



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00521

(22) Data de depozit: 26.08.2022

(41) Data publicării cererii:  
28.02.2024 BOPI nr. 2/2024

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,  
ȘOS.PANDURI NR.90, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• HUDIȚĂ ARIANA, STR.OLTEȚ, NR.25,  
BRAȘOV, BV, RO;  
• GĂLĂȚEANU BIANCA, ȘOS. OLTEȚII  
NR. 48, BL. 7A, SC. 3, ET. 6, AP. 94,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• GINGHINĂ OCTAV, STR.VASILE LASCĂR,  
NR. 100, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **MODEL DE CUANTIFICARE A CAPACITĂȚII  
NANOSISTEMELOR ÎNCĂRCATE CU AGENȚI  
ANTITUMORALI DE A PENETRA BARIERA ENDOTELIALĂ  
PENTRU LIVRAREA MEDICAMENTELOR ÎNCAPSULATE  
CELULELOR TUMORALE DE ADENOCARCINOM  
COLORECTAL**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui model de cuantificare a capacității nanosistemelor încărcate cu agenți anti tumorali de a penetra bariera endotelială pentru a livra medicamentul celulelor tumorale după administrare. Metoda, conform invenției, constă în etapele: cultivare a celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal HT-29 și a celulelor endoteliale HUVEC în sisteme de cultură 3D de tip organ-on-a-chip simple sau complexe, cu barieră endotelială prezentă, expunerea la tratamentul cu nanosisteme polimerice cuplate cu fluoresceină încărcate cu 5-fluorouracil, screening-ul

sistemelor de tip drug-delivery prin citometrie în flux, și cuantificarea internalizării diferențiale a nanosistemelor polimerice marcate de către celulele tumorale, după administrarea acestora în sisteme de cultură 3D în prezența sau absența unei bariere endoteliale, astfel fiind posibilă ajustarea cu precizie a dozei de administrare a nanosistemelor cu încărcătură antitumorală pentru obținerea unui efect antitumoral eficient.

Revendicări: 4  
Figuri: 3



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. ....	a 2022 521
Data depozit ..... 26-08-2022	

RO 137981 A2

66

**MODEL DE CUANTIFICARE A CAPACITĂȚII NANOSISTEMELOR ÎNCĂRCATE CU AGENȚI ANTITUMORALI DE A PENETRA BARIERA ENDOTELIALĂ PENTRU LIVRAREA MEDICAMENTELOR ÎNCAPSULATE CELULELOR TUMORALE DE ADENOCARCINOM COLORECTAL**

Invenția se referă la dezvoltarea *unui model de cuantificare a capacității nanosistemelor încărcate cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială și livra încărcătura medicamentoasă celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal după administrare*. Conform invenției, modelul de cuantificare se bazează pe calcularea diferenței de nanosisteme internalizate de către celulele tumorale de adenocarcinom colorectal aparținând liniei celulare HT-29 după administrarea acestora în sisteme de cultură 3D moderne de tip *organ-on-a-chip*, în absența sau prezența unei bariere endoteliale. Astfel, modelul propus în cadrul prezentei cereri de brevet constă în generarea unor platforme de screening al sistemelor *drug-delivery* marcate fluorescent bazate pe cultivarea celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal HT-29 și celulelor endoteliale HUVEC în sisteme de tip *organ-on-a-chip* simple (prezintă doar celulele tumorale colorectale cultivate în matricea extracelulară) sau complexe (prezintă celulele endoteliale cultivate pe o matrice extracelulară pentru formarea barierei endoteliale, matrice extracelulară în care sunt încapsulate celulele HT-29).

Concret, după cultivarea celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal HT-29 în sisteme de tip *organ-on-a-chip* simple sau de tip *organ-on-a-chip* cu bariera endotelială prezentă și expunerea acestora la tratamentul cu nanosisteme marcate fluorescent într-o manieră dinamică, cu ajutorul citometriei în flux, poate fi determinată cantitatea de nanosisteme internalizate de către celulele tumorale de adenocarcinom colorectal în ambele tipuri de cultură 3D. În cazul modelului particular prezentat în această cerere de brevet pentru validarea metodei, au fost utilizate nanosisteme polimerice cuplate cu fluoresceină încărcate cu 5-fluororacil, prin citometrie în flux fiind cuantificată internalizarea acestora de către celulele HT-29 în ambele modele de cultură 3D *in vitro*. Pe baza internalizării diferențiate a nanosistemelor polimerice marcate cu fluoresceină de către celulele tumorale HT-29 în absența sau prezența barierei endoteliale se poate astfel cuantifica capacitatea nanosistemelor polimerice de a penetra bariera endotelială. Modelul prezentat permite astfel ajustarea precisă a dozei de administrare a nanosistemelor pentru a se obține un efect antitumoral eficient ținând cont de capacitatea acestora de a penetra bariera endotelială și a ajunge la celulele de interes și totodată permite optimizarea parametrilor fizico-chimici a nanosistemelor

sintetizate (ex. dimensiunea) pentru a îmbunătăți performanța acestora în a penetra bariera endotelială.

## 1. INTRODUCERE

La nivel global, cancerul colorectal este unul din cel mai prevalente tipuri de cancer, fiind al doilea tip de cancer care cauzează decesul din totalitatea patologiilor oncologice [1,2]. În momentul de față, diferite abordări terapeutice sunt implementate în clinică pentru managementul cancerului colorectal: rezecția chirurgicală [3,4], radioterapia [5], chimioterapia [6,7], terapia țintită [8], însă opțiunile terapeutice existente sunt limitate de stadiul în care se află pacienții la momentul diagnosticului, pacienții în stadii avansate prezentând ca opțiune exclusivă chimioterapia. În cancerul colorectal, chimioterapia se bazează pe administrarea de 5-fluororacil (5FU), oxaliplatin (OXP), irinotecan (IRI) sau combinații ale acestora, însă aceste tratamente prezintă multiple dezavantaje precum biodisponibilitate slabă, lipsa specificității și susceptibilitatea de a dezvolta rezistență la terapie, care conduc la efecte adverse severe și de cele mai multe ori la abandonarea tratamentului [9]. În acest context, una din strategiile moderne propuse pentru a adresa aceste limitări ale terapiei convenționale în cancerul colorectal este de a utiliza nanosisteme care să încapsuleze acești agenți citotoxici și care să livreze încărcătura medicamentoasă țintit către celulele tumorale. Printre potențialele avantaje identificate pentru implementarea nanomedicinii în tratamentul cancerului colorectal se numără și potențialul nanosistemelor de a îmbunătăți stabilitatea și solubilitatea medicamentelor încapsulate și de a le proteja în circulație după administrare, aspecte care determină o creștere a concentrației de medicament care ajunge la țesutul tumoral și astfel o creștere a siguranței și eficienței tratamentului [10,11].

Cu toate acestea, deși sunt continuu sintetizate nanosisteme destinate terapiei cancerului colorectal (lipozomi, nanoparticule polimerice, dendrimeri, nanoparticule anorganice etc.), cu țintire pasivă sau cuplate cu diferite molecule pentru țintire activă, există numeroase limitări ale modelelor preclinice utilizate pentru screening-ul eficienței și siguranței acestor noi sisteme *drug-delivery* [9]. Cele mai multe studii sunt concentrate pe evaluarea *in vitro* a nanosistemelor în culturi celulare 2D, în care toate celulele sunt expuse tratamentelor administrate, model *in vitro* care nu mimează arhitectura 3D complexă a tumorilor *in vivo* și alte particularități ale tumorilor solide (prezența celulelor hipoxice și latente, prezența unor bariere biologice în circulația către celulele tumorale, interacția cu alte tipuri celulare și cu matricea celulară care influențează biologia celulelor tumorale etc.) [12,13]. O parte din aceste dezavantaje au fost adresate prin introducerea utilizării în studiile

*in vitro* a modelelor celulare 3D precum sferoizii multicelulari tumorali [14,15], însă aceste modele erau în continuare statice în ceea ce privește modul de expunere al celulelor tumorale la tratament. Recent, noi sisteme de cultură cunoscute ca sisteme *organ-on-a-chip* au fost identificate ca instrumente cheie pentru screening-ul eficienței antitumorale a nanosistemelor încărcate cu medicamente. Tehnologia *organ-on-a-chip* este capabilă să recapituleze micromediul tumoral și interacția celulelor tumorale cu alte tipuri celulare, datorită unităților funcționale microfiziologice create prin tehnologia microfluidică. Astfel, prin platformele *organ-on-a-chip* poate fi mimată anatomofiziologia unei tumori și forțele mecanice la care celulele tumorale sunt expuse în organismul uman, tratamentele fiind furnizate celulelor tumorale într-o manieră dinamică [16–19]. Un aspect foarte important în implementarea tehnologiei *organ-on-a-chip* în studiile de screening al nanosistemelor este capacitatea acestora de a putea cultiva celulele tumorale în prezența unei bariere endoteliale [20]. Pentru a ajunge la celulele tumorale și a livra eficient încărcătura medicamentoasă, nanosistemele sintetizate trebuie să penetreze monostratul endotelial care căptușește vasele organului. Monostratul endotelial prezintă o barieră reală pentru transportul nanoparticulelor deoarece deschiderile joncțiunilor inter-endoteliale (golurile dintre celulele endoteliale contigue) au o dimensiune medie de 3 nm [21].

În literatură au fost identificate diferite brevete de invenție care vizează utilizarea tehnologiei microfluidice pentru simularea barierei endoteliale, însă în general acestea sunt destinate simulării *in vitro* a barierei hematoencefalice, sau fabricarea unor sisteme microfluidice *in house* pentru utilizarea lor ca platforme de screening:

**Brevetul AU2016341880B2** se referă la cultivarea celulelor endoteliale ale creierului și, opțional, astrocitelor și neuronilor într-un dispozitiv fluidic în condiții în care celulele imită structura și funcția barierei hematoencefalice. Cultura unor astfel de celule într-un dispozitiv microfluidic, fie singură, fie în combinație cu alte celule, conduce maturarea și/sau diferențierea mai departe decât sistemele existente.

**Brevetul WO2017035119A1** prezintă dezvoltarea unui model al barierei hematoencefalice ce constă din celulele cheie ale BBB - și anume, neuroni, astrocite și celule endoteliale care permite recapitularea BBB *in vivo* identificarea rolului fiecărui tip de celulă individual. Un sistem microfluidic pentru modelarea barierei hematoencefalice cuprinde un substrat transparent optic, substratul cuprinzând: (i) cel puțin un canal de fluid; (ii) un prim canal de gel cuprinzând o primă regiune de gel; (iii) un al doilea canal de gel cuprinzând o a doua regiune de gel; și (iv) cel puțin un rând de posturi.

**Brevetul** KR101644635B1 se referă la un cip microfluidic pentru angiogeneză. Cipul microfluidic al prezentei invenții este compus dintr-un prim canal, un al doilea canal, un al treilea canal, un al patrulea canal și un al cincilea canal dispuse unul lângă celălalt într-o ordine secvențială pe un substrat și fiecare canal este în contact cu un canal adiacent. Două sau mai multe microstructuri sau microstapți cu un spațiu între ele sunt dispuse pe suprafața limită de formare. Fiecare canal interacționează fluid cu celălalt canal prin interstițiile formate de microstructuri și substanțele biochimice pot migra. Cipul microfluidic conform prezentei invenții asigură un microvas cu o interfață vasculară netedă și continuă *in vitro*. În plus, cipul microfluidic al prezentei invenții poate fi utilizat pentru a modela angiogeneza cancerului, afluxul intracavitar și infiltrarea extracelulară. În plus, cipul microfluidic al prezentei invenții poate fi utilizat pentru screeningul substanțelor candidate la medicamente anticancer.

**Brevetul** RU2612904C1 prezintă sinteza unui cip microfluidic care include canale microfluidice cu supape pentru a suprapune canalele, un compartiment pentru cultivare, o cameră de lucru cu o membrană și un mijloc de a crea o presiune constantă în circuitul închis. În acest caz, membrana este adaptată pentru a modifica volumul camerei de lucru. Camera de lucru, supapele și intrarea în compartiment sunt conectate prin canale microfluidice pentru a forma o buclă închisă de circulație a mediului nutritiv. Camera de lucru cu supape și canale microfluidice este o pompă de direcționare. Metoda cuprinde umplerea canalelor microfluidice și a compartimentului cu mediu nutritiv, inserarea celulelor sau a unui model celular în compartimentul de cultură. În acest caz, în circuit sunt create presiunea constantă și fluxul pulsatoriu al mediului nutritiv. Acest model permite posibilitatea modelării microcirculației componente hidrodinamice *in vivo* într-un microfluidic, precum și simularea răspunsului sistemic al organismului.

În concluzie, se poate afirma faptul că brevetele care propun utilizarea tehnologiei *organ-on-a-chip* ca modele preclinice *in vitro* sunt axate fie pe designul și sinteza unor noi cipuri microfluidice care elimină utilizarea unor platforme existente comercial sau utilizarea tehnologiilor existente pentru alte aplicații (bariera hematoencefalică). În acest sens se remarcă lipsa posibilității de cuantificare a capacității nanosistemelor încărcate cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială și livra încărcătura medicamentoasă celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal după administrare.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui model care servește la determinarea capacității nanosistemelor încărcate cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială și livra încărcătura medicamentoasă

**celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal după administrare.** Conform invenției, modelul de cuantificare se bazează pe calcularea diferenței de nanosisteme internalizate de către celulele tumorale de adenocarcinom colorectal aparținând liniei celulare HT-29 după administrarea acestora în sisteme de cultură 3D moderne de tip *organ-on-a-chip*, în absența sau prezența unei bariere endoteliale. Astfel, modelul propus în cadrul prezentei cereri de brevet consta în generarea unor platforme de screening al sistemelor *drug-delivery* marcate fluorescent bazate pe cultivarea celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal HT-29 și celulelor endoteliale HUVEC în sisteme de tip *organ-on-a-chip* simple (prezintă doar celulele tumorale colorectale cultivate în matricea extracelulară) sau complexe (prezintă celulele endoteliale cultivate pe o matrice extracelulară pentru formarea barierei endoteliale, matrice extracelulară în care sunt încapsulate celulele HT-29). Modelul prezentat permite astfel ajustarea precisă a dozei de administrare a nanosistemelor pentru a se obține un efect antitumoral eficient ținând cont de capacitatea acestora de a penetra bariera endotelială și a ajunge la celulele de interes și totodată permite optimizarea parametrilor fizico-chimici a nanosistemelor sintetizate (ex. dimensiunea) pentru a îmbunătăți performanța acestora în a penetra bariera endotelială.

**Concluzionând datele din literatură prezentate mai sus, propunerea de brevet se referă la obținerea unui model care servește la determinarea capacității nanosistemelor încărcate cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială și livra încărcătura medicamentoasă celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal după administrare. Modelul propus poate fi utilizat ca și platformă de cuantificare a capacității oricărui nanosistem încărcat cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială și livra încărcătura medicamentoasă celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal după administrare, singurul aspect necesar pentru utilizarea acestui model fiind marcarea nanosistemului testat cu un fluorocrom pentru a putea fi investigat prin citometrie în flux (tehnică cantitativă).**

În continuare vor fi descrise materialele utilizate în studiul experimental cât și metodele necesare pentru obținerea și testarea materialelor descrise în cererea de brevet.

## **2. MATERIALE ȘI METODE**

### **2.1. MODELELE DE CULTURĂ 3D DE TIP *ORGAN-ON-A-CHIP***

Pentru a genera modelele de cultură 3D biomimetice de tip *organ-on-a-chip* s-au utilizat 2 linii celulare: i) *linia celulară de adenocarcinom colorectal uman* HT-29 (ATCC – American Type Culture Collection), linie celulară tumorală umană derivată din

adenocarcinom colorectal cu morfologie tipic epitelială; această linie celulară este utilizată ca linie de referință în studiile de cercetare care vizează patologia oncologică colorectală, datorită sensibilității acesteia crescute la agenții chimioterapeutici clasici utilizați în schema de tratament (5-fluorouracil, oxaliplatin, irinotecan) și ii) *linia celulară de celule endoteliale umane HUVEC* (ATCC – American Type Culture Collection), linie celulară de celule endoteliale izolată din vena cordonului ombilical. Ambele linii celulare au fost manipulate doar în camera curată, echipată cu echipamentele specifice necesare: hotă cu flux laminar clasă de securitate II, incubator cu CO<sub>2</sub>, centrifugă cu rotor swing-out, baie de apă, microscop optice inversate etc. Celulele au fost cultivate pe tot parcursul experimentelor în condiții standard de cultură (incubare la 37°C, într-o atmosferă umedă de 5% CO<sub>2</sub>) și menținute în mediile de cultură recomandate de ATCC: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), preparat prin suplimentarea unui flacon de DMEM low glucose cu 3,5 g de glucoză și 1,5 g carbonat acid de sodiu pentru linia celulară HT-29 și mediu F-12K suplimentat cu 0.1 mg/mL heparină și 500 μL de 30 mg/mL Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) pentru linia celulară HUVEC. Ambele medii de cultură au fost suplimentate cu 10% ser fetal bovin (SFB) și 1% antibiotic antimicotic (ABAM) pentru obținerea mediilor de cultură complete, care au fost în continuare utilizate în toate experimentele.

Pentru decongelarea celulelor din colecția de celule existentă în laborator, criotuburile cu celule de interes au fost scoase din spațiul dedicat stocării pe termen lung și plasate pe baia de apă preîncălzită la 37°C, până la observarea decongelării totale a conținutului aflat în criule. După decongelarea completă, acestea au fost șterse cu etanol 70% pentru a elimina posibilitatea contaminării conținutului și conținutul acestora au fost pipetate în condiții aseptice în tuburi sterile de 15 mL în care în prealabil au fost pipetați 5 mL de mediu de cultură complet preîncălzit dedicat tipului celular de interes. Tuburile au fost centrifugate timp de 5 minute/1500 rpm, iar sedimentele celulare obținute după îndepărtarea supernatantelor, au fost resuspendate în mediile de cultură complet corespunzătoare și transferate în vase de cultură sterile cu suprafața de 25 cm<sup>2</sup>, în care în prealabil au fost pipetați câte 3 mL/flask mediu de cultură complet. În continuare, celulele au fost incubate peste noapte în condiții standard de cultură, iar după 24 de ore de la inițierea culturilor, celulele au fost inspectate la microscopul optic inversat pentru a confirma adeziunea celulelor la suprafața de cultură și lipsa contaminărilor. După validarea culturilor de HT-29 și HUVEC, mediul de creștere a fost reîmprospătat. Pe tot parcursul menținerii celor 2 linii celulare în cultură, mediul de creștere a fost schimbat din 2 în 2 zile, pentru a furniza celulelor nutrienți

proaspeți și a menține culturile viabile. Reîmprospătarea mediului de cultură s-a realizat prin aspirarea mediului existent de pe monostraturile celulare și înlocuirea acestuia cu un volum corespunzător de mediu de cultură complet proaspăt, ajustat în funcție de suprafața de cultură a recipientului (4 mL pentru vasele de cultură cu suprafața de 25 cm<sup>2</sup> și 8 mL pentru vasele de cultură cu suprafața de 75 cm<sup>2</sup>).

Pentru menținerea culturilor celulare în creștere exponențială și a elimina posibilitatea ca celulele să ajungă la confluență și ca urmare să manifeste fenomenul de inhibiție de contact care determină activarea cascadei apoptotice, culturile celulare au fost propagate prin pasaj celular care implică distribuirea celulelor în noi recipiente de cultură. Pentru propagarea culturilor celulare aderente s-a utilizat tratamentul enzimatico-chimic cu tripsină/EDTA, tratament care determină întreruperea conexiunilor intercelulare și conexiunilor celulă – matrice extracelulară facilitând desprinderea de pe suprafața recipientului de cultură datorită capacității enzimei proteolitice tripsină de a acționa asupra proteinelor matricei extracelulare și a EDTA de a acționa ca un chelator de ioni, cu impact asupra caderinelor și selectinelor. Pentru disocierea enzimatico-chimică a celulelor de pe suprafața de cultură, mediul de cultură existent a fost îndepărtat, iar monostraturile celulare au fost spălate cu PBS cald pentru îndepărtarea totală a SFB de la nivelul culturi care poate inhiba acțiunea enzimatică a tripsinei.

După spălare, a fost adăugat un volum corespunzător de soluție de 0.25% tripsină și 0.53 mM EDTA în PBS preîncălzită pe baia de apă, volumul fiind ajustat în funcție de suprafața totală de cultivare (2 mL pentru vasele de cultură cu suprafața de 25 cm<sup>2</sup> și 3 mL pentru vasele de cultură cu suprafața de 75 cm<sup>2</sup>), iar soluția a fost lăsată să acționeze timp de 3 – 5 minute, la 37°C. După confirmarea desprinderii celulelor de pe suprafața de cultură cu ajutorul microscopului optic, s-a adăugat un volum dublu de mediu de cultură complet raportat la volumul de tripsină – EDTA adăugat, pentru inactivarea tripsinei de către SFB ce conține inhibitori proteazici. După centrifugare timp de 5 minute, la 1500 rpm și îndepărtarea supernatantului, sedimentul celular astfel obținut s-a resuspendat în mediu de cultură complet, iar suspensia celulară astfel obținută s-a distribuit în recipiente de cultură sterile noi, în care în prealabil s-a adăugat un volum corespunzător de mediu de cultură complet; În cazul în care densitatea de însămânțare inițială trebuie calculată, numărul total de celule din suspensia celulară va fi cuantificat prin numărare cu ajutorul unei camere de numărare Burker – Turk.

Pentru cultivarea celulelor HT-29 în sisteme de tip *organ-on-a-chip* simple și sisteme de tip *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială, s-au utilizat sisteme comerciale *organ-on-a-*



*chip* Mimetas: 2-lane și 3-lane. Sistemul *organ-on-a-chip* simplu (2-lane) prezintă 96 cipuri de cultură independente cu 2 canale adiacente /cip, în timp ce sistemul *organ-on-a-chip* 3-lane prezintă 40 de cipuri de cultură independente cu 3 canale adiacente/cip.

Fiecare cip al sistemului *organ-on-a-chip* 2-lane conține un canal de cultură în gel (canal în care au fost cultivate celule de adenocarcinom colorectal HT-29 în matrice extracelulară de tip Matrigel) și un canal de perfuzie (canal în care a fost perfuzat tratamentul cu nanosisteme polimerice – FITC). Fiecare cip al sistemului *organ-on-a-chip* 3-lane conține un canal de cultură în gel (canal în care au fost cultivate celule de adenocarcinom colorectal HT-29 în matrice extracelulară de tip Matrigel) și două canale de perfuzie (unul din canale a fost utilizat atât pentru cultivarea celulelor HUVEC în vederea generării barierei endoteliale, cât și pentru perfuzarea tratamentului cu nanosisteme polimerice – FITC).

Pentru cultivarea celulelor HT-29 în sisteme *organ-on-a-chip* au fost utilizate diferite densități inițiale de însămânțare, cât și 2 tipuri de matrice extracelulară (Matrigel/Colagen I) pentru optimizarea protocolului optimizat de cultură, prezentat în continuare. Parametrii experimentali optimi (densitate inițială de însămânțare/tip de matrice extracelulară) au fost selectați pe baza unor teste inițiale de viabilitate și morfologie celulară, fiind aleasă densitatea de însămânțare inițială și tipul de matrice extracelulară care determină obținerea celei mai viabile culturi HT-29 în timp.

Pentru obținerea sistemelor de tip *organ-on-a-chip* simple, celulele HT-29 au fost însămânțate după următorul protocol direct în gel:

- Celulele HT-29 au fost desprinse de pe suprafața de cultură și numărate cu ajutorul unui hemocitometru; densitatea inițială de însămânțare a fost de  $3 \times 10^4$  celule/cip.
- Placa OrganoPlate 2-lane care conține cele 96 de cipuri *organ-on-a-chip* a fost manipulată în condiții aseptice după desigilare;
- În toate ferestrele de observare de la nivelul fiecărui cip (Fig.1A) au fost pipetați 50  $\mu$ L de PBS;
- S-a pregătit pe gheață Matrigel prin diluarea matricei extracelulare stoc la o concentrație finală de mediu de cultură 9 mg/mL; s-au pregătit 2  $\mu$ L \* 96 cipuri + 40% extra;
- Suspensia celulară pentru însămânțare a fost centrifugată timp de 5 min/1500 rpm și resuspendată în matricea extracelulară pregătită;
- Suspensia celulară în gel a fost pipetată în orificiile pentru gel (Fig. 1A), la nivelul fiecărui cip fiind pipetați câte 2  $\mu$ L;

- După umplerea tuturor celor 96 de cipuri, placa a fost incubată timp de 15 min în condiții standard de cultură pentru a permite polimerizarea gelului;
- După polimerizare, s-au pipetat câte 50  $\mu\text{L}$  în toate orificiile pentru mediu (inlet și outlet) (Fig. 1A).
- Placa OrganoPlate a fost incubată în condiții standard de cultură, pe agitatorul de plăci special Mimetas OrganoFlow (unghi  $70^\circ$ / interval 8 minute), până la tratament;

Pentru obținerea sistemelor de tip *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială, celulele HUVEC au fost însămânțate în compartimentul pentru perfuzarea mediului, iar celulele HT-29 au fost însămânțate după următorul protocol direct în gel:

- Celulele HT-29 și HUVEC au fost desprinse de pe suprafața de cultură și numărate cu ajutorul unui hemocitometru; densitatea inițială de însămânțare a fost de  $3 \times 10^4$  celule/cip pentru celulele HT-29 și  $1 \times 10^4$  celule/cip pentru celulele HUVEC.
- Placa OrganoPlate 3-lane care conține cele 40 de cipuri *organ-on-a-chip* a fost manipulată în condiții aseptice după desigilare;
- În toate ferestrele de observare de la nivelul fiecărui cip (Fig.1B) au fost pipetați 50  $\mu\text{L}$  de PBS;
- S-a pregătit pe gheață Matrigel prin diluarea matricei extracelulare stoc la o concentrație finală de mediu de cultură 9 mg/mL; s-au pregătit 2  $\mu\text{L}$  \* 96 cipuri + 40% extra;
- Suspensia celulară de HT-29 pentru însămânțare a fost centrifugată timp de 5 min/1500 rpm și resuspendată în matricea extracelulară pregătită;
- Suspensia celulară în gel a fost pipetată în orificiile pentru gel (Fig. 1B), la nivelul fiecărui cip fiind pipetați câte 2  $\mu\text{L}$ ;
- După umplerea tuturor celor 40 de cipuri, placa a fost incubată timp de 15 min în condiții standard de cultură pentru a permite polimerizarea gelului;
- Suspensia celulară de HUVEC pentru însămânțare a fost centrifugată timp de 5 min/1500 rpm și resuspendată în volumul corespunzător de mediu de cultură complet;
- 2  $\mu\text{L}$  din suspensia celulară a fost pipetată la nivelul fiecărui cip în orificiul superior pentru mediu (inlet) (Fig.1B);
- 50  $\mu\text{L}$  de mediu de cultură complet a fost pipetat la nivelul fiecărui cip în orificiul superior pentru mediu (inlet) (Fig.1B);

- Placa OrganoPlate a fost incubată în condiții standard de cultură, pe agitatorul de plăci special Mimetas OrganoFlow pe o parte, pe suportul special pentru formarea tuburilor în plăcile OrganoPlate; incubarea s-a realizat timp de 6 ore;
- După cele 6 ore, 50  $\mu$ L de mediu de cultură complet a fost pipetat la nivelul fiecărui cip în orificiul superior pentru mediu (outlet);
- Placa OrganoPlate a fost incubată în condiții standard de cultură, pe agitatorul de plăci special Mimetas OrganoFlow (unghi 7<sup>0</sup>/ interval 8 minute), până la tratament;

## 2.2. APLICAREA TRATAMENTELOR CU NANOSISTEME

Tratamentele au fost aplicate doar după confirmarea formării unei bariere endoteliale compacte în sistemele *organ-on-a-chip* 3-lane, prin inspectarea plăcii OrganoPlate la microscopul optic. Apoi, cipurile de pe fiecare placă OrganoPlate au fost împărțite în 2: pentru jumătate de placă, mediul de cultură a fost reîmprospătat, pentru jumătate de placă a fost agăugat tratamentul cu nanoparticule polimerice marcate cu fluoresceină (FITC) încărcate cu 5-fluororacil la o concentrație de 2 mg/mL. Aceste sisteme *drug-delivery* nu fac subiectul prezentei cereri de brevet și au fost utilizate doar pentru validarea metodei de cuantificare a capacității nanosistemelor încărcate cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială. Metoda descrisă poate fi utilizată pentru orice testarea oricărui sistem *drug-delivery*, singurul lucru obligatoriu fiind marcarea acestora cu un fluorocrom, care în cazul de față este FITC. Acest lucru este necesar pentru a putea analiza internalizarea nanosistemelor prin citometrie în flux, fluorocromul fiind selectat pe baza specificațiilor tehnice ale citometrului pe care urmează a fi analizată proba. Pentru aplicarea tratamentelor, mediul de cultură existent a fost aspirat din toate canalele de mediu, iar tratamentele au fost aplicate prin pipetarea în canalul de mediu (inlet) tratamentul corespunzător.

## 2.3. CUANTIFICAREA CAPACITĂȚII DE INTERNALIZARE A NANOSISTEMELOR DE CĂTRE CELULELE TUMORALE DE ADENOCARCINOM COLORECTAL ÎN ABSENȚA ȘI PREZENȚA BARIEREI ENDOTELIALE

Validarea și cuantificarea internalizării nanosistemelor polimerice cuplate cu FITC s-a realizat prin citometrie în flux pe baza cuantificării fluorescenței (FITC) din interiorul celulelor HT-29 expuse timp de 1 oră la tratamentul cu sistemele *drug-delivery* marcate

fluorescent. În acest scop, probele au fost tratate după cum a fost descris anterior, iar celulele HT-29 au fost colectate din orificiile pentru gel din ambele tipuri de *organ-on-a-chip* prin tratament cu tripsină/EDTA. Suspensiile celulare astfel obținute au fost centrifugate timp de 5 minute/1500 rpm și sedimentele celulare au fost spălate cu PBS de 2 ori pentru înlăturarea nanoparticulelor aderate de suprafața celulară și nu internalizate. După etapele de spălare, peletele celulare au fost resuspendate în 500 μl tampon PBS și apoi au fost achiziționate folosind citometrul Beckman Coulter CytOflex și Softul CytExpert.

Pentru achiziția datelor în softul CytExpert s-a realizat: *i) un grafic dot plot* cu doi parametri Forward Scatter (FS) / Side Scatter (SS) pentru înlăturarea debrisurilor celulare și evidențierea populației de celule tumorale și *ii) o histogramă* pe detectorul pentru FITC pe care au fost delimitate 2 regiuni, pe baza probelor control (probe netratate cu sistemele polimerice): o regiune corespunzătoare populației negative (celule FITC-negative) și o regiune corespunzătoare populației pozitive (celule FITC-pozitive).

## **2.4. CUANTIFICAREA CAPACITĂȚII NANOSISTEMELOR ÎNCĂRCATE CU AGENȚI ANTITUMORALI DE A PENETRA BARIERA ENDOTELIALĂ**

Pe baza profilului de internalizare al nanosistemelor polimerice marcate cu FITC de către celulele HT-29 cultivate în sisteme *organ-on-a-chip* simple și sisteme *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială, s-a generat o metodă de calcul a nanosistemelor încărcate cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială. Având în vedere că în ambele sisteme *organ-on-a-chip* a fost perfuzată aceeași concentrație de tratament (2 mg/mL), se poate calcula capacitatea nanosistemelor polimerice cuplate cu FITC de a penetra bariera endotelială. Considerând capacitatea nanosistemelor de a penetra bariera endotelială în cazul ideal 100% (toate nanosistemele administrate reușesc să penetreze bariera endotelială, să ajungă la celulele tumorale și să fie internalizate de către acestea), se poate utiliza următoarea formulă pentru a calcula capacitatea practică a nanosistemelor de a penetra bariera endotelială = 100% + [(procentul de celule HT-29 care nu au internalizat nanoparticulele polimerice-FITC în sistemul *organ-on-a-chip* simplu) - [(procentul de celule HT-29 care nu au internalizat nanoparticulele polimerice-FITC în sistemul *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială)].

## **3. REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL CERERII DE BREVET DE INVENȚIE**

### **3.1. GENERAREA MODELELOR 3D DE CULTURĂ *IN VITRO***

Pentru cultivarea celulelor HT-29 în sistemele de tip *organ-on-a-chip* în absența sau prezența barierei endoteliale, s-au utilizat plăcile OrganoPlate. Pentru evidențierea distribuției celulelor tumorale HT-29 la nivelul cipurilor și formarea barierei endoteliale, s-a utilizat marcarea cu faloidină-FITC și DAPI pentru evidențierea filamentelor de actină, respectiv a nucleilor celulari. Probele au fost vizualizate cu ajutorul microscopului de fluorescență inversat Olympus (Fig.1). Rezultatele obținute au evidențiat că celulele HT-29 cultivate în sistemul de tip *organ-on-a-chip* în absența barierei endoteliale prezintă un citoschelet bine definit și formează rețele intercelulare complexe, fiind uniform distribuite la nivelul microcipurilor fluidice. Mai mult, celulele HT-29 formează structuri tubulare complexe 3D în interiorul cipurilor, însă celulele nu sunt etalate la nivelul acestora. În contrast, celulele HT-29 cultivate în sistemele de tip *organ-on-a-chip* în prezența barierei endoteliale prezintă un citoschelet bine definit, celulele fiind organizate în rețele 3D complexe și fiind etalate la nivelul cipurilor. Mai mult, celulele endoteliale au fost distribuite uniform de-a lungul canalului de perfuzare a mediului, formând o barieră endotelială compactă de-a lungul acestuia.

### **3.2. CUANTIFICAREA CAPACITĂȚII DE INTERNALIZARE A NANOSISTEMELOR DE CĂTRE CELULELE TUMORALE DE ADENOCARCINOM COLORECTAL ÎN ABSENȚA ȘI PREZENȚA BARIEREI ENDOTELIALE PRIN CITOMETRIE ÎN FLUX**

Pentru cuantificarea internalizării NPs polimerice marcate cu fluorocrom (FITC), celulele HT-29 colectate din cipurile microfluidice cu 2-canale sau cu 3-canale au fost analizate prin citometrie în flux pentru cuantificarea fluorescenței (FITC) din interiorul celulelor HT-29 tratate timp de o oră cu aceste sisteme *drug-delivery* marcate fluorescent. Cuantificarea fluorescenței s-a realizat prin achiziționarea probelor cu ajutorul citometrului Beckman Coulter Cytotflex (Beckman Coulter) și a soft-ului CytExpert (Beckman Coulter).

Rezultatele obținute (Fig.3) au arătat că după o oră de la tratament, celulele HT-29 cultivate în sistemele *organ-on-a-chip* simple, au prezentat o capacitate semnificativ crescută de a internaliza sistemele *drug-delivery* polimerice marcate cu FITC,  $\pm 91.40\%$  din totalul celulelor analizate fiind FITC pozitive. În contrast, în cazul celulelor cultivate în sistemele *organ-on-a-chip* cu 3 canale, doar  $\pm 23.76\%$  din totalul celulelor analizate au fost FITC pozitive, rezultate care arată că o cantitate mult mai mică de sisteme *drug-delivery* polimerice

au fost internalizate în cazul cultivării celulelor HT-29 în prezența barierei endoteliale, în sistemele de cultură 3D biomimetice de tip *organ-on-a-chip*.

### 3.3. CUANTIFICAREA CAPACITĂȚII NANOSISTEMELOR ÎNCĂRCATE CU AGENȚI ANTITUMORALI DE A PENETRA BARIERA ENDOTELIALĂ

Algoritmul de calcul al capacității nanosistemelor polimerice de a penetra bariera endotelială se bazează pe perfuzarea aceleiași cantități de tratament destinat țintirii celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal în două sisteme de cultură 3D diferite: *i*) un sistem de cultură de tip *organ-on-a-chip* simplu, unde au fost cultivate exclusiv celulele tumorale HT-29 în matricea extracelulară și *ii*) un sistem de cultură de tip *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială care a fost creată prin cultivarea celulelor endoteliale în cipurile destinate perfuzării tratamentului și celulele tumorale HT-29 în matricea extracelulară au fost cultivate în camera de cultură principală.

Astfel, după perfuzarea aceleiași cantități de tratament de nanosisteme polimerice cuplate cu FITC în cele 2 sisteme și colectarea celulelor tumorale din acestea, a fost calculată internalizarea sistemelor *drug-delivery* de către celulele HT-29 prin citometrie în flux în ambele condiții experimentale:  $\pm 91.40\%$  în cazul celulelor HT-29 cultivate în sistemul *organ-on-a-chip* simplu, respectiv  $\pm 23.76\%$  cultivate în sistemul *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială. Pe baza acestor informații, se poate calcula capacitatea nanosistemelor polimerice cuplate cu FITC de a penetra bariera endotelială. Considerând capacitatea nanosistemelor de a penetra bariera endotelială în cazul ideal 100% (toate nanosistemele administrate reușesc să penetreze bariera endotelială, să ajungă la celulele tumorale și să fie internalizate de către acestea), se poate utiliza următoarea formulă pentru a calcula capacitatea practică a nanosistemelor de a penetra bariera endotelială =  $100\% + [(\text{procentul de celule HT-29 care nu au internalizat nanoparticulele polimerice-FITC în sistemul } \textit{organ-on-a-chip} \text{ simplu}) - [(\text{procentul de celule HT-29 care nu au internalizat nanoparticulele polimerice-FITC în sistemul } \textit{organ-on-a-chip} \text{ cu barieră endotelială})]$ . Concret, în cazul nanosistemelor polimerice utilizate pentru validarea acestei metode de calcul, capacitatea nanosistemelor de a penetra bariera endotelială este de 32.36% după 1 oră de la tratament.

## CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obținute în urma realizării acestor studii, se pot formula următoarele concluzii:

- Au fost optimizate și obținute protocoalele de lucru pentru cultivarea celulelor HT-29 și HUVEC în sisteme de cultură biomimetice moderne, de tip organ-on-a-chip, fiind generate 2 modele celulare *in vitro*: i) *sistemul organ-on-a-chip simplu* – pentru cultivarea celulelor de adenocarcinom colorectal HT-29 și ii) *sistemul organ-on-a-chip cu barieră endotelială* pentru cultivarea celulelor de adenocarcinom colorectal HT-29 în prezența unei bariere endoteliale formate din celule endoteliale HUVEC;
- S-a realizat cuantificarea capacității celulelor HT-29 de a internaliza nanosistemele polimerice cuplate cu FITC pe baza cuantificării fluorescenței intracelulare în celulele de adenocarcinom colorectal aparținând liniei HT-29 după o oră de la tratamentul cu nanoparticule polimerice cuplate cu FITC în ambele modele celulare 3D. Astfel,  $\pm 91.40\%$  din totalul populației celulare colectate din sistemul *organ-on-a-chip* simplu a fost pozitivă pentru FITC, respectiv  $\pm 23.76\%$  din totalul populației celulare colectate din sistemul *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială.
- S-a realizat cuantificarea capacității nanosistemelor polimerice de a penetra bariera endotelială și a ajunge la celulele tumorale de adenocarcinom colorectal HT-29, care a fost calculată la  $32.36\%$  într-o oră de la tratament. Această cuantificare s-a realizat utilizând următoarea formulă =  $100\% + [(\text{procentul de celule HT-29 care nu au internalizat nanoparticulele polimerice-FITC în sistemul } \textit{organ-on-a-chip} \text{ simplu}) - [(\text{procentul de celule HT-29 care nu au internalizat nanoparticulele polimerice-FITC în sistemul } \textit{organ-on-a-chip} \text{ cu barieră endotelială})]$ .
- Valoarea acestui model constă în aplicabilitatea lui în studiile de *drug-delivery* prin posibilitatea de a calcula cantitatea de sisteme *drug-delivery* încărcate cu agenți antitumorali sau compuși cu potențial antitumoral care pot penetra bariera endotelială pentru a ajunge la celulele tumorale de adenocarcinom colorectal, cu impact asupra dozării corecte a terapiei în vederea obținerii unui efect eficient antitumoral.

În concluzie, scopul și obiectivele prezentei cereri de brevet au fost îndeplinite, aceasta contribuind la dezvoltarea cunoștințelor în domeniul testării *in vitro* a eficienței nanosistemelor încărcate cu agenți terapeutici antineoplazici. Acest model de cuantificare a

capacității nanosistemelor de a penetra bariera endotelială pentru a fi internalizat de celulele țintă (celulele tumorale) permite ajustarea precisă a dozei de administrare a nanosistemelor pentru a se obține un efect antitumoral eficient și totodată permite optimizarea parametrilor fizico-chimici a nanosistemelor sintetizate (ex. dimensiunea) pentru a îmbunătăți performanța acestora în a penetra bariera endotelială.



## BIBLIOGRAFIE

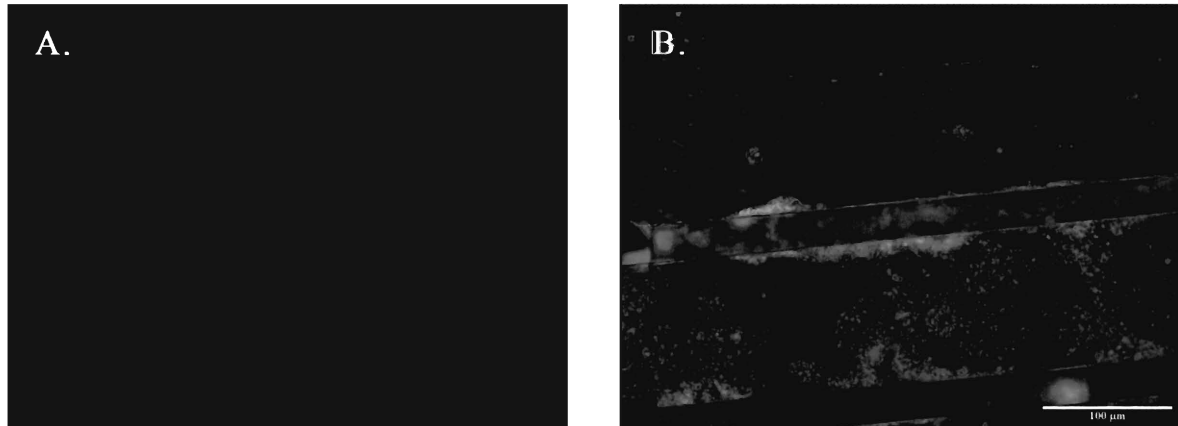
1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34.
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* *n/a*, doi:https://doi.org/10.3322/caac.21660.
3. Trastulli, S.; Cirocchi, R.; Listorti, C.; Cavaliere, D.; Avenia, N.; Gulla, N.; Giustozzi, G.; Sciannameo, F.; Noya, G.; Boselli, C. Laparoscopic vs Open Resection for Rectal Cancer: A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Colorectal Dis.* **2012**, *14*, e277–e296.
4. Nagtegaal, I.D.; Quirke, P. What Is the Role for the Circumferential Margin in the Modern Treatment of Rectal Cancer? *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 303–312.
5. Bujko, K.; Nowacki, M.; Nasierowska-Guttmejer, A.; Michalski, W.; Bebenek, M.; Kryj, M. Long-term Results of a Randomized Trial Comparing Preoperative Short-course Radiotherapy with Preoperative Conventionally Fractionated Chemoradiation for Rectal Cancer. *Br. J. Surg.* **2006**, *93*, 1215–1223.
6. Kim, J.H. Chemotherapy for Colorectal Cancer in the Elderly. *World J. Gastroenterol. WJG* **2015**, *21*, 5158.
7. André, T.; Boni, C.; Navarro, M.; Tabernero, J.; Hickish, T.; Topham, C.; Bonetti, A.; Clingan, P.; Bridgewater, J.; Rivera, F. Improved Overall Survival with Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment in Stage II or III Colon Cancer in the MOSAIC Trial. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 3109–3116.
8. Xie, Y.-H.; Chen, Y.-X.; Fang, J.-Y. Comprehensive Review of Targeted Therapy for Colorectal Cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 1–30.
9. Ginghină, O.; Hudiță, A.; Zaharia, C.; Tsatsakis, A.; Mezhuev, Y.; Costache, M.; Gălățeanu, B. Current Landscape in Organic Nanosized Materials Advances for Improved Management of Colorectal Cancer Patients. *Materials* **2021**, *14*, 2440.
10. Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941.
11. Kou, L.; Bhutia, Y.D.; Yao, Q.; He, Z.; Sun, J.; Ganapathy, V. Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation across Cellular Barriers and Drug Exposure to Selective Cell Types. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 27.
12. Kadletz, L.; Heiduschka, G.; Domayer, J.; Schmid, R.; Enzenhofer, E.; Thurnher, D. Evaluation of Spheroid Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Models in Comparison to Monolayer Cultures. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 1281–1286.
13. Pampaloni, F.; Reynaud, E.G.; Stelzer, E.H. The Third Dimension Bridges the Gap between Cell Culture and Live Tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 839–845.
14. Chaicharoenaudomrung, N.; Kunhorm, P.; Noisa, P. Three-Dimensional Cell Culture Systems as an in Vitro Platform for Cancer and Stem Cell Modeling. *World J. Stem Cells* **2019**, *11*, 1065.
15. Kimlin, L.C.; Casagrande, G.; Virador, V.M. In Vitro Three-dimensional (3D) Models in Cancer Research: An Update. *Mol. Carcinog.* **2013**, *52*, 167–182.
16. Liu, X.; Fang, J.; Huang, S.; Wu, X.; Xie, X.; Wang, J.; Liu, F.; Zhang, M.; Peng, Z.; Hu, N. Tumor-on-a-Chip: From Bioinspired Design to Biomedical Application. *Microsyst. Nanoeng.* **2021**, *7*, 1–23.
17. Datta, P.; Dey, M.; Ataie, Z.; Unutmaz, D.; Ozbolat, I.T. 3D Bioprinting for Reconstituting the Cancer Microenvironment. *NPJ Precis. Oncol.* **2020**, *4*, 1–13.

18. Bishop, E.S.; Mostafa, S.; Pakvasa, M.; Luu, H.H.; Lee, M.J.; Wolf, J.M.; Ameer, G.A.; He, T.-C.; Reid, R.R. 3-D Bioprinting Technologies in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Current and Future Trends. *Genes Dis.* **2017**, *4*, 185–195.
19. Galateanu, B.; Hudita, A.; Biru, E.I.; Iovu, H.; Zaharia, C.; Simsensohn, E.; Costache, M.; Petca, R.-C.; Jinga, V. Applications of Polymers for Organ-on-Chip Technology in Urology. *Polymers* **2022**, *14*, 1668.
20. Sontheimer-Phelps, A.; Hassell, B.A.; Ingber, D.E. Modelling Cancer in Microfluidic Human Organs-on-Chips. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 65–81.
21. Wang, Z.; Malik, A.B. Nanoparticles Squeezing across the Blood–Endothelial Barrier via Caveolae. *Ther. Deliv.* **2013**, *4*, 131–133.

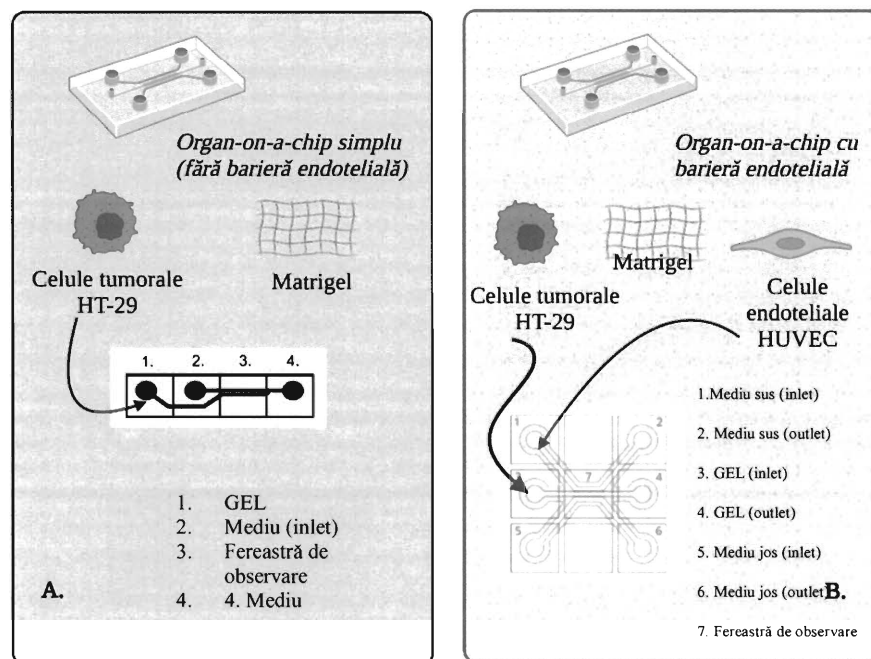
**REVEDICĂRI**

- 1) Obținerea unui model care servește la determinarea capacității nanosistemelor încărcate cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială și livra încărcătura medicamentoasă celulelor tumorale de adenocarcinom uman colorectal după administrare;
- 2) Modelul de cultură a modelelor celulare *in vitro* conform revendicării 1, este caracterizat de protocolul de cultură a celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal în sistemele de tip *organ-on-a-chip* cu sau fără barieră;
- 3) Modelul de cuantificare a capacității de internalizare a nanosistemelor de către celulele tumorale de adenocarcinom colorectal în absența și prezența barierei endoteliale conform revendicării 1 stă la baza cuantificării nanosistemelor încărcate cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială;
- 4) Modelul de cuantificare a capacității nanosistemelor încărcate cu agenți antitumorali de a penetra bariera endotelială și livra încărcătura medicamentoasă celulelor tumorale de adenocarcinom colorectal după administrare conform revendicării 1 stă la baza procedului de corelare a internalizării diferențiate de nanosisteme încărcate cu medicament de către celulele tumorale în sistemele de tip *organ-on-a-chip* în absența sau prezența barierei endoteliale;

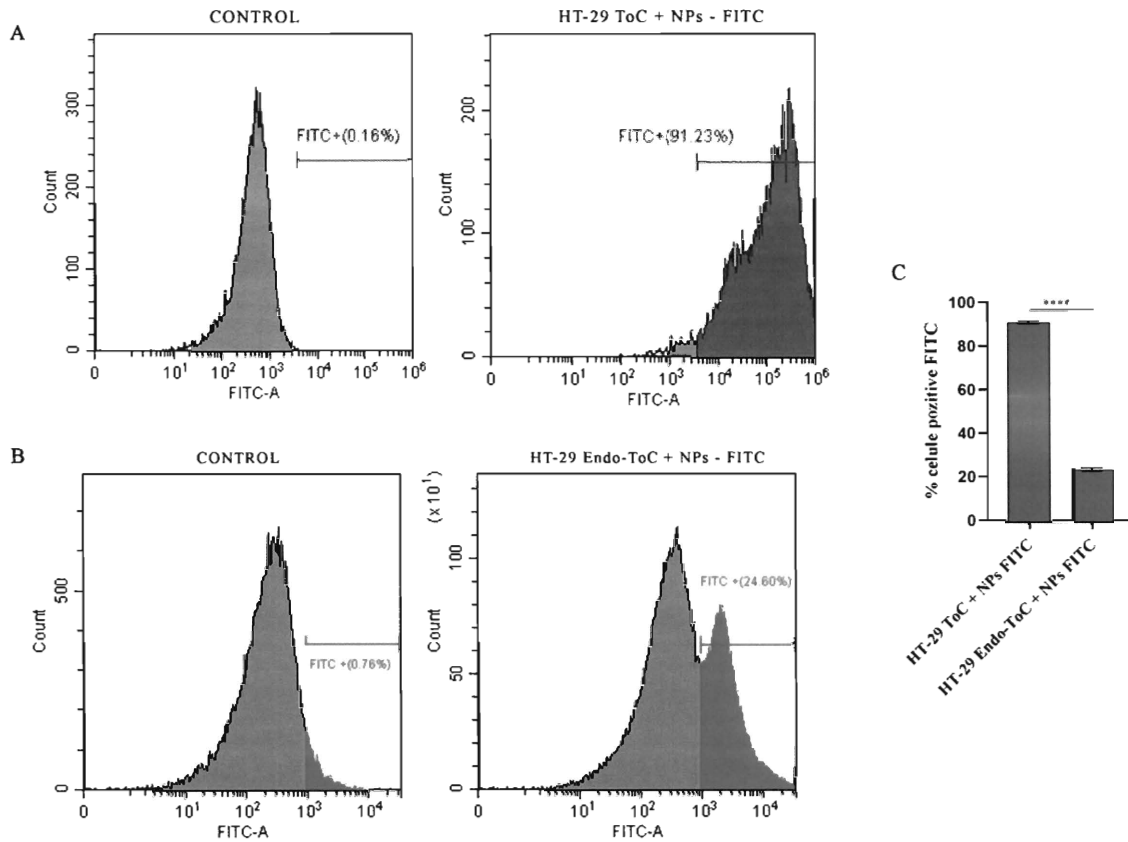
## LEGENDĂ FIGURI



**Figura 1.** Imagini de microscopie de fluorescență care evidențiază citoscheletul celulelor după marcarea cu faloidină-FITC (verde) și nucleii acestora (albastru) după cultura în sistemele *organ-on-a-chip* simple (A) și *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială (B).



**Figura 2.** Schemă privind modul de cultură al celulelor HT-29 și HUVEC în sistemele de tip *organ-on-a-chip* simple (A) sau cu barieră endotelială (B).



**Figura 3.** Histograme de citometrie în flux reprezentând populația de celule HT-29 FITC-pozitive colectate din *organ-on-a-chip* simple (A) și *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială (B) netratate (stânga) și tratate timp de 1h cu NPs polimerice-FITC (dreapta) și media celulelor HT-29 FITC-pozitive (C) colectate din *organ-on-a-chip* simple și *organ-on-a-chip* cu barieră endotelială din 3 experimente independente (n=3) (\*\*\*\* p < 0.0001).