Science.* 2023;314:102881.
7. Leung CM, de Haan P, Ronaldson-Bouchard K, Kim GA, Ko J, Rho HS, idr. A guide to the organ-on-a-chip. *Nat Rev Methods Primers.* 2022;2(1):1–29.
8. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science.* 2010;328(5986):1662–8.
9. Low LA, Mummery C, Berridge BR, Austin CP, Tagle DA. Organs-on-chips: into the next decade. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(5):345–61.
10. Miller PG, Shuler ML. Design and demonstration of a pumpless 14 compartment microphysiological system. *Biotechnology and Bioengineering.* 2016;113(10):2213–27.
11. Beaurivage C, Kanapeckaitė A, Loomans C, Erdmann KS, Stallen J, Janssen RAJ. Development of a human primary gut-on-a-chip to model inflammatory processes. *Sci Rep.* 2020;10(1):21475.
12. Low LA, Sutherland M, Lumelsky N, Selimovic S, Lundberg MS, Tagle DA. *Organs-on-a-Chip. V: Oliveira JM, Reis RL, uredniki. Biomaterials- and Microfluidics-Based Tissue Engineered 3D Models [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [citirano 5. februar 2024]. str. 27–42. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Dostopno na: https://doi.org/10.1007/978-3-030-36588-2_3*
13. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, idr. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology.* 2017;32(4):266–77.
14. Hayden PJ. Chapter 2 - Cell sources and methods for producing organotypic in vitro human tissue models. V: Hoeng J, Bovard D, Peitsch MC, uredniki. *Organ-on-a-chip [Internet]. Academic Press; 2020 [citirano 8. december 2023]. str. 13–45. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128172025000024>*
15. Kasendra M, Tovaglieri A, Sontheimer-Phelps A, Jalili-Firoozinezhad S, Bein A, Chalkiadaki A, idr. Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci Rep.* 2018;8(1):2871.
16. Palasantzas VEJM, Tamargo-Rubio I, Le K, Slager J, Wijmenga C, Jonkers IH, idr. iPSC-derived organ-on-a-chip models for personalized human genetics and pharmacogenomics studies. *Trends in Genetics.* 2023;39(4):268–84.
17. Schneider MR, Oelgeschlaeger M, Burgdorf T, van Meer P, Theunissen P, Kienhuis AS, idr. Applicability of organ-on-chip systems in toxicology and pharmacology. *Critical Reviews in Toxicology.* 2021;51(6):540–54.
18. Abulati M, Yalikun Y, Murata K, Sato A, Sami MM, Sasaki Y, idr. Establishment of a heart-on-a-chip microdevice based on



- human iPS cells for the evaluation of human heart tissue function. *Sci Rep.* 2020;10(1):19201.
19. Carvalho MR, Barata D, Teixeira LM, Giselbrecht S, Reis RL, Oliveira JM, idr. Colorectal tumor-on-a-chip model for predictive studies of precision onco-nanomedicine. *Science Advances.* 2019;5(5):eaaw1317.
 20. Chramiec A, Teles D, Yeager K, Marturano-Kruik A, Pak J, Chen T, idr. Integrated human organ-on-a-chip model for predictive studies of anti-tumor drug efficacy and cardiac safety. *Lab Chip.* 2020;20(23):4357–72.
 21. Ingber DE. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat Rev Genet.* 2022;23(8):467–91.
 22. Keuper-Navis M, Walles M, Poller B, Myszczyzyn A, Van Der Made TK, Donkers J, idr. The application of organ-on-chip models for the prediction of human pharmacokinetic profiles during drug development. *Pharmacological Research.* 2023;106853.
 23. Ashammakhi N, Darabi MA, Çelebi-Saltik B, Tutar R, Hartel MC, Lee J, idr. Microphysiological Systems: Next Generation Systems for Assessing Toxicity and Therapeutic Effects of Nanomaterials. *Small Methods.* 2020;4(1):1900589.
 24. Kwak B, Ozcelikkale A, Shin CS, Park K, Han B. Simulation of complex transport of nanoparticles around a tumor using tumor-microenvironment-on-chip. *Journal of Controlled Release.* 2014;194:157–67.
 25. Kim Y, Lobatto ME, Kawahara T, Lee Chung B, Mieszawska AJ, Sanchez-Gaytan BL, idr. Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014;111(3):1078–83.
 26. Kolhar P, Anselmo AC, Gupta V, Pant K, Prabhakarandian B, Ruoslahti E, idr. Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(26):10753–8.
 27. Samuel SP, Jain N, O'Dowd F, Paul T, Kashanin D, Gerard VA, idr. Multifactorial determinants that govern nanoparticle uptake by human endothelial cells under flow. *IJN.* 2012;7:2943–56.
 28. Park TE, Mustafaoglu N, Herland A, Hasselkus R, Mannix R, FitzGerald EA, idr. Hypoxia-enhanced Blood-Brain Barrier Chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies. *Nat Commun.* 2019;10(1):2621.
 29. Ahn SI, Sei YJ, Park HJ, Kim J, Ryu Y, Choi JJ, idr. Microengineered human blood–brain barrier platform for understanding nanoparticle transport mechanisms. *Nat Commun.* 2020;11(1):175.
 30. Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip.* 2012;12(12):2165.
 31. Lee SY, Lee Y, Choi N, Kim HN, Kim B, Sung JH. Development of Gut-Mucus Chip for Intestinal Absorption Study. *BioChip J.* 2023;17(2):230–43.
 32. B. Esch M, J. Mahler G, Stokol T, L. Shuler M. Body-on-a-chip simulation with gastrointestinal tract and liver tissues suggests that ingested nanoparticles have the potential to cause liver injury. *Lab on a Chip.* 2014;14(16):3081–92.
 33. Liu X, Fang J, Huang S, Wu X, Xie X, Wang J, idr. Tumor-on-a-chip: from bioinspired design to biomedical application. *Microsyst Nanoeng.* 2021;7(1):1–23.
 34. Albanese A, Lam AK, Sykes EA, Rocheleau JV, Chan WCW. Tumour-on-a-chip provides an optical window into nanoparticle tissue transport. *Nat Commun.* 2013;4(1):2718.
 35. Wang HF, Ran R, Liu Y, Hui Y, Zeng B, Chen D, idr. Tumor Vasculature-on-a-Chip for Investigating Nanoparticle Extravasation and Tumor Accumulation. *ACS Nano.* 2018;12(11):11600–9.
 36. Shanti A, Samara B, Abdullah A, Hallfors N, Accoto D, Sapudom J, idr. Multi-Compartment 3D-Cultured Organ-on-a-Chip: Towards a Biomimetic Lymph Node for Drug Development. *Pharmaceutics.* 2020;12(5):464.
 37. Goyal G, Prabhala P, Mahajan G, Bausk B, Gilboa T, Xie L, idr. Ectopic Lymphoid Follicle Formation and Human Seasonal Influenza Vaccination Responses Recapitulated in an Organ-on-a-Chip. *Advanced Science.* 2022;9(14):2103241.
 38. Kang S, Park SE, Huh DD. Organ-on-a-chip technology for nanoparticle research. *Nano Convergence.* 2021;8(1):20.
 39. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique.* London: Methuen; 1959.