



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of a kidney-on-a-chip model for compound screening and transport studies

Vormann, M.K.

Citation

Vormann, M. K. (2021, September 9). *Development of a kidney-on-a-chip model for compound screening and transport studies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3209238>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3209238>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3209238> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Vormann, M.K.

Title: Development of a kidney-on-a-chip model for compound screening and transport studies

Issue Date: 2021-09-09



Addendum

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitae

List of Publications

Acknowledgements

A

Nederlandse Samenvatting

Ontwikkeling van een Kidney-on-a-Chip platform

Het aantal verschillende 3D-modellen van menselijk weefsel gebruikt voor medisch onderzoek is de laatste jaren opmerkelijk toegenomen. Dit is een ontwikkeling die wordt voortgestuwd door de beperkingen van 2D-celkweek, het streven om dierproeven te verminderen en te vervangen, en het kleine percentage geneesmiddelen in ontwikkeling dat in klinische proeven wordt opgenomen. 2D-celkweekmodellen van de nier kunnen nefrotoxiciteit niet nauwkeurig voorspellen, omdat de cellen die worden gekweekt in deze modellen enkele fysiologisch relevante kenmerken missen. Deze kenmerken omvatten correcte polarisatie van de cellen en de mogelijkheid om te kweken op een permeabel oppervlak dat lijkt op de extracellulaire matrix (ECM) met zijn interstitiële vloeistof aan de basale zijde en de blootstelling van de cellen aan schuifspanning aan de apicale zijde van het celmembraan. Er zijn zowel ethische als fysiologische redenen om dierproeven in geneesmiddelenonderzoek te verminderen. Druk vanuit de samenleving, maar ook de almaar stijgende kosten van dierproeven, ondersteunen het streven om alternatieven te ontwikkelen. Daarnaast zijn er significante verschillen tussen fysiologie van mens en dier, bijvoorbeeld voor de nier is er een verschil in expressie van belangrijke transporteiwitten van chemische verbindingen zoals medicijnen. Ten slotte, wanneer diermodellen de menselijke reactie op de geteste geneesmiddelen onjuist voorspellen en toxiciteit pas achteraf kan worden gedetecteerd tijdens klinische tests, kan dit leiden tot hoge kosten of zelfs erger tot gezondheidsbedreigende problemen bij de mens.

Het doel van dit proefschrift was om een *in vitro* model te ontwikkelen waarmee het mogelijk is om de veiligheid en werkzaamheid van een reeks geneesmiddelen te bestuderen.

In hoofdstuk 2 beschrijven we de ontwikkeling van een model dat de meeste van de hierboven genoemde punten combineert. Humane Renal Proximal Tubule Epithelial Cells (RPTEC) werden gezaaid om buisvormige structuren te vormen tegen een collageen 1-gel in de OrganoPlate® 3-lane. Vloeistofschuifspanning werd vergeleken door het introduceren van een bidirectionele, door zwaartekracht aangedreven stroming door het systeem na plaatsing van de OrganoPlate bovenop een interval rocker systeem. In de aanvullende dataset van hoofdstuk 2 lieten we zien dat perfusie cruciaal is voor buisvorming. Voor de ontwikkeling van ons model hebben we een commercieel verkrijgbare RPTEC-controlecellijn (SA7K-clone) gebruikt. We konden aantonen dat deze cellen de juiste polarisatie vertonen en lekdichte barrières vormen. Polarisation van cellen werd bevestigd door immunofluorescentiekleuring die één primaire cilium per cel afbeeldde, wijzend naar het lumen van de tubulus. Bovendien waren microvilli, die de borstelrand van de epitheelcellen bedekken, uitsluitend aanwezig op het apicale oppervlak. Met behulp van een immunofluorescente kleuring en een barrière-integriteitstest werd aangetoond dat de RPTEC lekdichte barrières vormden. Er werden tight junctions gevonden bij cel-cel verbindingen, die werden gevisualiseerd met behulp van de tight junction marker zonula occludens (ZO)-1. De

dichtheid van deze verbindingen werd gevalideerd door een barrière-integriteitstest die we ontwikkelden in de loop van dit proefschrift voor het OrganoPlate-systeem. De tubuli werden gespoeld met een medium dat fluorescerende dextrankleurstoffen van verschillende groottes bevatte. De barrièretest opende een breed scala aan mogelijkheden dat we konden gebruiken om ons model te analyseren. We gebruikten deze barrièretest om te bepalen op welk tijdstip na het zaaien de tubuli een lekdicte barrière tegen de collageen 1-gel groeiden en de blootstelling kon beginnen. Verder evalueerden we het nefrotoxische effect van cisplatine, een geneesmiddel waarvan bekend is dat het een schadelijk effect heeft op de proximale tubuli, zowel *in vivo* als *in vitro*. Dosisafhankelijke effecten van de blootstelling aan cisplatine kunnen worden gedetecteerd in een breed scala aan testen.

Het model werd opgezet in de OrganoPlate 3-lane, die toegang tot de tubulus vanaf de basale en de apicale zijde mogelijk maakt. Door deze belangrijke specificatie te combineren met de kenmerken van correcte polarisatie en lekdicte barrières zoals hierboven beschreven, werd het platform gebruikt voor trans-epitheliale transportexperimenten. Er werden twee verschillende methoden gebruikt om actief transport van kationische verbindingen aan te tonen: het meten van de concentratie van de verbinding intracellulair en trans-epitheliaal transport door het celmembraan. De transportfunctie kon met succes worden geremd, wat het bestaan van actief transport aantoont. Hoewel de transportfunctie van kationen door de RPTEC (SA7K-kloon) kon worden aangetoond, missen deze cellen enkele van de belangrijkste transporters die cruciaal zijn voor het transport van anionen. In hoofdstuk 3 werd een tweede epitheelcelbron geïntroduceerd om dit probleem te verhelpen: conditioneel onsterfelijk gemaakte epitheelcellen van de proximale tubulus die xenobiotische organische aniontransporter 1 (ciPTEC-OAT1) tot overexpressie brengen. Met behulp van ciPTEC-OAT1 konden we een testplatform opzetten dat we konden gebruiken om de toxiciteit van beide actieve transportafhankelijke medicijnen te detecteren; kationen en anionen. Door de twee celtypen te combineren met een breder spectrum van verbindingen en uitleesassays, werd een screeningplatform ontwikkeld, de Nephroscreen. De ontwikkeling van de Nephroscreen was onderdeel van de Nephrotube challenge crackIT die werd georganiseerd door het National Center for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research (NC3R's). De Nephroscreen was een gezamenlijk project van een consortium bestaande uit 4 verschillende partijen: Mimetas, Fachhochschule Nordwestschweiz, Radboud Universitair Medisch Centrum Nijmegen en Universiteit Utrecht. Het doel van het Nephroscreen-project was om een Proximal Tubulus-on-a-Chip te ontwikkelen dat in staat is om nefrotoxische effecten nauwkeurig te identificeren met behulp van menselijke cellen in een 3D-microfluidisch platform met hoge doorvoer.

Hiertoe werd de proximale tubuli op in totaal 12 verbindingen gescreend en de toxiciteit hiervan word bepaald. Vier van deze verbindingen waren bekende nefrotoxische middelen die ook werden gebruikt om de verschillende testen op te zetten. Acht verbindingen waren onbekend

omdat ze werden geleverd door de sponsors van het onderzoek. We konden aantonen dat het merendeel van de geleverde verbindingen een nefrotoxisch effect had op de Nephroscreen. Het effect van één verbinding op de Nephroscreen kon alleen worden gedetecteerd tijdens de transportonderzoeken, omdat deze verbinding geen effect had in een van de andere testen. Een tweede verbinding vertoonde een interactie met P-glycoproteïne (P-gp) en een mild effect op een verhoogd niveau van microRNA's (miRNA's), maar wederom geen schadelijk effect op de levensvatbaarheid van de tubulaire integriteit van de tubuli. Een van de verbindingen vertoonde tijdens het eerste onderzoek geen cytotoxiciteit, daarom hebben we het getest in een langdurig experiment waarbij de blootstelling gedurende 11 dagen werd uitgevoerd in plaats van 48 uur. Deze studie toonde aan dat voor sommige verbindingen een langetermijnstudie toxiciteit kan aantonen, die niet werd gedetecteerd in het 48-uursexperiment.

Parallel aan de ontwikkeling van de Nephroscreen is een drug-drug interaction (DDI) studie uitgevoerd op de RPTEC, zoals beschreven in hoofdstuk 4. De studie in hoofdstuk 4 was bedoeld om te bepalen of we onze Proximale Tubulus-on-a-Chip konden gebruiken in een DDI-onderzoek. Met behulp van enkele multiplex-assays konden wij de toxiciteit van enkelvoudige en gecombineerde doseringen van op het humaan immunodeficiëntievirus (HIV) gerichte geneesmiddelen onderzoeken. HIV-patiënten worden vaak behandeld met het medicijn Genvoya dat haar voorganger Stribild de afgelopen jaren heeft vervangen. Beide zijn geneesmiddelen die tenofovir bevatten en worden geleverd in pilvorm. Ze bevatten een combinatie van werkzame stoffen, namelijk emtricitabine, elvitegravir en cobicistat, en een van de prodrugs van tenofovir, tenofovirdisoproxilfumaraat (TDF) of tenofoviralafenamide (TAF). Van alle ingrediënten in deze combinaties wordt met name de nefrotoxiciteit van tenofovir algemeen aanvaard. Ons doel was om te onderzoeken of we een toxisch effect op de proximale tubuluscellen konden detecteren door een van de twee tenofovir-prodrugs, vooral in combinatie met een van de additieve verbindingen. Een belangrijk verschil tussen deze twee prodrugs is dat TDF niet stabiel is wanneer het in contact komt met menselijk plasma, waar het snel hydrolyse ondergaat tot tenofovir, terwijl TAF een veel hogere stabiliteit heeft, wat resulteert in een hogere antivirale activiteit en lagere doseringen in vergelijking met TDF. In hoofdstuk 3 konden we aantonen dat de oorspronkelijke vorm van tenofovir een cytotoxisch effect had op ciPTEC-OAT1 terwijl er geen effect kon worden gemeten op RPTEC. Aangezien de oorspronkelijke vorm van tenofovir via de anionroute (voornamelijk via OAT1) in de cellen wordt getransporteerd, was dit een verwacht resultaat. In de huidige studie hebben we echter RPTEC gebruikt. Toen we de twee prodrugs testten, leidde TDF niet tot een schadelijk effect op de proximale tubuli, wat verwacht werd gezien het feit dat TDF in tenofovir wordt gehydrolyseerd wanneer het in contact komt met kweekmedium. Interessant genoeg vertoonde TAF een schadelijk effect op de proximale tubuli bij vergelijkbare concentraties waarvan we maten dat deze toxisch waren voor tenofovir in de OAT1-expressiecellen. Deze resultaten lieten ons zien dat de verbinding TAF inderdaad stabiel is in contact met serum en geen hydrolyse ondergaat in de oorspronkelijke vorm van tenofovir.

De twee prodrugs van tenofovir worden niet afzonderlijk toegediend, maar in combinatie met drie andere antiretrovirale middelen, namelijk elvitegravir, cobicistat en emtricitabine. Naast het testen van de twee prodrugs in enkelvoudige doseringen, voerden we een gelijktijdige behandeling van de prodrugs uit met als doel te beoordelen of een van hen het cytotoxische effect van de twee tenofovir-prodrugs versterkt. Onze resultaten suggereren dat zelfs bij hoge concentraties emtricitabine geen schadelijk effect had op de proximale tubuli, afzonderlijk of in combinatie met een van de twee prodrugs van tenofovir. Elvitegravir had geen versterkend effect op de cytotoxiciteit bij toediening in combinatie met TDF. Wanneer het echter samen met TAF werd gedoseerd, versterkte elvitegravir het schadelijke effect ervan sterk en werden superadditieve synergetische effecten gemeten. Een combinatie met TDF leidde tot een verhoogde schade die in alle testen kon worden gedetecteerd. Een combinatie van cobicistat en TAF leidde tot een verhoogde cytotoxiciteit die werd gedetecteerd voor zowel de laag als de hoog gedoseerde combinaties.

In hoofdstukken 2-4 hebben we ons vooral gericht op acuut nierletsel (AKI) als gevolg van een acute reactie op een nefrotoxisch middel. Naast deze toxische modellen waren we ook geïnteresseerd in het ontwikkelen van een ziektemodel voor behandelingsgerelateerde toxiciteit waarmee we de beschermende werking van medicijnen kunnen screenen. Om dit te bereiken hebben we 3 nieuwe aspecten aan ons model toegevoegd die we beschreven in hoofdstuk 5: co-cultuur met een bloedvat, inductie van AKI veroorzaakt door een ischemische gebeurtenis, en de beoordeling van verbindingen die een beschermend effect hebben tijdens de ischemische gebeurtenis die leidt tot AKI. Voor de ontwikkeling van het co-cultuurmodel hebben we het Kidney-on-a-Chip model dat ontwikkeld is in hoofdstuk 2 uitgebreid door endotheelcellen in het tweede perfusiekanaal te introduceren. We karakteriseerden de cultuur met behulp van immunokleuring voor celtype-specifieke markers en zorgden voor correcte polarisatie. We hebben AKI-geassocieerde uitlezingen gevalideerd door blootstelling van de co-cultuur aan bekende nefrotoxische stoffen. Om ischemische gebeurtenissen in de nier te bestuderen, werd de co-kweek blootgesteld aan ischemie door een combinatie van lage zuurstof, verminderde glucose en het stoppen van de perfusie. Vervolgens werden kweken onder normale omstandigheden opnieuw geperfuseerd om reperfusieschade te veroorzaken. De schade werd gekwantificeerd door middel van morfologische beoordeling, caspase-3/7-activering, beoordeling van de levensvatbaarheid en afgifte van lactaatdehydrogenase. Lage zuurstof, verminderde glucose en onderbroken doorstroming waren schadelijk voor de tubuli in elke combinatie van twee, terwijl de combinatie van alle drie tot de meest ernstige schade leidde. Dit effect werd flink versterkt na reperfusie. Het effect van ischemische aandoeningen op het endotheel was minder ernstig dan op het epitheel.

Voor de beoordeling van beschermende verbindingen werden adenosine, nicotinamide of N-acetylcysteïne toegevoegd aan het kweekmedium van de proximale tubulus en het bloedvat

tijdens de blootstelling en reperfusie. Adenosine bleek een significant beschermend effect te hebben, terwijl een dergelijk effect niet werd gevonden voor nicotinamide en N-acetylcysteïne.

In hoofdstuk 5 waren we in staat om aan te tonen dat AKI geïnduceerd door nierischemie/reperfusieschade (rIRI) effectief kan worden gemodelleerd in deze geperfuseerde 3D nier-cokweek. De robuustheid van het model en de testen in combinatie met de doorvoer van het platform maken het ideaal om het effect van AKI-voorkomende verbindingen te bestuderen en de ontwikkeling van nieuwe therapeutische behandelingsmethodes mogelijk te maken.

Conclusie

Farmaceutische bedrijven, regeringen en het grote publiek zijn zich er steeds meer van bewust dat diermodellen die worden gebruikt bij het testen van geneesmiddelen een aantal essentiële aspecten missen om te dienen als een nauwkeurige weergave van de menselijke biologie. Omdat deze modellen van het menselijk lichaam fysiologisch relevanter zouden moeten zijn, voldoen diermodellen niet meer omdat de reactie van dierlijke cellen vaak verschilt van de reactie van menselijke cellen. In plaats daarvan zijn *in vitro* celkweekmodellen die beschikken over 3D-architectuur, microfluidica en hoge doorvoercapaciteiten een veelbelovende technologie en treden ze momenteel steeds meer op de voorgrond van geneesmiddelenonderzoek. Deze 3D-modellen kunnen op zo'n manier worden ontwikkeld dat ze waarschijnlijk diermodellen zullen overtreffen op belangrijke aspecten zoals gelijkenis met het menselijk lichaam, het voorspellen van veiligheid en werkzaamheid van verbindingen, testmogelijkheden met hoge doorvoer, ethische aspecten en kosten.

Om de haalbaarheid van zo'n geavanceerd 3D-*in vitro* model aan te tonen, hebben we een microfluidisch *in vitro*-platform gebruikt om een Kidney-on-a-Chip platform te ontwikkelen dat het vermogen heeft om de tubulaire respons op bekende en onbekende nefrotoxische stoffen en verbindingen te reproduceren, zoals gezien in *in vitro* en in klinische studies. Verder hebben we de respons van het model op nierischemie/reperfusieschade beoordeeld en konden we de preventie van tubulaire schade meten bij het toevoegen van beschermende verbindingen.

Deze bevindingen laten zien dat 3D-weefselmodellen kunnen concurreren met alternatieven zoals diermodellen en 2D-modellen. We verwachten dat 3D-weefselmodellen de testplatforms van de toekomst zijn voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen.

Aangezien onderzoek naar 3D-weefselmodellen een relatief nieuw onderzoeksgebied is, blijft er veel ruimte voor verbetering. Het streven om *in vitro* bevindingen te gebruiken om *in vivo* gedrag met vertrouwen te voorspellen, is bijvoorbeeld een onderzoeksgebied waar 3D-weefselmodellen een belangrijke rol kunnen spelen. Manieren om verschillende menselijke organen op 3D-chips te repliceren, zullen de komende jaren waarschijnlijk sterk verbeteren. Door verschillende chips te combineren en interacties tussen hen te creëren, kan de effectiviteit van medicijnen op een

geheel nieuw niveau worden getest. Op deze manier kan de complexiteit van de *in vitro* 3D-modellen worden vergroot, op manieren die beter lijken op weefselreacties bij mensen.

Dit zou kunnen leiden tot het gelijktijdig testen van een medicijn op verschillende organen, terwijl ze worden verbonden op manieren die lijken op echte structuren in het menselijk lichaam en terwijl de reacties van elk afzonderlijk orgaan worden gemeten. Wanneer deze 3D-weefselmodellen worden gekweekt in een omgeving met hoge doorvoer, kunnen in korte tijd enorme hoeveelheden gegevens worden geproduceerd. Deze gegevens kunnen dienen als basis voor mechanistische modellen met behulp van big data-benaderingen die uiteindelijk kunnen worden gebruikt om de werkzaamheid en veiligheid van geneesmiddelen *in vivo* snel te voorspellen.

Interessante voorbeelden van complexe toekomstige toepassingen van 3D-weefselmodellen zijn bijvoorbeeld complete *in vitro* gevasculariseerde organoïden, 'body-on-a-chip'-systemen die voor een specifieke test kunnen worden ontworpen om alle relevante weefsels en hun interacties te combineren zodat ze zo goed mogelijk lijken op *in vivo* reacties. Een ander voorbeeld is het maken van complexe ziektemodellen waarbij de respons van weefsel en hun interacties op een realistische manier kunnen worden getest. Een andere mogelijke toekomstige toepassing van 3D-weefselmodellen is gepersonaliseerde geneeskunde, waarbij een groot aantal replica's van monsters van patiënten in 3D op de microfluidische chips kunnen worden gekweekt om van deze patiënt afgeleide *in vitro*-modellen te maken. Deze celmonsters kunnen vervolgens worden gescreend op de meest effectieve behandeling voor deze individuele patiënt. Op termijn zou de verdere ontwikkeling van 3D-weefselmodellen kunnen betekenen dat deze voorbeelden geen droom meer zijn, maar werkelijkheid worden.