

Применение кишечных органоидов для персонализированной диагностики и терапии муковисцидоза

Ефремова А.С., Бухарова Т.Б., Каширская Н.Ю., Гольдштейн Д.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

В последние 10 лет были разработаны биологические 3-D модельные системы *in vitro* длительного культивирования, схожие по структуре, выполняемым функциям и клеточному составу с разными органами, — органоиды. В настоящее время органоиды являются уникальной моделью для подбора персонализированной терапии, изучения фундаментальных процессов и заболеваний — генетических, онкологических, инфекционных. Культуры кишечных органоидов используют в качестве чувствительной тест-системы для оценки функциональной активности канала CFTR, диагностики муковисцидоза и назначения индивидуальной схемы лечения при этом заболевании.

Ключевые слова: органоиды, кишечные органоиды, муковисцидоз, CFTR-таргетные препараты, калидеко, оркамби, форсколиновый тест.

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов.

Intestinal organoids and their application for personalized diagnostics and treatment of cystic fibrosis

Efremova A.S., Bukharova T.B., Kashirskaya N.Y., Goldshtein D.V.

Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»

In the last 10 years the biological three-dimensional model systems for long-term *in vitro* culture, similar in structure, performed functions and cellular composition with different organs — the organoids were developed. Currently, organoids represent a unique model for personalized treatment scheme selection, studying of fundamental processes and genetic, oncological and infectious diseases. Intestinal organoid cultures are utilized as a sensitive screening platform for estimation of CFTR channel functional properties, cystic fibrosis diagnostics and prescription of personalized treatment regimen for this disease.

Key words: organoids, intestinal organoids, cystic fibrosis, CFTR-targeting drugs, «Kalydeco», «Orkambi», forskolin-induced swelling assay.

Введение

Органоиды — это самоорганизующиеся трехмерные (3D) многоклеточные структуры, являющиеся миниатюризированными и упрощенными версиями органа, полученными *in vitro*. Потенциально могут быть созданы органоиды любого органа для каждого человека. Культивирование органоидов чаще всего осуществляют в среде с определенными факторами роста и в толще 3D-матрикса. Разработка данной биологической модели в XXI веке открыла принципиально новые возможности для биологии и медицины. Современные достижения в этой области уже значительны — получены органоиды мозга, всех отделов желудочно-кишечного тракта, почки и др. Новые культуры органоидов и дальнейшие методические усовершенствования являются перспективным направлением, которое в будущем может завершиться возможностью трансплантации людям аутологических органов. Культуры кишечных органоидов уже используют для персонализированной терапии муковисцидоза (МВ), одного из самых частых генетических заболеваний. В отличие от использу-

емых подходов для диагностики, оценки эффективности лекарственных препаратов и подбора терапии МВ, применение кишечных органоидов не требует обязательного знания мутаций, вызвавших МВ. Помимо МВ, персонализированный подход с применением органоидов реализуют при терапии онкологических заболеваний.

Основные преимущества и практическое применение органоидов

К настоящему времени были успешно получены органоиды мозга [1, 2], печени [3], желудка и всех отделов кишечника [4–6], поджелудочной железы [7], почек [8, 9], разных опухолей [10–13]. Для каждого типа органоидов была показана экспрессия тканеспецифических маркерных белков; профиль экспрессии генов и ультраструктура органоидов также сходны с соответствующим органом [1–5, 7, 9, 13].

Органоиды получают из тканей человека [5, 7, 14], мыши [3, 4, 6, 15, 16], собаки [17]. Огромный потенциал заложен в использовании индуцированных плюрипо-

тентных стволовых (iPS) клеток. Преимущество данного подхода заключается в возможности получения из iPS клеток методом направленной дифференцировки практически любых органоидов (почек, мозга, поджелудочной железы и др.) и в неограниченном количестве [1, 2, 9, 18, 19]. Полученные из iPS клеток органоиды позволяют проводить персонализированную терапию различных заболеваний. Удобство данного подхода — это минимальный дискомфорт для человека при создании биобанка его iPS клеток, т.к. они могут быть получены из фибробластов кожи или волосных фолликулов [19].

Большинство научных исследований в мире для оценки эффективности новых лекарственных препаратов проводят на животных. Такие исследования имеют высокую стоимость, поэтому были разработаны более экономичные модели, использующие клеточные культуры. Значительная часть пересаживаемых (постоянных линий клеток) имеет опухолевое происхождение. В целом, все используемые линии клеток имеют недостатки и не всегда результаты, получаемые с использованием таких культур, соотносятся с данными *in vivo*. По этой причине, при создании новых лекарственных препаратов, лишь незначительная часть соединений, эффективных на культурах клеток, допускается до клинических испытаний. Например, для исследования слизистой толстого кишечника часто используют линию клеток человека Сасо-2, полученную из аденокарциномы. Однако, по сравнению с клетками слизистой кишечника, мембранные транспортные белки данной линии клеток экспрессируются в меньшем количестве, поэтому, например, для изучения проницаемости лекарственных препаратов с оральным введением, эта модель не подходит [20]. Культуры органоидов в большей степени, чем постоянные линии клеток соответствуют исследуемым тканям. Показательным примером служат кишечные органоиды, которые являются более адекватной моделью слизистой, чем постоянные линии клеток опухолевого происхождения CaCo2 или DLD1 [21].

По сравнению со стандартными моделями с применением пересаживаемых культур клеток органоиды имеют множество преимуществ:

- 1) органоиды состоят из нескольких типов клеток, как и исследуемая ткань [4, 5, 8];
- 2) структура органоида (т.е. взаимное расположение клеток друг относительно друга) сходна со структурой исследуемой ткани [1, 4, 5, 8];
- 3) органоиды можно культивировать длительно без изменения кариотипа и фенотипа. Для культур кишечных органоидов было показано, что они сохраняют кариотип и не изменяются фенотипически в течение 1,5 лет при еженедельном пересеве [22, 23].

По сравнению с моделями на животных органоиды:

- 1) могут решить проблему видоспецифических различий, поскольку многие физиологические и биохимические процессы в организме человека и животных не схожи;

2) дают возможность использовать персонализированный подход при терапии, т.к. могут быть получены из собственных тканей пациента [9, 24, 25];

3) органоиды способны к неограниченному росту, поэтому из одиножды полученного образца ткани человека могут быть наработаны и заморожены любые количества культур органоидов [25, 26];

4) использование органоидов более гуманно и дешевле, чем использование животных.

В настоящее время органоиды рассматриваются как уникальные объекты (модели) для решения многих научных и медицинских задач.

Органоиды используют при фармакологических, токсикологических, микробиологических исследованиях, при изучении генетических, инфекционных, онкологических, воспалительных заболеваний на клеточном и молекулярном уровнях [11, 21, 22, 24, 25]. Например, на культурах кишечных органоидов была исследована роль белка ATG16L1 в патогенезе болезни Крона и воспалительном заболевании кишечника [27]. На органоидах слизистой желудка исследовали роль хронического воспаления, вызванного бактерией *Helicobacter*, в злокачественной трансформации эпителия желудка [6].

На культурах органоидов можно проводить скрининг потенциальных лекарственных препаратов для терапии всех перечисленных классов заболеваний [6, 11]. Например, на кишечных органоидах мыши был проведен обширный скрининг препаратов, способствующих выживанию после облучения [15].

Поскольку могут быть получены органоиды любой ткани от любого человека (через использование технологий получения iPS клеток), это дает возможность разрабатывать медицинские технологии персонализированной терапии многих заболеваний, в том числе и генетических [2, 24]. На культурах опухолевых органоидов, полученных от больных, можно проводить подбор наиболее эффективных лекарственных препаратов и индивидуальной схемы лечения онкологических заболеваний [11–13].

В последнее десятилетие предпринимаются попытки применения органоидов для регенеративной медицины. В ближайшем будущем возможно создание аутологичных тканей для трансплантации на основе культур органоидов [23]. Так, было показано, что кишечные органоиды человека, полученные из iPS клеток, после вживления в почку мыши формируют полноценные ткани тонкого кишечника: эпителиальную со всеми типами клеток и гладкомышечный слой. Полученный *de novo* кишечник выполнял пищеварительные функции — абсорбировал пептиды [28]. Органоиды поджелудочной железы человека, также полученных из iPS клеток, после трансплантации в поджелудочную железу мыши формировали нормальные дольки и протоки. Данный процесс не сопровождался опухолевым перерождением [7].

В органоидах, полученных от пациентов с генетическими заболеваниями, мутации в гене, спровоцировавшим болезнь, могут быть отредактированы. Возможно использова-

ние таких органоидов для замещения пораженной ткани [7, 16]. Например, из iPS клеток людей, больных муковисцидозом, были получены органоиды поджелудочной железы; в дальнейшем исследователи планируют провести геномное редактирование — встроить функциональный ген *CFTR* в iPS клетки, а затем получить из них органоиды поджелудочной железы с функциональным белком CFTR и провести их трансплантацию пациентам [7]. Под руководством Н. Clevers были получены культуры кишечных органоидов от пациентов, больных муковисцидозом, и проведено геномное редактирование мутантного гена *CFTR* с использованием системы CRISPR/Cas9. Авторы предполагают, что геномно-отредактированные кишечные органоиды могут быть использованы для трансплантации [16]. В России разрабатывают условия для редактирования гена *CFTR* (мутация — F508del) для этиотропного лечения муковисцидоза [29, 30].

Органоиды являются незаменимой моделью для изучения фундаментальных процессов: развития разных органов и тканей, регуляторных сигнальных каскадов и многих других процессов. Например, на культурах кишечных органоидов человека исследовали распределение кислорода при гипоксии [31], формирование микробиоты кишечника у новорожденных [14]. В работе J. Kraiczy с соавторами [32] был проанализирован характер метилирования ДНК органоидов, полученных из разных отделов ЖКТ взрослых, детей и эмбрионов и было обнаружено, что он различается для разных отделов ЖКТ и для каждой возрастной группы. Органоиды могут применяться для исследования регуляции самообновления стволовых клеток, их роста и дифференцировки в разных тканях [21]. Так в работе [33] авторы на культурах кишечных органоидов изучили роль Wnt- и Notch-сигнальных каскадов в регуляции самообновления стволовых клеток.

Тем не менее, культуры органоидов имеют ограничения применения, связанные с отсутствием градиента концентрации ростовых факторов в культуральной среде, в отличие от систем *in vivo* [22].

История получения и основные принципы культивирования кишечных органоидов

Впервые органоиды были получены из кишечника мыши в 2009 г в Нидерландах группой исследователей под руководством Н. Clevers [4]. Авторы показали, что одиночные крипты, выделенные из тонкого кишечника мыши, могут образовывать замкнутые структуры из клеток однослойного эпителия, апикальной стороной обращенных во внутреннюю полость, которую назвали люменом, а базальной — во внешнюю среду (рис. 1). Данные структуры получили название кишечных органоидов. В 2011 г той же исследовательской группой были получены кишечные органоиды человека [21].

Кишечные органоиды по структуре и клеточному составу схожи с эпителиальной тканью кишечника *in vivo* (рис. 1). В кишечных органоидах выделяют домены, аналогичные криптам и ворсинкам эпителия кишечника. Как и в слизистой кишечника в «криптах» кишечных органоидов находятся стволовые клетки и клетки Панета. «Ворсинки» кишечных органоидов состоят из дифференцированных клеток — каемчатых энтероцитов, бокаловидных и энтероэндокринных клеток, что также соотносится со строением ворсинок слизистой кишечника [4, 21]. Экспериментально было показано, что все типы клеток органоида выполняют те же функции, что и в слизистой кишечника: каемчатые энтероциты абсорбируют питательные вещества, бокаловидные клетки образуют слизь, клетки Панета — противомикробные пептиды, а энтероэндокринные клетки — гормоны. Благодаря такому сходству с кишечником органоиды еще называют мини-кишечники (mini-guts) [4, 22, 23].

В ходе проведенных исследований под руководством Н. Clevers были определены условия получения кишечных органоидов из слизистой кишечника и их длительного культивирования:

1) органоиды могут быть получены как из крипт кишечника, так и из одиночных Lgr5⁺-стволовых клеток кишечника. Белок Lgr5 является рецептором Р-спондинов (R-spondin) и специфическим маркером стволовых

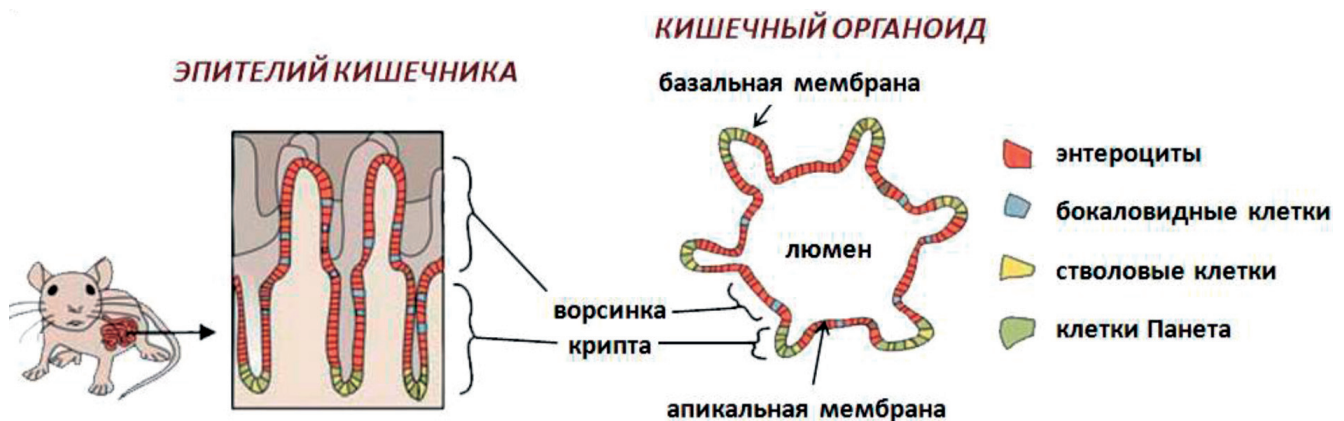


Рис. 1. Строение и клеточный состав кишечных органоидов ([34], с изменениями).

клеток кишечника и волосяных фолликулов. Клетки, не экспрессирующие белок Lgr5 или с низким уровнем экспрессии, не формируют органоиды [4]. Семейство R-спондинов включает четыре белка, наиболее изученный R-спондин-1. Взаимодействие лиганда R-спондина-1 с рецептором Lgr5 запускает Wnt/b-catenin сигнальный каскад, приводящий к пролиферации стволовых клеток кишечника как *in vivo*, так и *in vitro* [35];

2) обязательным условием получения органоидов характерной трехмерной структуры является выращивание их в 3D-матриксе. Чаще всего используют реактив «Матригель» [7, 15, 21, 36], который имитирует базальную мембрану и обогащен компонентами внеклеточного матрикса — ламинином, коллагеном IV типа, гепарансульфат-протеогликанами, TGF- β , FGF и др. При получении культур кишечных органоидов изолированные крипты смешивают с «Матригелем» и высевают на культуральный пластик [4]. После полимеризации «Матригеля» с заключенными в нем криптами, культуры помещают в питательную среду детерминированного состава. Помимо «Матригеля» для культивирования органоидов тестируют разные полимеры природного происхождения и разрабатывают синтетические [37];

3) наличие ростовых факторов в среде культивирования — это третье обязательное условие для получения культур кишечных органоидов. Помимо R-спондина-1, среда должна содержать эпидермальный фактор роста (EGF) и Noggin, который увеличивает экспрессию Lgr5 через механизм ингибирования BMP [4, 21]. При получении и культивировании органоидов толстой кишки в ростовую среду обязательно добавляют сигнальный белок Wnt-3A [5, 21, 38]. В тонком кишечнике и органоидах, полученных из тонкого кишечника, данный фактор синтезируют клетки Панета, которых нет в слизистой толстого кишечника [23]. При отсутствии ростовых факторов в среде культивирования стволовые клетки дифференцируются, и органоиды перестают расти [21].

Перечисленные условия (наличие стволовых клеток, 3D-матрикс и ростовые факторы в среде культивирования) являются ключевыми при получении органоидов любой ткани.

Помимо факторов роста для длительного (больше 6 месяцев) культивирования кишечных органоидов человека в питательной среде должны присутствовать никотинамид, ингибитор p38-киназы (SB202190) и Alk-рецептора (A8301). В отсутствии данных соединений процент дифференцированных клеток (бокаловидных и энтероэндокринных) возрастает [21]. Изменения в составе среды будут приводить к изменению соотношения разных типов клеток в органоидах. Например, в отсутствии Wnt-3A в кишечных органоидах человека уменьшается экспрессия мРНК *LGR5* (маркер стволовых клеток кишечника) и возрастает экспрессия мРНК *VIL1* (маркер энтероцитов) и *MUC2* (маркер бокаловидных клеток) [18].

Для снижения стоимости методов (анализов) с применением органоидов вместо рекомбинантных ростовых факторов чаще стали использовать обогащенные этими факторами кондиционированные среды от трансфицированных линий клеток [5, 18].

Таргетная терапия муковисцидоза

Культуры органоидов стали незаменимым инструментом для персонализированной диагностики и терапии муковисцидоза.

Муковисцидоз (МВ) — частое наследственное ауто-сомно-рецессивное летальное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR* — муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости [39]. Белок CFTR является анионным каналом (проводит ионы хлора, карбоната, а также воду), располагается на апикальной мембране эпителиальных клеток [39]. При отсутствии белка CFTR или снижении его функциональной активности происходит сгущение секрета желез внешней секреции, закупорка протоков и повреждение органа [40]. От 70 000 до 100 000 людей в мире страдают от этого тяжелого заболевания [41, 42].

Существенной проблемой для постановки диагноза и терапии МВ является аллельная гетерогенность. Известно более 2000 мутаций гена *CFTR* [43–45], которые подразделяют на 6 классов (рис. 2). Наиболее тяжелое течение болезни характерно при мутациях I–III классов — при отсутствии белка CFTR или его полной неактивности [39, 45, 46]. Наиболее распространенными являются 159 мутаций гена, которые встречаются у 96% больных МВ [43]. Чаще всего встречается мутация II класса F508del — у 70% больных МВ [47, 48]. В «Регистре больных муковисцидозом» в 2016 г в Российской Федерации числится 3049 человек. Аллельная частота мутации F508del в России составляет 52% [49].

Большая часть мутаций (около 1800) — редкие или даже уникальные, т.е. обнаружены у небольшой группы больных или даже в единственной семье.

Для постановки диагноза МВ важно знать последовательность гена и мутации, однако, при назначении схемы лечения больным МВ эти знания до последнего времени практически не учитывались [50]. Терапия МВ, главным образом, была и во многих странах, включая Россию, остается симптоматической. Она сфокусирована на подавлении бактериальных инфекций, снижении воспаления, применении заместительных панкреатических ферментов, назначении специальных диет, лечении осложнений [39, 40].

Сейчас разрабатывают новые лекарственные препараты, которые непосредственно воздействуют на патогенетические звенья МВ и обеспечивают не симптоматическое лечение, а непосредственно влияют на причину заболевания. Данные вещества оказывают действие на трансляцию белка CFTR, его транспорт и встраива-

ние в апикальную мембрану клеток, а также на кинетические характеристики (увеличивают время открытия канала). Различают потенциаторы, корректоры CFTR и ингибиторы ранней терминации. Их применение частично восстанавливает функции кишечного эпителия при ряде мутаций гена *CFTR* [39, 40, 44, 45]. Действие потенциаторов направлено на восстановление проводимости белка CFTR [40, 51, 52]. VX-770 — самый известный потенциатор (другие названия — калидеко и ивакафтор; производитель — Vertex Pharmaceuticals). Потенциаторы могут быть эффективными при мутациях всех классов, кроме первого (при которых полностью нарушена трансляция белка) (рис. 2). Помимо VX-770 фармацевтические компании разрабатывают новые соединения CFTR-потенцирующего действия — GLPG1837 (Galapagos), Q8W251 (Novartis), C-10355, C-10358 (Concert) и др. [52]. Корректоры способствуют правильному сворачиванию (фолдингу) мутантного белка CFTR и транспорту его к апикальной мембране клеток [40, 51, 52]. Корректоры могут применяться при мутациях II, V и VI классов (рис. 2). Наиболее известный корректор — VX-809 (люмакафтор), также известны и другие — VX-661, VX-325 и Corr-4a [52]. Ингибиторы ранней терминации, например, аталурен, влияют на работу рибосом и способствуют синтезу белка CFTR при мутациях гена I класса [40, 44, 45]. Однако клинические испытания аталурена в 2017 г были приостановлены, так как он оказался неэффективным при терапии МВ [53].

Эра таргетной и персонализированной (с учетом мутаций, приводящих к болезни) терапии МВ берет свое начало в 2012 году, после одобрения FDA и EMA препарата калидеко (потенциатор VX-770) для лечения больных МВ, имеющих хотя бы один аллель с мутацией III класса G551D [52]. Этому событию предшествовал скрининг более 50 000 соединений [54], многолетние исследования *in vitro* и *in vivo* [48, 51]. В 2008 и 2011 гг. были опубликованы результаты клинических исследований/испытаний, в ходе которых было показано, что применение VX-770 больными МВ с мутацией G551D значительно улучшает их состояние — наблюдается восстановление функции легких, набор веса, снижается содержание хлорида в потовой пробе и др. [55, 56].

В настоящее время препарат калидеко назначают при 38 мутациях, относящихся к разным классам [57]. Для лечения больных МВ, вызванных мутацией F508del в гомозиготном состоянии, а это 45% больных [39], была принята схема лечения препаратом, включающим потенциатор VX-770 и корректор VX-809 [52]. Данный комбинированный препарат носит название оркамби. Однако десятки тысяч пациентов все равно не могут принимать эти препараты из-за побочных эффектов. В частности, оркамби из-за побочных реакций применим менее чем у 60% больных с МВ. Комбинированный препарат симдеко (комбинация калидеко и нового препарата тезакафтор — VX-661) должен решить данную проблему, так как симдеко имеет более высокий профиль безопасности, чем оркамби, не вызывает побоч-

норма	классы мутаций					
	I	II	III	IV	V	VI
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАРУШЕНИЯ	белок не синтезируется	нарушение фолдинга	нарушение регуляции открытия канала	нарушение проводимости канала	сниженный синтез белка	снижение стабильности белка
ОСНОВНЫЕ МУТАЦИИ	Gly542X Trp128X Arg553X 621+1G → T	Phe508del Asn1303Lys Ile507del Arg560Thr	Gly551Asp Gly178Arg Gly551Ser Ser549Asn	Arg117His Arg347Pro Arg117Cys Arg334Trp	3849+10kbC→T 2789+5G→A 3120+1G→A 5T	4326delTC Gln1412X 4279insA
ТАРГЕТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ	ингибиторы ранней терминации	потенциаторы корректоры	потенциаторы	потенциаторы	потенциаторы корректоры	потенциаторы корректоры

Рис. 2. Классы мутаций гена *CFTR* и способы таргетной коррекции ([44], с изменениями).

ных респираторных проблем и не требует регулярного контроля артериального давления [58].

При остальных мутациях калидеко, оркамби и симдеко не применяют, так как неизвестно и не исследовано их влияние на течение болезни. Поскольку причиной МВ могут быть сотни различных мутаций, необходимы дальнейшие исследования влияния этих препаратов, а также других потенциаторов и корректоров на работу канала CFTR у больных МВ, особенно с редкими или уникальными мутациями гена. Следует заметить, что проведение клинических испытаний у пациентов с редкими мутациями гена *CFTR* для определения чувствительности к препаратам является дорогостоящим, а группы пациентов крайне малочисленны. Поэтому многим больным МВ с редкими или даже единичными мутациями гена *CFTR* лечение препаратами нового поколения не назначают.

Персонализированный подход к лечению МВ. Форсколиновый тест (FIS-тест)

Оценка функциональной активности канала CFTR при подборе лекарственной терапии таргетными препаратами для больных МВ может быть произведена *in vitro* на органоидах, получаемых из ректальных биоптатов кишечника пациента с использованием форсколинового теста. Главными достоинствами этого метода, разработанного несколько лет назад под руководством J.M. Beekman, являются индивидуальный (персонализированный) подход и высокая производительность [24, 26, 38].

Принцип метода основан на прямой активации форсколином фермента аденилатциклазы в эпителиальных клетках. Образующийся цАМФ стимулирует протеинкиназу A, которая, в свою очередь, фосфорилирует регуляторный домен канала CFTR и вызывает его открытие. Активация CFTR приводит к секреции жидкости и ионов в люмен органоидов и к их быстрому набуханию (поэтому тест еще называют FIS — «*Forskolin-Induced Swelling*», форсколин-индуцированное набухание) [38]. На этапе разработки FIS-теста с использованием кишечных органоидов мыши авторы доказали, что набухание органоидов при действии форсколина связано толь-

ко с работой канала CFTR. Было показано, что ингибиторы канала CFTR ($CFTR_{inh}$ -172 или GlyH-101) и нокаут гена *Cfr* предотвращают форсколин-индуцированное набухание органоидов, в отличие от органоидов с функционально-активным белком CFTR [5].

Массовое культивирование кишечных органоидов — один из основных этапов для персонализированной терапии МВ. Эта методика была отработана в 2013 г. под руководством J.M. Beekman на базе наработок голландских коллег из лаборатории H. Clevers [4, 21, 38].

Культуры кишечных (ректальных) органоидов могут быть получены от любого человека, в том числе от больных МВ. Следует заметить, что получение биоптатов — для изоляции крипт и дальнейшего наращивания культур кишечных органоидов — сопряжено с минимальным для человека дискомфортом. В Нидерландах с 2011 г для постановки диагноза МВ новорожденным используют метод измерения кишечных потенциалов с получением ректальных биоптатов, которые в настоящее время применяют для выделения культур кишечных органоидов [25].

На рис. 3 показана схема получения культур кишечных органоидов из ректальных биоптатов. Фрагменты слизистой кишечника обрабатывают дезинтегрирующими веществами и получают изолированные крипты. Затем крипты погружают в «Матригель» и высевают на культуральные планшеты в среду детерминированного состава (содержащую ростовые факторы Wnt-3A, Noggin, R-Spondin и EGF). Вскоре после посева крипты замыкаются, стволовые клетки пролиферируют, происходит разрастание органоидов и их почкование. Примерно через неделю выросшие органоиды механически разделяют и пересаживают на новые планшеты. На всех этапах культивирования органоидов проводят в толще «Матригеля» в среде с ростовыми факторами [5, 36, 38]. Таким образом культуры кишечных органоидов могут поддерживать годами [22]. После получения стабильной линии кишечные органоиды используют для оценки активности канала CFTR методом FIS-теста.

Полученные от больных МВ культуры кишечных органоидов обязательно наращивают, замораживают и хранят в криобанках, для использования в случае необходимости

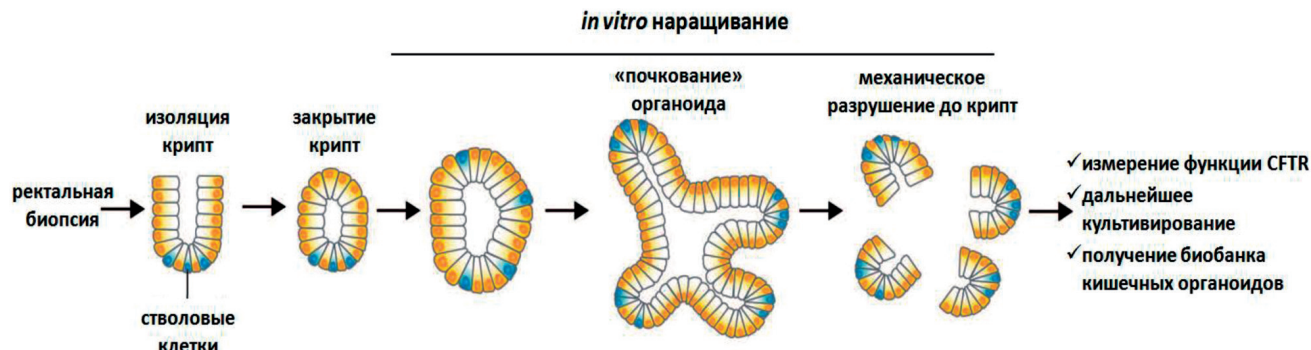


Рис. 3. Схема получения культур кишечных органоидов из ректальных биоптатов [26, с изменениями].

(например, при утрате первичной культуры), без дополнительного причинения дискомфорта пациенту [24, 38].

Форсколиновый тест включает в себя следующие этапы (рис. 4 А):

1) кишечные органоиды, полученные из биоптатов тканей пациента, высевают на 96-луночные планшеты для высокопроизводительного скрининга;

2) через 24 часа после посева, органоиды окрашивают флуоресцентным красителем Кальцеином (Calcein green) в течении часа для их визуализации;

3) затем обрабатывают форсколином и одновременно проводят съемку на микроскопе для регистрации ответа кишечных органоидов на стимуляцию;

4) проводят количественный анализ набухания органоидов с использованием специализированного программного обеспечения [38].

После разработки форсколинового теста с его помощью исследовали остаточную функцию канала CFTR у больных МВ. В исследовании J. Dekkers с коллегами [36] было показано, что форсколин-индуцированное набухание кишечных органоидов полностью коррелирует с остаточной функцией ионного канала CFTR, а результаты FIS-теста соотносятся с другими *in vivo* и *ex vivo* маркерами функциональной активности CFTR — с кон-

центрацией ионов хлора в потовой пробе и с измерениями кишечных потенциалов. Например, кишечные органоиды от больных МВ с частой мутацией F508del практически не отвечают на стимуляцию форсколином (рис. 4 Б). Иммунофлуоресцентное окрашивание также показало, что белок CFTR при данной мутации практически не синтезируется [36].

Форсколиновый тест настолько чувствителен, что позволяет исследовать активность канала CFTR при любых мутациях гена, относящихся к разным классам и вызывающих разную степень утраты функции канала. Чем выше остаточная функция канала, тем сильнее ответ на стимуляцию форсколином, т.е. набухание органоидов [5, 36].

С использованием FIS-теста на кишечных органоидах, полученных от больных МВ, может быть оценена функциональная активность канала CFTR после действия модуляторами (потенциаторами, корректорами). По скорости и степени набухания органоидов количественно оценивают влияние модуляторов на активность канала CFTR, т.е. их терапевтический эффект [24]. Корректоры добавляют к кишечным органоидам на этапе посева, а потенциаторы — за час до обработки форсколином (рис. 4 А).

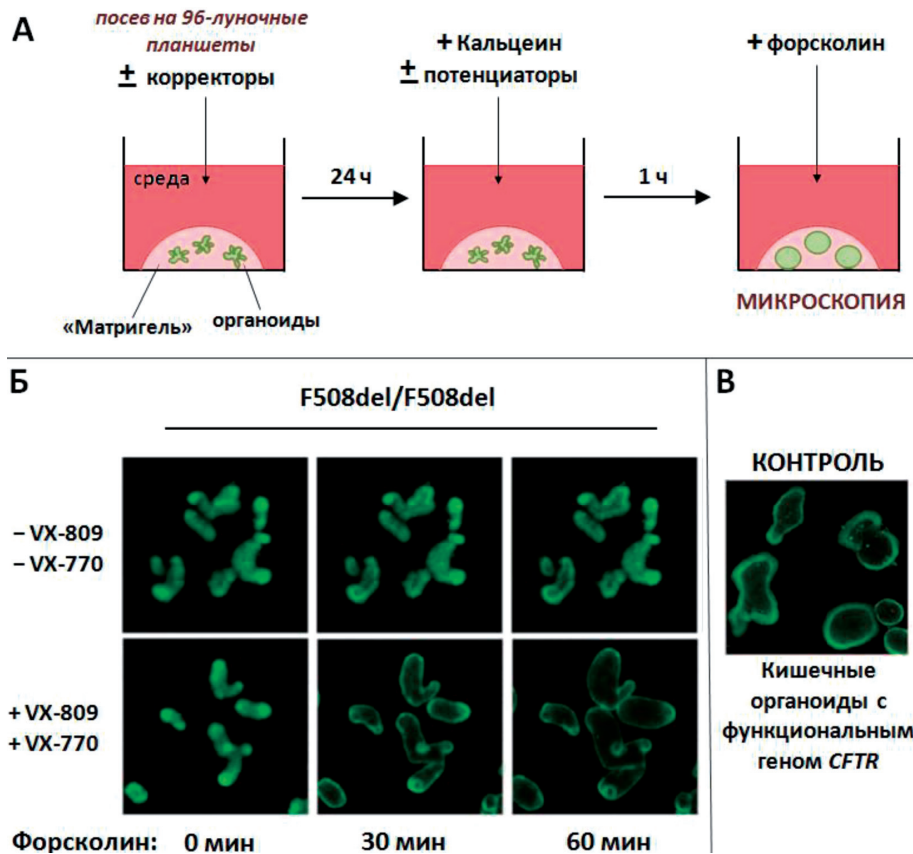


Рис. 4. Анализ функциональной активности канала CFTR на культурах кишечных органоидов:

А — этапы форсколинового теста; Б — коррекция работы канала CFTR в кишечных органоидах с мутацией F508del/F508del; В — интактные кишечные органоиды, полученные от здоровых людей. Б и В — органоиды прижизненно окрашены Кальцеином ([26, 36], с изменениями).

В работе J. Dekkers с соавторами [36] на культурах кишечных органоидов, полученных от 71 пациента с 28 различными генотипами *CFTR*, было проведено обширное исследование влияния потенциатора VX-770 и корректора VX-809 на функцию канала *CFTR*. Например, у органоидов с гомозиготной мутацией F508del при аппликации только VX-770 (калидеко) или только VX-809 наблюдали незначительное улучшение функционального состояния канала, однако при их совместном воздействии (оркамби) происходило практически полное восстановление его активности (рис. 4 Б) [36].

Полученные результаты *in vitro* по восстановлению модуляторами работы канала *CFTR* при ряде мутаций гена коррелировали с результатами клинических испытаний по улучшению состояния больных МВ, вызванного теми же самыми мутациями. Таким образом, форсколиновый тест позволяет исследовать влияние модуляторов на активность канала, и, в конечном счете, сделать вывод об их эффективности для персонализированной терапии пациентов, в том числе с редкими мутациями гена *CFTR* [25, 36]. В течение короткого времени данная научная разработка нашла применение в клинике — в начале 2015 года пациенту с МВ из Нидерландов было назначено лечение препаратом калидеко на основе результатов тестирования эффективности лекарственного средства с использованием кишечных органоидов, полученных из собственной ткани пациента. Следует заметить, что мутация, вызвавшая болезнь, была уникальной и встречалась только в этой семье [59].

Сейчас в Нидерландах при помощи FIS-теста исследуют терапевтические эффекты потенциаторов и корректоров у носителей редких мутаций гена *CFTR*. На основе полученных результатов может быть назначена схема лечения оркамби или калидеко, а обнаруженные новые мутации с ответом на эти препараты дополнительно вносят в список мутаций, при которых показано применение оркамби и калидеко.

Кроме оценки остаточной активности *CFTR*, с использованием форсколинового теста можно проводить высокопроизводительный скрининг новых соединений и потенциальных лекарственных препаратов, эффективных при МВ. Рассматривается возможность применения FIS-теста для персонализированного исследования фармакокинетики и фармакодинамики калидеко и оркамби [60].

В работе J. Dekkers с соавторами [36] был описан метод оценки активности *CFTR* на кишечных органоидах без стимуляции форсколином. Метод основан на измерении стабильной области люмена кишечных органоидов (SLA «Steady-state Lumen Area») по отношению к общему размеру органоида. Разработка этого подхода обусловлена недостатком FIS-теста, который заключается в сложности сравнения функции канала *CFTR* у больных МВ и здоровых людей, т.к. у здоровых людей, благодаря нормальной проводимости *CFTR*, кишечные органоиды часто имеют сферическую форму и при воздей-

ствии форсколина лишь незначительно увеличиваются в размерах или лопаются (рис. 4 В). Кишечные органоиды с нарушенной работой *CFTR* характеризуются меньшим размером люмена (рис. 4 Б). Оказалось, что стабильная область люмена (просвета) кишечных органоидов, полученных от здоровых людей, составляет 35–70% от общего размера органоида, а при мутациях гена *CFTR* — от 0 до 10%. По изменению значения SLA кишечных органоидов в присутствии модуляторов *CFTR* оценивают их терапевтический эффект. По сравнению с FIS-тестом метод SLA является менее чувствительным и его реже применяют.

Заключение

Таким образом, в настоящее время получаемые *in vitro* культуры органоидов являются модельными системами, наиболее соответствующими объектам *in vivo*. Разработка метода получения культур кишечных органоидов стала началом персонализированной диагностики и терапии МВ. Форсколиновый и SLA тесты на культурах кишечных органоидов позволяют подбирать оптимальные схемы лечения современными модуляторами ионного канала *CFTR* с учетом индивидуальных особенностей пациентов, больных МВ [25]. С использованием данных методов тестируют новые соединения — потенциальные препараты для лечения МВ. В России новаторский метод персонализированной оценки остаточной функции канала *CFTR* FIS-тестом на культурах кишечных органоидов пока не используют, терапия больных МВ остается, главным образом, симптоматической, и таргетные препараты (калидеко, оркамби) пока назначают в единичных случаях.

Список литературы

1. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501(7467):373-379.
2. Jo J, Xiao Y, Sun AX, et al. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons. *Cell Stem Cell*. 2016;19(2):248-257.
3. Lugli N, Kamileri I, Keogh A, et al. R-spondin 1 and noggin facilitate expansion of resident stem cells from non-damaged gallbladders. *EMBO Rep*. 2016;17(5):769-779.
4. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009;459(7244):262-265.
5. Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, et al. A functional *CFTR* assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med*. 2013;19(7):939-945.
6. Shibata W, Sue S, Tsumura S, et al. Helicobacter-induced gastric inflammation alters the properties of gastric tissue stem/progenitor cells. *BMC Gastroenterol*. 2017;17(1).
7. Hohwieler M, Illing A, Hermann PC, et al. Human pluripotent stem cell-derived acinar/ductal organoids generate human pancreas upon orthotopic transplantation and allow disease modelling. *Gut*. 2017;66(3):473-486.

8. Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*. 2015;526(7574):564-568.
9. Garreta E, Gonzalez F, Montserrat N. Studying kidney disease using tissue and genome engineering in human pluripotent stem cells. *Nephron*. 2018;138(1):48-59.
10. Fujii M, Shimokawa M, Date S, et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis. *Cell Stem Cell*. 2016;18(6):827-838.
11. Buzzelli JN, Ouaret D, Brown G, et al. Colorectal cancer liver metastases organoids retain characteristics of original tumor and acquire chemotherapy resistance. *Stem Cell Res*. 2018;27:109-120.
12. Boehnke K, Iversen PW, Schumacher D, et al. Assay establishment and validation of a high-throughput screening platform for three-dimensional patient-derived colon cancer organoid cultures. *J Biomol Screen*. 2016;21(9):931-941.
13. Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, et al. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov*. 2017;7(5):462-477.
14. Hill DR, Huang S, Nagy MS, et al. Bacterial colonization stimulates a complex physiological response in the immature human intestinal epithelium. *Elife*. 2017;6.
15. Ley S, Galuba O, Salathe A, et al. Screening of intestinal crypt organoids: a simple readout for complex biology. *SLAS Discov*. 2017;22(5):571-582.
16. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. 2013;13(6):653-658.
17. Cocola C, Molgora S, Piscitelli E, et al. FGF2 and EGF are required for self-renewal and organoid formation of canine normal and tumor breast stem cells. *J Cell Biochem*. 2017;118(3):570-584.
18. Takahashi Y, Sato S, Kurashima Y, et al. A refined culture system for human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial organoids. *Stem Cell Reports*. 2018;10(1):314-328.
19. Hohwieler M, Perkhofer L, Liebau S, et al. Stem cell-derived organoids to model gastrointestinal facets of cystic fibrosis. *United European Gastroenterol J*. 2017;5(5):609-624.
20. Balimane PV, Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov Today*. 2005;10(5):335-343.
21. Sato T, Stange DE, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1762-1772.
22. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*. 2013;340(6137):1190-1194.
23. Meneses AM, Schneeberger K, Kruitwagen HS, et al. Intestinal organoids — current and future applications. *Vet Sci*. 2016;3(4).
24. Beekman JM. Individualized medicine using intestinal responses to CFTR potentiators and correctors. *Pediatr Pulmonol*. 2016;51(S44):S23-S34.
25. Noordhoek J, Gulmans V, van der Ent K, et al. Intestinal organoids and personalized medicine in cystic fibrosis: a successful patient-oriented research collaboration. *Curr Opin Pulm Med*. 2016;22(6):610-616.
26. Dekkers JF, van der Ent CK, Beekman JM. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Dis*. 2013;1(e27112).
27. Matsuzawa-Ishimoto Y, Shono Y, Gomez LE, et al. Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *J Exp Med*. 2017;214(12):3687-3705.
28. Watson CL, Mahe MM, Munera J, et al. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med*. 2014;20(11):1310-1314.
29. Смирнихина СА, Банников АВ, Лавров АВ. Оптимизация условий трансфекции клеточной культуры CFTE290- для разработки редактирования мутации F508del в гене *CFTR*. Медицинская генетика. 2016;8:36-39.
30. Смирнихина СА, Банников АВ, Анучина АА и др. Факторы, влияющие на эффективность CRISPR/Cas9 для коррекции мутации F508del при муковисцидозе. Медицинская генетика. 2017;11:32-37.
31. Okkelman IA, Foley T, Papkovsky DB, et al. Multi-parametric imaging of hypoxia and cell cycle in intestinal organoid culture. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1035:85-103.
32. Kraiczky J, Nayak KM, Howell KJ, et al. DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development. *Gut*. 2017;0:1-13.
33. Thalheim T, Quaas M, Herberg M, et al. Linking stem cell function and growth pattern of intestinal organoids. *Dev Biol*. 2018;433(2):254-261.
34. Bartfeld S, Clevers H. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med (Berl)*. 2017;95(7):729-738.
35. Carmon KS, Gong X, Lin Q, et al. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(28):11452-11457.
36. Dekkers JF, Berkens G, Kruisselbrink E, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med*. 2016;8(344):344ra384.
37. Cruz-Acuna R, Quiros M, Farkas AE, et al. Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair. *Nat Cell Biol*. 2017;19(11):1326-1335.
38. Boj SF, Vonk AM, Statia M, et al. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: an in vitro assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. *J Vis Exp*. 2017;120.
39. Муковисцидоз (ред. Капранов НИ, Каширская НЮ). М: Медпрактика-М, 2014:672 с.
40. Quon BS, Rowe SM. New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ*. 2016;352(i859).
41. Hurley MN, McKeever TM, Prayle AP, et al. Rate of improvement of CF life expectancy exceeds that of general population—observational death registration study. *J Cyst Fibros*. 2014;13(4):410-415.
42. <https://www.healthline.com/health/cystic-fibrosis-facts>
43. Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet*. 2013;45(10):1160-1167.
44. Quintana-Gallego E, Delgado-Pecellin I, Calero Acuna C. CFTR protein repair therapy in cystic fibrosis. *Arch Bronconeumol*. 2014;50(4):146-150.
45. Петрова НВ, Кондратьева ЕИ, Красовский СА и др. Проект национального консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» Раздел «Генетика муковисцидоза. Молекулярно-генетическая диагностика при муковисцидозе». Медицинская генетика. 2016;15(11):29-45.
46. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993;73(7):1251-1254.
47. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet*. 1995;29:777-807.
48. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(44):18825-18830.
49. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2016 год. (ред. Красовский СА, Черняк АВ, Воронкова

АЮ, Амелина ЕЛ, Каширская НЮ, Кондратьева ЕИ, Гембицкая ТЕ). М: Медпрактика-М, 2018:64 с.

50. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006;61(7):627-635.

51. Van Goor F, Straley KS, Cao D, et al. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(6):L1117-1130.

52. Maiuri L, Raia V, Kroemer G. Strategies for the etiological therapy of cystic fibrosis. *Cell Death Differ*. 2017;24(11):1825-1844.

53. Zainal Abidin N, Haq IJ, Gardner AI, et al. Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Expert Opin Pharmacother*. 2017;18(13):1363-1371.

54. Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, et al. Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2564-2571.

55. Accurso FJ, Rowe SM, Durie PR, et al. Interim results of Phase IIa study of VX-770 to evaluate safety, pharmacokinetics and biomarkers of CFTR activity in cystic fibrosis subjects with G551D. *Pediatr Pulmonol*. 2008;Suppl 31:267-295.

56. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1663-1672.

57. <https://www.cff.org/Life-With-CF/Treatments-and-Therapies/CFTR-Modulator-Therapies/>

58. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2013-2023.

59. Saini A. Cystic fibrosis patients benefit from mini guts. *Cell Stem Cell*. 2016;19:425-427.

60. Dekkers R, Vijftigchild LA, Vonk AM, et al. A bioassay using intestinal organoids to measure CFTR modulators in human plasma. *J Cyst Fibros*. 2015;14(2):178-181.