

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет біології географії та екології
Кафедра біології людини та імунології

ВИВЧЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ОРГАНОТИПОВИХ
КУЛЬТУР

Кваліфікаційна робота (проект)

На здобуття ступеня вищої освіти “бакалавр”

Виконала: здобувачка 4 курсу 411 групи

Спеціальності 091 Біологія

Освітньо-професійної програми Біологія

Панченко Неля Володимирівна

Керівник: доц. Шкуропат А.В.

Рецензент: доц. Головченко І.В.

ЗМІСТ

	ВСТУП.....	3
	РОЗДІЛ 1. Огляд досліджень із використанням органотипових культур	5
	1.1 Органотипові моделі захворювань, пов'язаних зі старінням: шкіра, як об'єкт дослідження.....	6
	1.2 Органотипові культури як моделі захворювань, пов'язаних зі старінням: кишківник	9
	1.3 Органотипові культури як моделі захворювань, пов'язаних зі старінням: скелетний м'яз.....	12
	1.4 Тривимірні органотипові культуральні моделі Слизової оболонки порожнини рота in vitro.....	13
	1.5 Моделювання запалення та окислювального стресу при розвитку захворювань шлунково-кишкового тракту з використанням нових органотипових культуральних систем.....	17
	РОЗДІЛ 2. Методика роботи з органотиповими культурами	19
	2.1 Органотипові культури зрізів тканин	19
	2.2 Оптимальні параметри факторів впливу	21
	2.3 Вимоги до субстрату та матриці органотипічних моделей..	22
	РОЗДІЛ 3. Детальний огляд дослідження моделювання запалення та окислювального стресу при розвитку захворювань шлунково-кишкового тракту з використанням органотипових систем	26
	ВИСНОВКИ.....	31
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	33

ВСТУП

Актуальність теми. Актуальність даної проблематики полягає в розробці нових підходів та удосконалення вже існуючих систем культивування клітин та тканин.

Культури клітин та органотипові моделі являють собою модельні системи, які використовують для досягнення різних важливих цілей. Наприклад, розробку фармакологічних препаратів, тестування яких відбувається не на цілому організмі (наприклад миші), а на моделі тканин; вивчення патологічних процесів, вивчення способів лікування, вирощування тканин та органів для трансплантації [90].

Органоїди отримують зі стовбурових клітин або клітин-попередників і створюють мініатюрні органоподібні структури, які відтворюють головні аспекти тривимірної анатомії та багатоклітинний репертуар фізіологічного аналога. Вони повторюють основні функції тканини та мають іще багато важливих характеристик (наприклад, спектр мутацій і експресія генів).

Метою виконання цієї наукової роботи є огляд та аналіз досліджень із використанням органотипових культур, опис методики роботи із даними системами та основні етапи при їх культивуванні.

Для досягнення мети необхідно вирішити такі **завдання**:

- 1) проаналізувати дослідження та основні досягнення в роботі з органотиповими культурами за останні роки;
- 2) описати методику ведення та культивування органотипової культури;
- 3) визначити проблеми і перспективи розвитку культури тканин.

Об'єкт дослідження – органотипові культури.

Предмет – біохімічні показники органотипових культур.

У ході дослідження використано такі **методи**:

- 1) *Описовий метод* використовувався в ході огляду методик культивування органотипових систем;
- 2) *біотехнологічні методи культивування біооб'єктів*;
- 3) аналітичний метод використовувався в ході аналізу досліджень , які включали в себе роботу з органотиповими культурами.

Практичне значення. Культивування тканин *in vitro* використовується для вивчення розвитку багатьох організмів та вплив на тканини і органи тих чи інших речовин. Наприклад, стегнова кістка [74], зачатки пір'я [43] і кінцівки курки були вивчені за допомогою методів культивування тканин, так само як і насінники миші [78] та коріння та стебла рослин [69].

Об'єм та структура роботи. Робота викладена на 27 сторінках. Складається зі вступу, двох розділів, висновків, списку використаних джерел (90 найменувань).

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ДОСЛІДЖЕНЬ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ОРГАНОТИПОВИХ КУЛЬТУР

Органотипові культури – це культури, які повторюють складне клітинне середовище тканини з якої походять, включаючи паренхімні та стромальні компоненти.

Методи органотипових культур дають вченим змогу контролювати розвиток тканин на високому рівні. Наприклад, вони можуть коливати температуру та змінювати доступність поживних речовин. Ізоляція тканини від цілого ембріона також робить її менш сприйнятливою до смертельного впливу хімічних речовин, що дозволяє проводити дослідження у глобальному масштабі з більш високими концентраціями тих чи інших речовин.

Органоїди отримують зі стовбурових клітин або клітин-попередників і створюють маленькі органоподібні структури, які відтворюють головні властивості тривимірної анатомії та багатоклітинний аналог певного органу, що повторюють основні функції на рівні тканини та багато важливих характеристик (наприклад, спектр мутацій і експресія генів).

Збереження сталого клітинного середовища тканини дає можливість вивчати взаємодію між різними типами тканин, так як розташування тканин залишається відносно незмінним [2].

Переваги культури тканинних органоїдів :

- розширюваність зі стовбурових клітин, отриманих з органів і первинних тканин,
- можливість генетичного маніпулювання [10],
- довготривале зберігання та можливість ксенотрансплантації в моделі тварин.

- 3D-моделі точніше відтворюють структуру, функції та експресію генів і білків, що лежать в основі природних тканин слизової оболонки.
- Відсутність екстраполяції видів;
- покращену відтворюваність та уникнення етичних проблем, пов'язаних із використанням лабораторних тварин.

Важливо, що ці культури зберігають фізіологічну архітектуру пухлини/органу та взаємодію клітина-клітина та клітина-stroma [88].

Інші переваги живих органотипічних культур включають їх метаболічну активність, яка впливає на проникність деяких лікарських засобів [61], а також їх потенціал для дослідження подразнення, токсичності та диференціювання кератиноцитів [70].

1.1 Органотипові моделі захворювань, пов'язаних зі старінням: шкіра, як об'єкт дослідження.

Дослідження [77] показало, що органотипові культури зарекомендували себе як моделі при вивченні процесів пов'язаних зі старінням. А саме зміни, які відбуваються в клітинах різних тканин під час цього процесу, та як можна на них вплинути, висвітлюючи приклади, які пов'язані зі старінням і супутніми захворюваннями, а також приклади моделей, які його стосуються. Особливо виділено прогрес, досягнутий у дослідженні шкіри, кишківника та скелетних м'язів, і описано, як нещодавно продемонстровані моделі органотипових культур використовувалися для досліджень старіння або подібних фенотипів [77].

Старіння залишається головним фактором ризику багатьох захворювань, у тому числі основних причин смерті. Також пов'язані з

ним захворювання за своєю суттю є багатофакторними, з численними сприяючими факторами та фенотипами на молекулярному, клітинному, тканинному та організмовому рівнях.

Органотипічними називають моделі, які імітують неоднорідний клітинний склад і організацію нативної тканини, до якої входять моделі як *ex vivo*, так і *in vitro*. Ключові приклади органотипічних моделей *in vitro* включають органоїди, органи на чіпі, органотипічні зрізи тканини та тканинно-інженерні органотипічні моделі. Дані моделі органоїдів побудовані за допомогою ряду різних вихідних матеріалів, включаючи фрагменти тканин і експланти, відновлені первинні клітини та стовбурові клітини [39].

У кожному розділі даної статті описано переваги (та обмеження) органотипічних моделей у з'ясуванні механізмів старіння на клітинному та тканинному рівнях, а також виділено ключові методологічні фактори та фактори доступності.

Через старіння функції шкіри та здатність до загоєння знижуються [28]. Старіння шкіри часто поділяють на два пов'язані процеси: внутрішнє та зовнішнє старіння. Внутрішнє, або хронологічне включає генетичні та гормональні зміни та прогресування від клітинної зрілості до клітинного старіння.

- Зовнішнє старіння (старіння навколишнього середовища) являє собою вплив навколишнього середовища, включаючи
- куріння сигарет [87];
- забруднення різного характеру ;
- Вплив хімічних речовин;
- Травми [36].

Структурні зміни внутрішньої старої шкіри включають:

- зниження дермальної васкулатури [14];

- зміни еластичності шкіри та посилення дезорганізації колагену;
- накопичення кінцевих продуктів глікації (AGEs) [25] ;
- зміни концентрації/організації глікозаміноглікану (GAG) і протеоглікану (PG), що сприяє зміцненню дермальної структури та слабкості, а також зниженню гідратації [66] ;
- дисбаланс тканинних інгібіторів і матриксних металопротеїназ (ММР), що призводить до дисбалансу між відкладенням і розпадом колагену;
- сплюснення дермального епідермального з'єднання/втрата сіткових хребтів.

Старіння також сприяє змінам товщини епідермісу та шкіри і зменшенню об'єму підшкірного жиру.

У віковій шкірі бар'єрну функцію було досліджено в контексті зменшення філагрину , підвищення рН (від 5 до ~5,6) [36], присутність або відсутність ліпідів та зміни у структурі ороговілої оболонки . Ці зміни посилюють ламкість старої шкіри та збільшують шанси на інфікування [11] . Але на даний момент не є до кінця з'ясовано, як саме відбуваються ці зміни та які механізми ними керують [59].

Дослідники використовували органотипові моделі для вивчення біології шкіри з 1980-х років , і в наш час така методологія стає все більш доступною. OSC також зазвичай називають еквівалентами шкіри людини (HSE) або моделями повної товщини шкіри; вони, як правило, мають дермальний і правильно стратифікований епідермальний шар [4] .

Ці моделі проявили себе дуже корисними у напрямку вивчення розвитку шкіри, оцінки цитотоксичності, вивчення загоєння ран, а з недавніх пір іще й як моделі захворювань і старіння. OSC дуже легко налаштовуються та дозволяють контролювати органотипові клітинні популяції, генотипи та умови культивування. Вони використовуються

для глибоких досліджень старіння без небезпеки випробувань на людях або на тваринах; з довготривалою стабільністю культури для послідовних досліджень (типова тривалість культури 8–12 тижнів) [22].

Моделі OSC корисні для тестування потенційних терапевтичних методів для виснажливих шкірних захворювань або травм . OSC моделі шкіри з хворобами включають : псоріаз [3], рецесивний дистрофічний бульозний епідермоліз [31] , пластинчастий іхтіоз , синдром Нетертона , вроджену пахіоніхію , бульозний епідермоліз [56] і фіброз .

Обмеження. Найбільш ключовим обмеженням використання тканинно-інженерних органотипічних моделей є те, що вони зазвичай не збігаються з усіма клітинними популяціями, знайденими *in vivo*. Нерви, потові залози, стовбурові клітини, імунні клітини, підшкірна жирова тканина та судинна система є важливими аспектами біології старіння шкіри, які часто відсутні в OSC [6].

Іще одним важливим обмеженням сучасних OSC є втрата системних факторів, присутніх *in vivo* . Наприклад, вікові зміни в профілях статевих гормонів впливають на фізіологію шкіри; зниження вмісту колагену в постменопаузі, зниження еластичності та зниження вологості шкіри у жінок.

1.2 Органотипові моделі захворювань, пов'язаних зі старінням: кишківник

Тонка кишка є основним органом для всмоктування поживних речовин з їжі, тоді як товста кишка є основним органом для реабсорбції води . В даному розділі статті більшу частину досліджень зосереджено на тонкій кишці через більшу кількість тривимірних моделей *in vitro* , але також коротко обговорюються моделі товстої кишки [8].

Старіння в кишечнику проявляється у вигляді зменшення споживання поживних речовин, толерантності резидентної мікробіоти та відповіді на інфекцію. Часто вони супроводжуються зневодненням і недоїданням. Загалом споживання макроелементів і мікроелементів у людей похилого віку є нижчим, хоча це нижче споживання можна пояснити нижчою фізичною активністю, проблемами із зубами, порушенням смаку та нюху, психологічними факторами, рівнем доходу та побічними ефектами ліків [21,57]. В решті, зменшене споживання поживних речовин, зневоднення та недоїдання сприяють загальному погіршенню здоров'я та захворюваності у людей похилого віку [21].

Існує кілька обмежень щодо традиційних моделей кишківника, які можна вирішити за допомогою тривимірних органотипових моделей кишківника. 2D-культури на культуральних вставках часто використовуються для моделювання кишківника, але ці культури стають нестабільними через 4 тижні через клітинний ріст і утворення багатоклітинних шарів [12]. Для вивчення кишкових бактеріальних патогенів дослідники часто використовували експлантати тканин людини, моделі тварин [73], 2D культури з клітинними лініями, такими як T84 і HT-29, які імітують келихоподібні клітини, і Caco-2, які служать ентероцитами. Незважаючи на те, що ці моделі корисні для розуміння реакції мікробіома-господаря, вони не завжди співпадають з анатомією та фізіологією кишківника людини.

Для більш ефективних досліджень було створено кілька 3D-моделей на основі органоїдів, культур експлантатів, мікрорідинних чіпів і органотипових моделей кишківника (OGM), створених шляхом самоскладання та часткового формування ворсинок. Дані моделі диференційованих кишкових органоїдів можуть включати навіть рідкісні клітини моделей кишківника, включаючи ентероендокринні,

пучки, М-клітини та клітини Панета, хоча й дещо обмежують відповідний людський масштаб [71].

OGM (органотипові моделі кишечника) були створені за допомогою стовбурових клітин кишечника дорослої людини [71], iPSC [71], Caco-2 [12], T84 [71], HT-29 [20] та міофібробластів [12]. OGM розроблені лише нещодавно, але вони мають переваги перед двовимірними моделями, мікрофлюїдними чіпами, культурами експлантів і органоїдними структурами через їх здатність імітувати відповідні масштаби довжини тканини для дифузії кисню та настроюваних властивостей клітин і матеріалів.

Включення тривимірних ворсинок в OGM більш точно моделює справжню систему людини [93] і допомагає зрозуміти зміни в крипти/ворсинках, які спостерігаються у літніх тварин. Для створення 3D-структур колагенових ворсинок кілька груп дослідників використовували відносно жорсткий колаген і метод зворотного формування альгінату для створення структур ворсинок з колагенового гідрогелю [93]. Ю та його колеги створили поверхню, схожу на базальну мембрану, покривши колаген ламініном. Структури ворсинок були виготовлені відповідно до щільності та глибини ворсинок людини, а моделі культивувалися протягом 14 днів; 21-денна тривалість призвела до розпаду ворсинок.

Ці моделі фіксують відповідну мікроанатомію кишкової поверхні та мають потенціал для з'ясування відповідної ролі структурних і клітинних змін у старінні.

Спираючись на ці методи та враховуючи типи людських клітин, анатомію та фізіологію, можна розробити людську органотипову модель кишківника [12] і уникнути дорогих процедур, пов'язаних із колоніями тварин.

Як і у випадку з OSC та іншими органотипічними моделями, найбільш помітним обмеженням є відсутність клітинних популяцій та структурних особливостей кишечника *in vivo*. Організація кишківника, особливо крипт і ворсинок, впливає на функцію та захворювання; ці ознаки не повністю відображені в органотипічних моделях.

Хоча органотипові моделі кишечника можуть бути придатними для вирішення деяких питань бактеріальної транслокації, жодна з них не досягла масштабу або складності, необхідних для включення лімфатичних шляхів [4].

1.3 Органотипові культури як моделі захворювань, пов'язаних зі старінням: скелетний м'яз.

Скелетні м'язи — це велика тканина, яка становить ~30–40% маси тіла. Пов'язана з віком втрата м'язової маси, відома як саркопенія, є основною ознакою старіння людини [23,24,62] зі складною етіологією, що призводить до м'язової, судинної та метаболічної недостатності.

Структурні клітинні зміни у старих м'язах:

- зменшення площі поперечного перерізу м'язів [47,55];
- потовщення шарів сполучної тканини епімізію та ендомізію [55,89];

- посилення фіброзу тканини [8,58];

- зменшення капіляризації.

Клітинні зміни включають :

- збільшення жирової інфільтрації в м'язи;
- втрату рухових одиниць ;
- зниження генерації сили скелетних м'язів.

Крім того, пов'язані з віком зміни в популяціях сателітних клітин скелетних м'язів включають зменшення пулу клітин-попередників,

обмежене утворення міогенних колоній , втрату ампліфікації та потенціалу диференціювання міоволокон , а також підвищена сприйнятливість до старіння та апоптозу .

Найперші сконструйовані конструкції, які називаються біоштучними м'язами (ВАМ), складаються зі скелетних міобластів, інкапсульованих у ЕСМ. ЕСМ формується навколо штучних «сухожиль» або штифтів, відповідальних за підтримку пасивного натягу всередині тканини. Коли міобласти диференціюються в м'язові трубки з високою скорочувальною здатністю, клітини вирівнюються вздовж осі натягу та відриваються від культурального субстрату. Міобласти на різних стадіях розвитку зазвичай отримують з біопсії м'язів таких організмів, як птах [13,72], миша [13,19], щур [54] і людина [19,81].

Моделі ВАМ використовувалися для дослідження фізіологічних подій, таких як гіпертрофія та атрофія у відповідь на ліки та фізичні вправи, пошкодження та регенерація скелетних м'язів [51] Херсон – Івано-Франківськ - 2023, виробництво сили, передача сигналів клітинами, і відповідь на ліки [17]. Оскільки різні джерела м'язових клітин мають різні витрати та переваги, різні популяції клітин можна легко замінити в моделях ВАМ відповідно до конкретних потреб дослідження.

Для скелетних м'язів, як і в інших органотипових моделях, також є проблемою виключення типів клітин, присутніх *in vivo* . Наприклад, звичайні старіючі фенотипи запалення, знижена периферична васкуляризація та жирова інфільтрація вимагають включення імунних клітин, ендотеліальних клітин і адипоцитів. Окрім пошуку та підтримки цих клітин, спільне культивування з м'язовими клітинами створює додаткові проблеми через їхню високу метаболічну потребу та скорочувальну здатність.

1.4 Тривимірні органотипові культуральні моделі слизової оболонки порожнини рота *in vitro*

Тривимірні органотипові моделі слизової оболонки порожнини рота були розроблені для вивчення різноманітних явищ, що відбуваються в ротовій порожнині. Вони можуть бути застосовані для визначення того, чи можлива вірусна інфекція слизової оболонки порожнини рота та чи має така інфекція наслідки у зв'язку з поточною пандемією COVID-19.

Метою даного дослідження є огляд комерційно доступних моделей слизової оболонки щік і ясен людини та висвітлення їх використання для кращого розуміння широкого спектру явищ, що впливають на тканини ротової порожнини.

Перевага моделей органотипічної тканини пов'язана з шляхом впливу досліджуваних матеріалів та/або ксенобіотиків.

Тривимірні моделі тканин порожнини рота та ясен культивують на межі повітря-рідина (ALI) у вставках для культур клітин (наприклад, Millicell™ або Transwell™) з дном мікропористої мембрани. У культурі ALI клітини висівають у вставки, і після періоду зануреного культивування культуральне середовище видаляють з поверхні апікальної культури [51]. У ALI клітини подаються виключно через мікропористу мембрану під зростаючою тканиною, а апікальна поверхня цієї тканини піддається впливу атмосфери всередині інкубатора. Таким чином, культура в ALI дозволяє клінічно значущу експозицію досліджуваних виробів або ксенобіотиків, оскільки ці матеріали можна наносити безпосередньо на поверхню апікальної тканини.

Слизову оболонку ротової порожнини людини можна розділити на три категорії:

1. Вистилаюча (щічна, під'язикова тканини, тканини м'якого піднебіння),
2. жувальна (тканини ясен і твердого піднебіння)
3. спеціальна слизова оболонка (дорзальна поверхню язика).

На даний момент комерційно доступні чотири тканинно-інженерні моделі слизової оболонки порожнини рота: конструкції SkinEthic™ Human Oral Epithelium (НОЕ) і SkinEthic Human Gingival Epithelium (HGE) від EPISKIN (Ліон, Франція), а також тканини EpiOral™ і EpiGingival™ від MatTek. Корпорація (Ашленд, Массачусетс).

Реконструйована за допомогою SkinEthic модель орального епітелію людини (НОЕ) культивується з використанням клітин TR146, які були отримані з плоскоклітинної карциноми слизової оболонки щік [75]. НОЕ культивують на інертному полікарбонатному фільтрі на межі повітря-рідина в середовищі з визначеним хімічним складом. Ця модель утворює епітеліальну тканину, позбавлену рогового шару і гістологічно нагадує слизову оболонку ротової порожнини.

Використовуючи тканинну модель EpiOral, дослідники дослідили трансбуккальну доставку малих молекул, таких як нікотин, для нікотинозамісної терапії [7]. Охарактеризували проникнення нікотину в якості частини терапії припинення куріння з пластин і плівок гідроксипропілметилцелюлози /альгілату натрію.

Науковці також використовували моделі тканин порожнини рота, щоб оцінити, чи проникнуть матеріали, поміщені в ротову порожнину, через слизову оболонку щік і таким чином отримують доступ до кровоносної системи. Вони виявили, що наногідроксиапатит, широко

використовувана синтетична форма природного мінералу, який міститься в зубній емалі та дентині, не проникає крізь епітелій і, ймовірно, не буде викликати жодних системних токсикологічних проблем [53].

На моделях оральних тканин MatTek і SkinEthic вивчалися різні вірусні ураження ротової порожнини.

В недавньому дослідженні було виявлено, що ангіотензинперетворюючий фермент II (ACE2), ключовий рецептор для вірусної інфекції SARS-CoV-2 клітин (що призводить до COVID-19), експресується в епіоральній тканині. Було виявлено, що знижує регуляцію експресії ACE2, а також серинової протеази TMPRSS2, ще одного важливого білка, необхідного для проникнення SARS-CoV-2 у клітини господаря [91].

Значення даного дослідження.

Комерційним виробникам засобів для догляда за ротовою порожниною, таких як зубні пасти, рідини для полоскання рота та засоби для відбілювання зубів, потрібен відносно простий спосіб оцінки потенційного подразнення їхніх продуктів у ротовій порожнині, не пов'язаний із застосуванням тварин. Використовуючи аналіз МТТ, дослідники з MatTek і Procter and Gamble вивчали рівні подразнення зубної пасти для дорослих, дітей і немовлят [53].

Моделі тканин *in vitro* також використовувалися як початковий скринінг токсичності для нових матеріалів, які будуть введені в ротову порожнину.

Моделі слизової оболонки порожнини рота мають потенціал для вивчення потенційної інфекції SARS-CoV-2 у ротовій порожнині та розробки простих, легких у використанні профілактичних методів

лікування (таких як засоби для полоскання рота та полоскання горла), які можуть зменшити інфекцію та сприйнятливість до COVID-19.

1.5 Моделювання запалення та окислювального стресу при розвитку захворювань шлунково-кишкового тракту з використанням нових органотипових культуральних систем

Запалення, ініційоване імунною відповіддю, націлюється на епітеліальні клітини, що призводить до цитотоксичних ефектів, і є ключовим фактором кількох хворобливих станів шлунково-кишкового (ШКТ) тракту, зокрема гастроєзофагеальну рефлюксну хворобу (ГЕРХ), стравохід Барретта (BE), реакцію «трансплантат проти господаря» (GVHD) і запальне захворювання кишечника (IBD; тобто виразковий коліт і хвороба Крона) [38].

В даному дослідженні культуру клітин використовували в кількох формах для вивчення захворювань ШКТ. Використання людських клітин у запропонованих в даній статті системах культури тканин дозволяє імітувати *in vivo* взаємодію між епітелієм, імунними клітинами та основною стромою, забезпечуючи мікрофізіологічно релевантне середовище.

Методи тривимірної (3D) органотипічної культури стравоходу (ОТС) використовують епітеліальні клітини, вирощені поверх матриць колагену/матригелю, що містять ембріональні фібробласти стравоходу людини [65]. Безрецептурні методи забезпечують фізіологічно релевантну модель для вивчення росту та диференціювання плоского епітелію стравоходу.

Фібробласти є важливим компонентом системи 3D ОТС; вони реконструюють матрикс і секретують фактори, які підтримують

проліферацію та диференціацію клітин плоского епітелію [6]. Кілька досліджень виявили деякі з факторів, котрі потрібні для росту епітеліальної тканини, в природних умовах вони включають кістковий морфогенетичний білок 4 і безкрилий білок int-1-2 [15,92], і *in vitro* вони включають Noggin, безкрилий int-1 протеїн-3а та R-spondin-1 [61].

Дане дослідження спрямоване на розробку нових багатоклітинних *in vitro* моделей людської тканини, які фізіологічно повторюють гостре та хронічне запальне мікрооточення, щоб змодельовати вплив окислювального пошкодження на епітеліальні клітини стравоходу та кишечника. Очікується, що ці дослідження дадуть добре охарактеризовані культуральні системи, які є репрезентативними для патогенезу ГЕРХ, БЕ, РТПХ та ВЗК, забезпечуючи таким чином корисні лабораторні моделі для цих станів [19].

Нові моделі клітинної тканини людини можуть повернути дослідження імунології слизової оболонки людини у відповідний контекст; тобто епітеліальних систем людини. Досягнення цієї мети вимагатиме модифікації наших наразі створених 3D органотипічних і кишкових ентероїдних/колоноїдних культуральних систем для відображення запальних процесів, активних під час захворювань людини, таких як ГЕРХ, БЕ, РТПХ та ВЗК. Крім того, це дослідження сприятиме розробці нових терапевтичних і профілактичних стратегій, які покращать життя та самопочуття пацієнтів, які страждають від цих важливих клінічних станів

Дослідники, які працювали над даною статтею планують подальше вдосконалення людських безрецептурних і кишкових ентероїдних/колоноїдних культур, щоб включити додаткові типи клітин мікрооточення та фактори для кращого та більш фізіологічного моделювання захворювань людини [38].

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИКА РОБОТИ З ОРГАНОТИПОВИМИ КУЛЬТУРАМИ

Органотипову культуру зрізів тканин створюють із тканин тварин або пацієнтів і культивують в екосистемі *in vitro*. Ця методика є неоціненним внеском у розробці різних методів боротьби з хворобами, в тому числі протипухлинних препаратів [88].

Органотипові системи включають клітинно-клітинну, клітинно-позаклітинну матрицю (ЕСМ) і, в ідеалі, клітинно-імунні взаємодії. У контексті раку ремоделювання ЕСМ, пропухлинні фактори стромальних клітин і протипухлинна імунна інфільтрація є критичними гравцями у зростанні та поширенні раку людини [82].

Переваги органотипових культур:

- збереження клітинного репертуару та імунних компонентів,
- ідентифікація інвазивної здатності пухлин,
- визначення токсичності сполук,
- швидка оцінка терапевтичної ефективності,
- висока прогностична ефективність реакції на ліки.

Органотипи отримують зі стовбурових клітин або клітин-попередників і утворюють мініатюрні органоподібні структури, які відтворюють головні аспекти тривимірної анатомії та багатоклітинний репертуар фізіологічного аналога та повторюють основні функції на рівні тканини та багато важливих характеристик (наприклад, спектр мутацій і експресія генів).

2.1 Органотипові культури зрізів тканин

Прототип культури зрізів органотипної тканини був розроблений доктором Гарфордом і його співробітниками в 1950-х роках [37]. Цей

метод спочатку використовувався для оцінки фармакологічної ефективності.

Органотипові системи культивування зрізів тканини представляють культури *in vitro* експлантів пухлинних і нормальних тканин пацієнтів або тварин.

Етапи підготовки культури зрізів тканини (рис 1):

1. Хірургічно видалені тканини збирають і поміщають у холодне середовище;
2. Дане середовище ретельно нарізають у циліндричні або кубічні форми.
3. Ці тканини розрізають різними методами (наприклад, вібратором, прецизійною машиною для нарізання тканин або просто ручним нарізанням) у стерильних умовах протягом ~6 годин після видалення пухлини.
4. Для вирощування відбирають тільки добре сформовані зрізи. Зрізи інкубували у зволоженому інкубаторі при 37 °C і 5% CO₂ протягом декількох днів, а культуральне середовище змінювали кожні 2-4 дні.

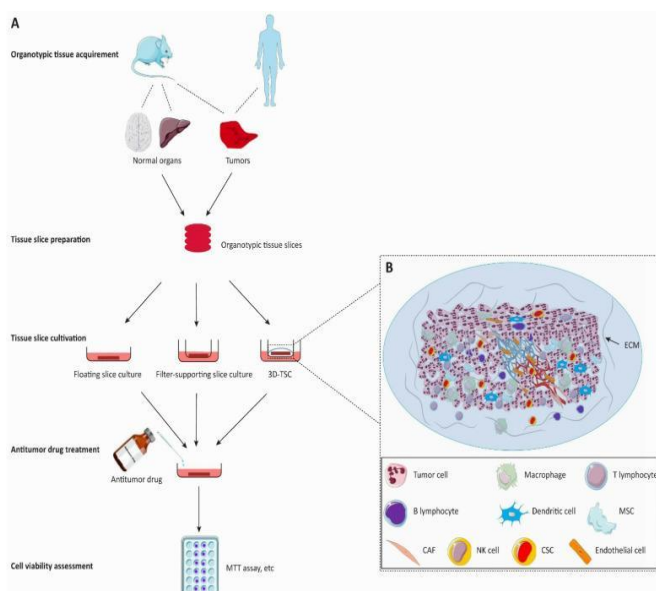


Рис. 1 Блок-схема системи культури зрізів органотипічної тканини для відкриття протипухлинних ліків [41].

2.2 Оптимальні параметри факторів впливу

Процедури генерації та умови культивування впливають на життєздатність зрізів органотипічної тканини. Інструменти для нарізки, товщина, часові рамки культивування після резекції та рівні кисню визначають якість і кількість живих клітин зрізу від початку культивування до кінцевої точки оцінки препарату. Ретельна оптимізація умов підготовки та культивування може звести до мінімуму штучно викликані коливання.

Більшість досліджень створюють зрізи товщиною 250-500 мкм [16,63,64,76]. Зрізи товщиною менше 200 мкм надзвичайно крихкі та містять великі некротичні ділянки; навіть при товщині 250 мкм ще спостерігався градієнт некрозу вздовж зрізу 45 . Різні терміни культивування після резекції дають початок зрізам із різною стійкістю для збереження архітектури та життєздатності тканини, коливаючись від 4 до 16 днів [60,64,76].

Відповідні рівні кисню необхідні для збереження морфології зрізів, оскільки гіпоксія ($< 5\% \text{ O}_2$) викликає швидкі та значні зміни багатьох шляхів стресу та пов'язана з негативним впливом на морфологію зрізів пухлини . Крім того, гіпероксичні умови ($41\% \text{ O}_2$) не збільшують життєздатність тканин, метаболічну активність і проліферацію зрізів порівняно з нормоксичними умовами ($21\% \text{ O}_2$). Таким чином, рівень кисню в атмосфері достатній для культури зрізів.

Періодичний вплив кисню та поживних речовин на зрізи з використанням обертової інкубаційної установки ще більше посилює життєздатність зрізів порівняно з плаваючою або застійною культурою зрізів, що підтримує фільтр [63,64].

Плаваючі зрізи в рідкому культуральному середовищі по суті не можуть відповідати доповненню киснем через обмежену розчинність кисню ($< 2,2$ ммоль/л) . Розташування зрізу на фільтрі на межі повітря-рідина забезпечує ефективне поглинання кисню та поживних речовин [76].

Органотипічні культури зрізів тканини використовують тонко нарізані зрізи тканини, зберігаючи клітинне мікрооточення та організацію тканини.

2.3 Вимоги до субстрату та матриці органотипічних моделей

Розробка тривимірних органоїдних конструкцій часто вимагає матриці або субстрату, відмінного від дуже жорсткого полістиролу стандартних пластикових посудин для культури тканин.

Матриця може забезпечувати важливі тригери для експресії органотипічного фенотипу. Одним із перших прикладів такої матриці був Matrigel , суміш протеогліканів позаклітинної матриці з лінії клітин саркоми миші Engelbreth-Holm-Swarm [49]. Щоб отримати тривимірну органоїдну конструкцію, клітини вбудовують у матрицю Matrigel, а потім конструкцію накривають середовищем, що містить відповідні фактори росту та диференціювання та цитокіни для сприяння диференціації та розширенню [67]. Оскільки Матригель є продуктом

мишачої лінії пухлин, його точний склад може змінюватися від партії до партії.

Щоб вирішити проблеми із впливом матриці на культуру та забезпечити більш точний контроль над хімічними та механічними властивостями матриці, було розроблено ряд визначених препаратів позаклітинної матриці [40]. Ці гідрогелі включають колаген типу 1, фібрин [9], ламінін і пропіленгліколь [34]. Хімічні та фізичні властивості цих гідрогелів можна модифікувати за потреби шляхом створення мікроматеріалу, зміни жорсткості та вибіркового нашарування.

3D-органоїди, що імітують орган або тканину у формі сфероїдної конструкції можуть бути отримані декількома методами, наприклад культурами у висячій краплі, мікроформуванням, планшетами з лунками з ультранизьким приєднанням або культурами у обертових колбах. Технології мікроформи та пластини з наднизькими лунками кріплення можуть виробляти велику кількість конструкцій дуже однакового розміру, тоді як системи обертових колб придатні для великомасштабного виробництва сфероїдних 3D-органоїдних культур. Ці конструкції є «самоорганізованими», і їх розмір обмежений дифузією газів і поживних речовин у конструкцію, як правило, приблизно 500 мкм у поперечному перерізі. Приклади тривимірних моделей органотипової сфероїдної тканини включають моделі печінки, нейронів, серця, підшлункової залози та пухлини (Рис. 2)

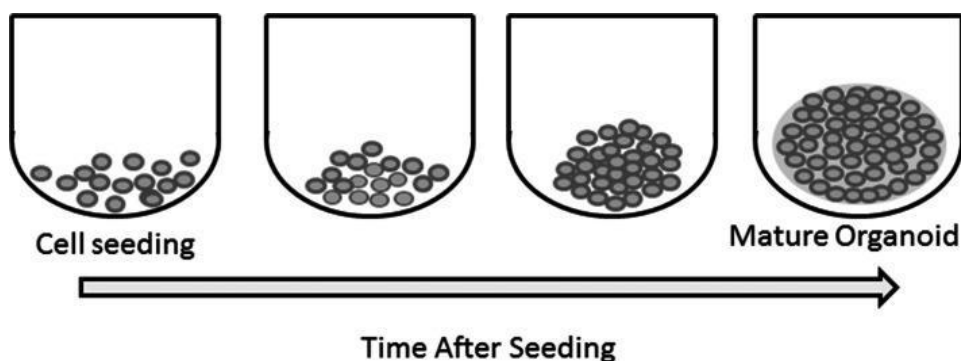


Рис. 2 Сфероїдна органотипова конструкція: клітини висівають у мікроформу з низькою адгезією, що дозволяє спонтанно диференціюватися та самозбиратися у зрілу сфероїдну органотипову конструкцію [42].

Багато епітеліальних і ендотеліальних моделей, краще моделювати з підстиляючим каркасом, на якому органоїд може поширюватися і розвивати поляризацію клітин і тканин.

Якщо для виготовлення конструкції потрібне точне розміщення конкретних типів клітин та/або матриці, були розроблені методи біодруку для шарування клітин та відповідної матриці в 3D-архітектурі. Біодрук дозволяє створювати складну архітектуру тканин як для 3D органоїдних конструкцій твердих, так і для м'яких тканин.

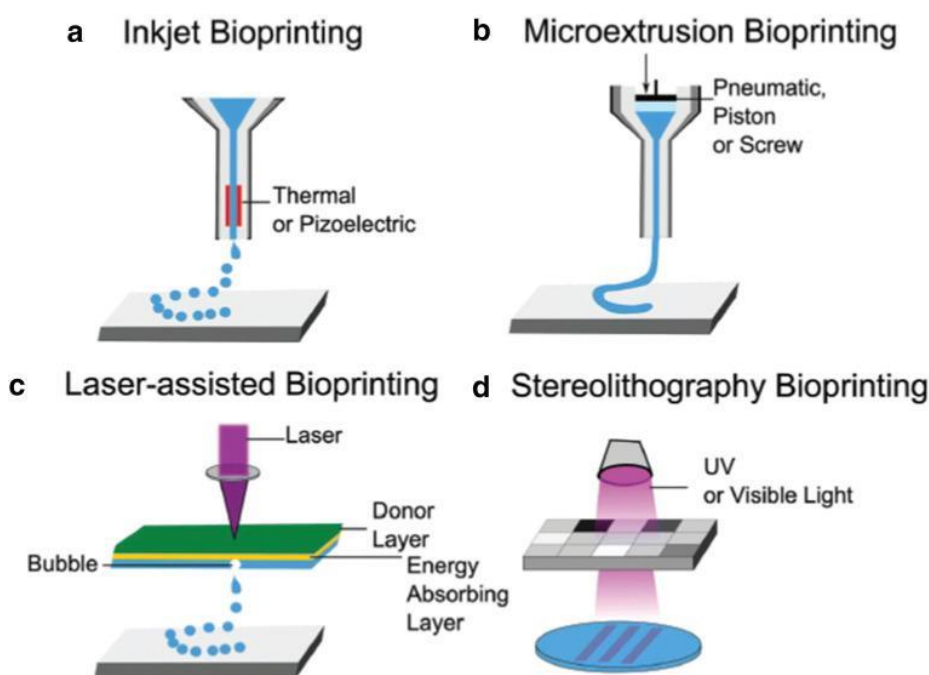


Рис.3 Приклади різних методів біодруку. (а) Струменеві біопринтери; (б) мікроекструзійні біопринтери; (с) лазерний біодрук; (д) стереолітографічні біопринтери [30].

РОЗДІЛ 3

ДЕТАЛЬНИЙ ОГЛЯД ДОСЛІДЖЕННЯ МОДЕЛЮВАННЯ ЗАПАЛЕННЯ ТА ОКИСЛЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ ПРИ РОЗВИТКУ ЗАХВОРЮВАНЬ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ З ВИКОРИСТАННЯМ ОРГАНОТИПОВИХ СИСТЕМ

Для того, щоб краще зрозуміти, як проходить дослідження із використанням органотипових культур, розглянемо детально одну із вже поданих вище (у першому розділі) статей на дану тему.

Гастроезофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ), стравохід Барретта (ББ), реакція «трансплантат проти хазяїна» (РТПХ) і запальні захворювання кишечника, такі як виразковий коліт і хвороба Крона, є поширеними захворюваннями шлунково-кишкового тракту людини, основним фактором розвитку яких є запалення. Загальним результатом цих хронічних запальних станів є посилення окислювального стресу. Окислювальний стрес може пошкоджувати клітинну ДНК (розриви ланцюгів ДНК, точкові мутації через адукти ДНК), білок і органели, а також спричинювати зміни в моделях метилювання, що призводить до активації онкогенів або інактивації пухлинних супресорів.

Імунні клітини можуть потенціювати окислювальний стрес, а фібробласти мають здатність сприяти прогресуючому росту та проліферації епітелію та будь-яких ракових клітин, що утворюються внаслідок цього.

Моделі захворювань для ГЕРХ, ББ, РТПХ та виразкового коліту на основі тривимірних систем культури клітин і тканин людини, які повторюють в природних умовах ріст і диференціацію мікрофізіологічних середовищ, пов'язаних із запаленням, дає

можливість краще зрозуміти як прогресують дані захворювання та дасть змогу тестувати відповідні стратегії до профілактики захворювань. Тому розробка фізіологічно відповідних систем культивування клітин людини є основним напрямком даного дослідження.

Для розуміння того, які саме клітини треба культивувати, та за чим спостерігати, в першу чергу потрібно знати як відбувається запалення і імунна відповідь на нього, які клітини задіяні та які умови середовища нам потрібні.

Запалення, ініційоване імунною відповіддю, націлюється на епітеліальні клітини, що призводить до цитотоксичних ефектів, і є ключовим фактором кількох хворобливих станів у шлунково-кишковому (ШКТ) тракті [50]. Хронічне запалення призводить до посилення окисного стресу та довгострокових наслідків, особливо раку [27]. Окислювальний стрес частково викликаний високоактивними формами кисню (АФК) і азотом (наприклад, супероксидними аніонами, перекисом водню, оксидом азоту та пероксинітридом), які можуть пошкоджувати білки, ліпіди, ДНК і органели, що призводить до зміни фенотипу, індукція метаплазії, трансформації епітелію та появи раку [26,27].

Культуру клітин використовували в кількох формах для вивчення захворювань ШКТ [32]. Використання людських клітин у системах культури тканин, таких як запропоновані в даному дослідженні, дозволяє імітувати взаємодію *in vivo* між епітелієм, імунними клітинами та основною стромою, забезпечуючи мікрофізіологічно релевантне середовище [32] (рис. 4.а). Імунні клітини, активовані у відповідь на пошкодження тканин або інші механізми, є значними виробниками АФК, включаючи перекис водню, також вони продукують цитокіни, які додатково підсилюють ендогенні та екзогенні АФК (рис. 4 б,в). У

стравоході та кишечнику езофагіт і гострий ВЗК викликають експресію прозапальних цитокінів Т-хелперів типу 1, таких як IL-1 β , IL-8 та IFN γ , тоді як БЕ та пізніші стадії ВЗК проявляються переважно Т-хелперами типу 2 гуморальна відповідь зі значно підвищеним рівнем IL-4 [29]. Однак механізм, за допомогою якого цей запальний процес призводить до метаблазії, дисплазії та раку, невідомий.

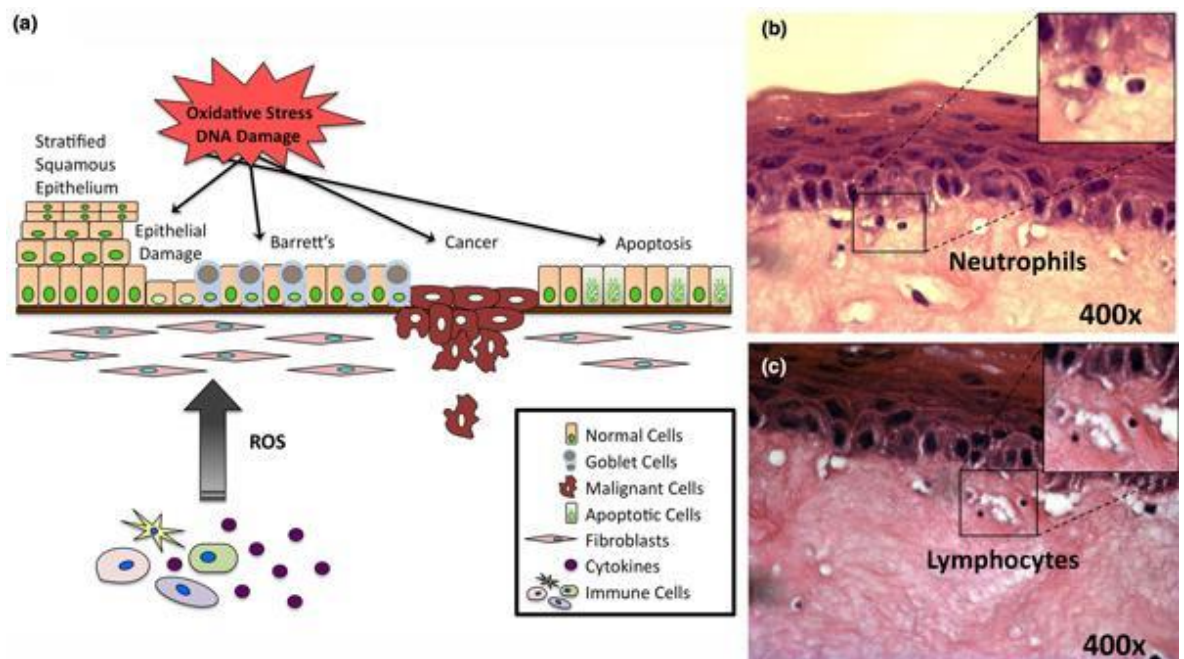


Рис. 4 Моделювання запалення в стравоході .

(а) Діаграма, яка ілюструє, як активовані імунні клітини виробляють значну кількість активних форм кисню (АФК), що призводить до посилення окислювального стресу та пошкодження ДНК, що, у свою чергу, порушує цілісність епітелію, що призводить до апоптозу та сприяє розвитку захворювань включаючи стравохід Барретта (ВЕ) і рак. (б,в) Гістологічний аналіз кератиноцитів стравоходу, вирощених в органотипічних умовах у присутності активних імунних клітин [83].

Сучасні органотипові моделі припускають, що АФК, що генеруються імунними клітинними відповідями, індукують одноланцюгові та дволанцюгові розриви ДНК або змінюють основи ДНК шляхом утворення аддуктів (Рис. 4а). Основними формами окисного пошкодження ДНК є невеликі пошкодження, такі як 8-оксо-2'-дезоксигуанозин і тимінгліколь [68]. Ці модифікації можуть призвести до неправильного сполучення основ і точкових мутацій, які, якщо їх не виправити до реплікації ДНК, можуть викликати мутації, які активують онкогени або інактивують супресори пухлини. Крім того, епігенетичні зміни в експресії генів також можуть посилити прогресування захворювання [1].

Методи тривимірної (3D) органотипічної культури стравоходу (ОТС) використовують епітеліальні клітини, вирощені поверх матриць колагену/матригелю, що містять фібробласти стравоходу плода людини [45]. Безрецептурні методи забезпечують фізіологічно релевантну модель для вивчення росту та диференціювання плоского епітелію стравоходу. Однак повний потенціал цієї культуральної системи для моделювання захворювань людини, таких як БЕ, ще не повністю вивчений.

Фібробласти є важливим компонентом системи 3D ОТС. Вони реконструюють матрикс і секретують фактори, які підтримують проліферацію та диференціацію клітин плоского епітелію [45].

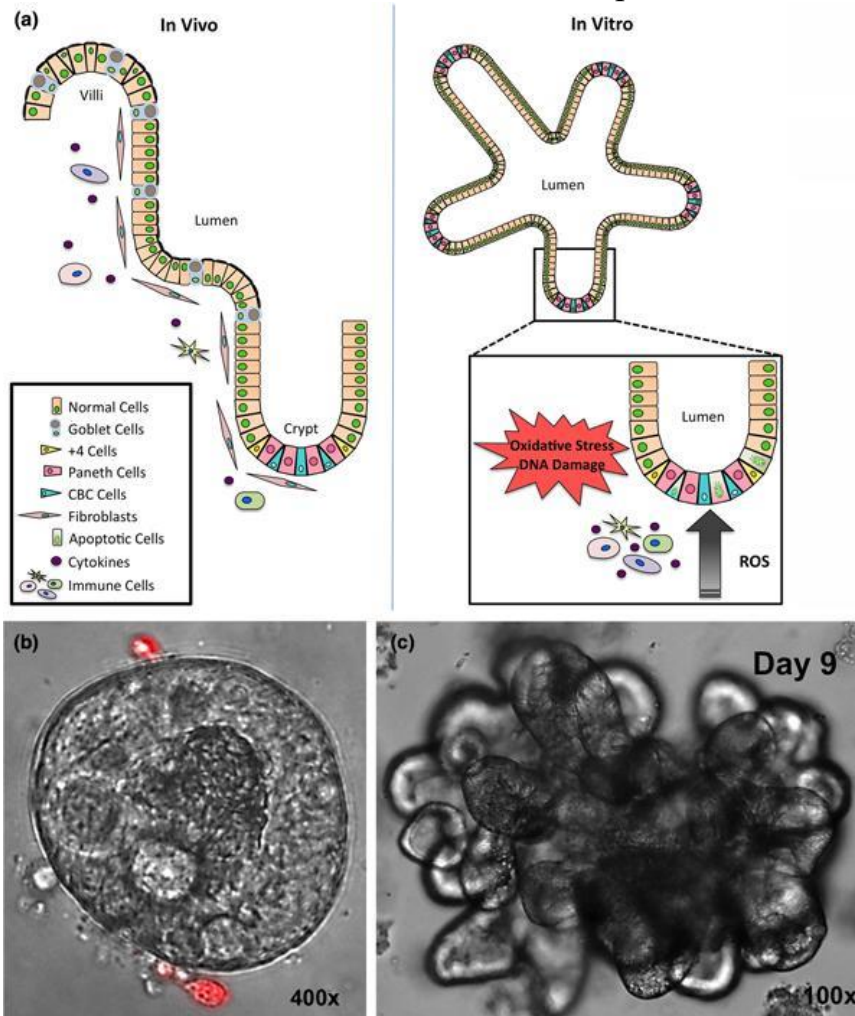
Епітеліальним клітинам БЕ, ймовірно, потрібні різні фактори для підтримки свого росту. Кілька досліджень виявили деякі з цих факторів; в природних умовах вони включають кістковий морфогенетичний білок 4 і безкрилий білок int-1-2 [15,88], в культурі *in vitro* вони включають Noggin, безкрилий int-1 протеїн-3а та R-spondin-1 [80]. Крім того,

активність онкогену циклооксигенази-2 індукується у фібробластах, а також в епітелії при GERX та БЕ.

У 2011 році чотири групи незалежно один від одного опублікували опис методів, за допомогою яких стовбурові клітини кишківника та товстої кишки людини можна підтримувати та розмножувати в культурі, щоб імітувати мікросередовище *in vivo* [44] (Рис. 5.а). Ці методи базувалися більш старому методі культивування стовбурових клітин тонкої кишки миші [79].

У цьому методі культивування крипти кишківника та товстої кишки людини або очищені стовбурові клітини вбудовані в матригель. Протягом кількох днів ці клітини формують сферичні або подовжені овальні структури з криптоподібним просвітом, які називають ентеросферами людини [84] (Рис. 5.б). Сфери тонкої кишки та товстої кишки можуть розширюватися до багаточасточкових ентероїдів (Рис. 5.в) і колоноїди, які імітують впорядковану структуру епітелію разом із криптами, що містять мультипотентні стовпчасті базові стовбурові клітини та клітини Панета.

Інші типи клітин, включаючи ентероцити, келихоподібні клітини



та ентероендокринні клітини [80,84], можна спостерігати у більших кістах подальше від компартменту стовбурових клітин (Рис. 5.a).

Рис. 5 Моделювання запалення в кишечнику. (а) Діаграма, що зображує структуру кишкової крипти in vivo , а також отриманий in vitro органоїд. Також показаний вплив окислювального стресу та пошкодження ДНК в результаті імунних клітин, що продукують активні форми кисню (АФК). СВС, стовбурові клітини стовпчастої основи. (б) Органоїд людини, культивований спільно з dsRed-міченими спленоцитами миші (400 ×). (в) Кишковий органоїд людини через 9 днів після ізоляції (100 ×).

Дана робота, а також ряд інших, спрямована на розробку нових багатоклітинних *in vitro* моделей людської тканини, які фізіологічно повторюють гостре та хронічне запальне мікрооточення, щоб змоделювати вплив окисного пошкодження на епітеліальні клітини стравоходу та кишечника.

За допомогою цих систем можна механічно досліджувати вплив запальної реакції на епітеліальний окислювальний стрес і пошкодження ДНК. Ці нові модельні органотипові системи мають потенціал для швидкої перевірки гіпотез, ствердження тих, чи інших припущень щодо розвитку запальних захворювань та ракупо та покращення нашого розуміння хронічних захворювань. Крім того, це дослідження сприятиме розробці нових терапевтичних і профілактичних стратегій, які покращать життя та самопочуття пацієнтів, які страждають від цих важливих клінічних станів.

ВИСНОВКИ

1. Моделі органотипічних культур є областю біологічної науки *in vitro*, яка швидко розвивається. На відміну від методів моношарового культивування клітин, які були розроблені для досягнення проліферації клітин тварин на початку розробки методів вирощування *in vitro*, досягнення в методах 3D-культивування спрямовані на те, щоб ці 3D-структури сприяли клітинній диференціації *in vivo*.

2. Органотипічні моделі забезпечують підвищену фізіологічну релевантність завдяки доступності та контролю *in vitro*. Ці системи створюються за допомогою ряду різних вихідних матеріалів, включаючи фрагменти тканин і експланти, відновлені первинні клітини та стовбурові клітини.

У трьох тканинах, які розглядалися в дослідженнях висвітлених у Розділі 1, виділено аспекти, як спеціально адаптували органотипові моделі для вивчення старіння; також підкреслили доступність цих моделей. Важливо те, що органотипові моделі легко налаштовувати, і за певної оптимізації вони можуть бути надійним і потужним інструментом для будь-якого дослідника, щоб адаптувати його до своїх потреб і питань.

3. Тривимірні органотипові моделі слизової оболонки порожнини рота були розроблені для вивчення різноманітних явищ, що відбуваються в ротовій порожнині. Ці моделі *in vitro* використовувалися для оцінки подразнювальної дії засобів для догляду за порожниною рота, таких як зубні пасти, рідини для полоскання рота та мукоадгезиви [52].

В результаті даного дослідження було виконано завдання з огляду доступних моделей слизової оболонки щік і ясен людини та висвітлення

їх використання для розуміння різної природи подразників, що впливають на тканини ротової порожнини.

4.Методи тривимірної (3D) органотипічної культури стравоходу (ОТС) використовують епітеліальні клітини, вирощені поверх матриць колагену/матригелю, що містять ембріональні фібробласти стравоходу людей. Дане дослідження було спрямоване на розробку нових багатоклітинних *in vitro* моделей людської тканини, які фізіологічно повторюють гостре та хронічне запальне мікрооточення, щоб змодельовати вплив окислювального пошкодження на епітеліальні клітини стравоходу та кишечника [38].

5.Для того, щоб дослідник зміг вирішити поставлені перед собою завдання, для яких потрібні органотипові культури, він має створити певні умови для проліферації клітин. Потрібно знати базові фізіологічні поняття і властивості певного типу клітин, тощо. Ретельна оптимізація умов підготовки та культивування може звести до мінімуму штучно викликані зміни в середовищі, на якому культивується органотипові культура [76].

Культура органоїдів потребує джерела клітин із проліферативною здатністю (від тканинних стовбурових або безсмертних клітин до культур іPSC), відповідний субстрат або матриця з механічними та стимулюючими властивостями, відповідними для органотипічної конструкції, і необхідною стимуляцією культури для стимулювання диференціації клітинної популяції для формування функціонуючої органотипічної конструкції.

6.Розробка динамічної багатоклітинної системи для фізіологічного моделювання запалення дозволить більше розуміти яким чином проходить проникнення імунних клітин і окислювального стресу і як

вони викликають пошкодження ДНК і епігенетичні зміни, особливо їх роль в прогресування дисплазії та раку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Agarwal A, Polineni R, Hussein Z, Vigoda I, Bhagat T.D., Bhattacharyya S, Maitra A, Verma A. Role of epigenetic alterations in the pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;4:382–396.
2. Andrews D.D.T., Franz-Odenaal T.A.. Organotypic Culture Method to Study the Development Of Embryonic Chicken Tissues. *J Vis Exp*. 2018 Aug 25;(138):57619.
3. Barker C.L, McHale M.T., Gillies A.K., Waller J, Pearce D.M., Osborne J, Hutchinson P.E., Smith G.M, Pringle J.H.. The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2004; 123:892–901.
4. Bein A, Shin W, Jalili-Firoozinezhad S, Park M.H., Sontheimer-Phelps A, Tovaglieri A, Chalkiadaki A, Kim H.J., Ingber D.E.. Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018; 5:659–68.
5. Bell E, Ehrlich H.P., Sher S, Merrill C, Sarber R, Hull B, Nakatsuji T, Church D, Buttle D.J. Development and use of a living skin equivalent. *Plast Reconstr Surg*. 1981; 67:386–92.
6. Bergers L.I.J., Reijnders C.M.A., van den Broek L.J., Spiekstra S.W., de Gruijl T.D., Weijers E.M., Gibbs S. Immune-competent human skin disease models. *Drug Discov Today*. 2016; 21:1479–88.
7. Boateng J.S., Okeke O. Evaluation of clay-functionalized wafers and films for nicotine replacement therapy via buccal mucosa. *Pharmaceutics*. 2019;11:104.

8. Brack A.S., Conboy M.J, Roy S, Lee M, Kuo C.J, Keller C, Rando T.A.. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*. 2007; 317:807–10.
9. Broguiere N, Isenmann L, Hirt C, Ringel T, Placzek S, Cavalli E, Ringnalda F, Villiger L, Zullig R, Lehmann R, Rogler G, Heim MH, Schuler J, Zenobi-Wong M, Schwank G. Growth of epithelial organoids in a defined hydrogel. *Adv Mater*. 2018;30(43):e1801621. Doi: 10.1002/adma.201801621.
10. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley C.J., Boj S.F., Clevers H, Koo B.K., Huch M. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc*. 2016;11(9):1724–1743.
11. Bucala R., Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol*. 1992; 23:1–34.
12. Chen Y., Lin Y., Davis K.M., Wang Q., Rnjak-Kovacina J, Li C, Isberg R.R., Kumamoto C.A., Mecsas J, Kaplan D.L. Robust bioengineered 3D functional human intestinal epithelium. *Sci Rep*. 2015.
13. Chromiak J.A., Shansky J., Perrone C., Vandeburgh H.H.. Bioreactor perfusion system for the long-term maintenance of tissue-engineered skeletal muscle organoids. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1998; 34:694–703.
14. Chung J.H., Eun H.C.. Angiogenesis in skin aging and photoaging. *J Dermatol*. 2007; 34:593–600
15. Clement G., Braunschweig R., Pasquier N., Bosman F. T., Benhattar J. Alterations of the wnt signaling pathway during the

- neoplastic progression of Barrett's esophagus. *Oncogene*. 2006;4:3084–3092.
16. Davies E.J., Dong M., Gutekunst M., Närhi K., van Zoggel H.J., Blom S., Nagaraj A., Metsalu T., Oswald E., Erkens-Schulze S. Et al. Capturing complex tumour biology in vitro: histological and molecular characterisation of precision cut slices. *Sci Rep*. 2015;5:17187.
17. Davis B.N., Santoso J.W., Walker M.J, Cheng CC..S Koves T.R., Kraus W.E., Truskey G.A. Human, Tissue-Engineered, Skeletal Muscle Myobundles to Measure Oxygen Uptake and Assess Mitochondrial Toxicity. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017; 23:189–99.
18. Dennis R.G., Kosnik P.E.. 2nd, Gilbert M.E., Faulkner J.A.. Excitability and contractility of skeletal muscle engineered from primary cultures and cell lines. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280:C288–95.
19. Dennis R.G., Kosnik P.E. 2nd. Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2000; 36:327–35.
20. Dosh R.H., Jordan-Mahy N., Sammon C., Le Maitre C.L.. Use of 1-pNIPAM hydrogel as a 3D-scaffold for intestinal crypts and stem cell tissue engineering. *Biomater Sci*. 2019; 7:4310–24.
21. Drozdowski L., Thomson A.B. Aging and the intestine. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:7578–84.
22. El Ghalbzouri A., Commandeur S., Rietveld M.H., Mulder A.A., Willemze R. Replacement of animal-derived collagen matrix by

- human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products. *Biomaterials*. 2009; 30:71–8.
23. Evans W.J., Campbell W.W. Sarcopenia and age-related changes in body composition and functional capacity. *J Nutr*. 1993; 123:465–8.
24. Evans W.J. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91:1123S–7S.
25. Farage M.A., Miller K.W., Zouboulis C.C., Piérard G.E., Maibach H.I. Gender differences in skin aging and the changing profile of the sex hormones with age. *J Steroids Horm Sci*. 2012; 3:109.
26. Feagins L.A., Zhang H.Y., Zhang X., Hormi-Carver K., Thomas T., Terada L.S., Spechler S.J., Souza R.F. Mechanisms of oxidant production in esophageal squamous cell and Barrett's cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;4:G411–G417.
27. Federico A., Morgillo F., Tuccillo C., Ciardiello F., Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2007;4:2381–2386.
28. Fenske N.A., Lober C.W. Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol*. 1986; 15:571–85.
29. Fitzgerald R.C., Onwuegbusi B.A., Bajaj-Elliott M., Saeed I.T., Burnham W.R., Farthing M.J.. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastroesophageal reflux: immunological determinants. *Gut*. 2002;4:451–459.
30. Foyt D.A., Norman M.D.A., Yu T.T.L. and Gentleman E. (2018). «Exploiting advanced hydrogel technologies to address key

- challenges in regenerative medicine.» *Adv Healthcare Mater* 1700939.
31. Gache Y., Baldeschi C., Del Rio M., Gagnoux-Palacios L., Larcher F., Lacour J.P., Meneguzzi G. Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther.* 2004; 15:921–33.
 32. Garman K.S., Orlando R.C., Chen X. Review: Experimental models for Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;4:G1231–G1243.
 33. Ghaderi M., Fernández Moro C., Pouso Elduayen S., Hultin E., Verbeke C.S., Björnstedt M., Dillner J. Profile genome transcriptome ex-vivo ex-vivo precision-cut cutals from human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep .* 2020 pik; 10 :9070.
 34. Gjorevski N., Sachs N., Manfrin A., Giger S, Bragina M.E., Ordonez-Moran P., Clevers H., Lutolf M.. Design matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature.* 2016;539:560–564.
 35. Gkogkolou P., Böhm M.. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermatoendocrinol.* 2012; 4:259–70.
 36. Han A., Chien A.L., Kang S. Photoaging. *Dermatol Clin.* 2014; 32:291–9. 10.1016/j.det.2014.03.015.
 37. Harford C.G., Hamlin A.. Effect of influenza virus on cilia and epithelial cells in the bronchi of mice. *J Exp Med.* 1952;95:173–190.
 38. Hartman K.G., Bortner J.D., Falk G.W., Yu J, Martín M.G., Rustgi A.K., Lynch J.P.. Modeling inflammation and oxidative stress in gastrointestinal disease development using novel

- organotypic culture systems. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4 Suppl 1(Suppl 1):S5.
39. Helfrich Y.R., Sachs D.L., Voorhees J.J.. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs.* 2008; 20:177–83.
40. Holloway E.M., Capeling M.M., Spence J.R.. «Biologically inspired approaches to enhance human organoid complexity.» *Company Biol Dev* 146.
41. *Int J. Biol Sci.* 2022; 18(15): 5885–5896.
42. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2021; 57(2): 95–103.
43. Jungg H.S., et al. Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning. *Developmental Biology.* 1998;196(1):11–23.
44. Jung P., Sato T., Merlos-Suarez A., Barriga F.M., Iglesias M., Rossell D., Auer H., Gallardo M., Blasco M.A., Sancho E., Clevers H., Batlle E.. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med.* 2011;4:1225–1227.
45. Kalabis J., Wong G.S., Vega M.E., Natsuzaka M, Robertson E.S., Herlyn M., Nakagawa H., Rustgi A.K. Isolation and characterization of mouse and human esophageal epithelial cells in 3D organotypic culture. *Nat Protoc.* 2012;4:235–246.
46. Kao J., Hall J. Skin absorption and cutaneous first pass metabolism of topical steroids: in vitro studies with mouse skin in organ culture *J .Pharmacol Exp Ther.* 1987; 241: 482-487
47. Kent-Braun J.A., Ng A.V., Young K.. Skeletal muscle contractile and noncontractile components in young and older women and men. *J Appl Physiol (1985).* 2000; 88:662–8.

48. Khodabukus A, Kaza A, Wang J, Prabhu N, Goldstein R, Vaidya V.S., Bursac N. Tissue-Engineered Human Myobundle System as a Platform for Evaluation of Skeletal Muscle Injury Biomarkers. *Toxicol Sci.* 2020; 176:124–36.
49. Kibbey M.C.. Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *J Tissue Cult Methods.* 1994;16:227–230.
50. Kim Y.J., Kim E.H., Hahm K.B.. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;4:1004–1010.
51. Klausner M., Ayehunie S., Breyfogle B.A., Wertz P.W., Bacca L, Kubilus J. Organotypic human oral tissue models for toxicological studies. *Toxicol in Vitro.* 2007;21:938–949.
52. Klausner M., Handa Y., Aizawa S. In vitro three-dimensional organotypic culture models of the oral mucosa. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2021 Feb;57(2):148-159.
53. Komiyama S., Miyasaka R., Kikukawa K., Hayman R.. Can nano-hydroxyapatite permeate the oral mucosa? A histological study using three-dimensional tissue models. *PLoS One* 14.
54. Kosnik P.E., Faulkner J.A., Dennis R.G. Functional development of engineered skeletal muscle from adult and neonatal rats. *Tissue Eng.* 2001; 7:573–84.
55. Lang T., Cauley J.A., Tylavsky F., Bauer D., Cummings S, Harris T.B., and Health ABC Study. Computed tomographic measurements of thigh muscle cross-sectional area and attenuation coefficient predict hip fracture: the health, aging, and body composition study. *J Bone Miner Res.* 2010; 25:513–9.

56. Larcher F., Espada J., Díaz-Ley B., Jaén P., Juarranz A., Quintanilla M. New experimental models of skin homeostasis and diseases. *Actas Dermosifiliogr.* 2015; 106:17–28.
57. Man A.L., Gicheva N., Nicoletti C. The impact of ageing on the intestinal epithelial barrier and immune system. *Cell Immunol.* 2014; 289:112–8.
58. Mann C.J., Perdiguero E., Kharraz Y., Aguilar S., Pessina P., Serrano A.L., Muñoz-Cánoves P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle.* 2011; 1:21.
59. Mansouri P., Chalangari R., Chalangari K.M., Saffarian Z. Skin Aging and Immune System. In: Massoud A, Rezaei N, editors. *Immunology of Aging.* Berlin, Heidelberg: Springer. 2014; 339–68.
60. Maund S.L., Nolley R, Peehl D.M.. Optimization and comprehensive characterization of a faithful tissue culture model of the benign and malignant human prostate. *Lab Invest.* 2014;94:208–221.
61. McKinnell I.W., Turmaine M, Patel K. Sonic Hedgehog functions by localizing the region of proliferation in early developing feather buds. *Developmental Biology.* 2004;272(1):76–88.
62. Miljkovic N, Lim J.Y., Miljkovic I, Frontera W.R. Aging of skeletal muscle fibers. *Ann Rehabil Med.* 2015; 39:155–62.
63. Nagaraj A.S., Bao J, Hemmes A, Machado M, Närhi K, Verschuren E.W.. Establishment and Analysis of Tumor Slice Explants As a Prerequisite for Diagnostic Testing. *J Vis Exp.* 2018.

64. Naipal K.A., Verkaik N.S., Sánchez H, van Deurzen C.H., den Bakker M.A., Hoeijmakers J.H., Kanaar R, Vreeswijk M.P., Jager A, van Gent D.C.. Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer. *BMC Cancer*. 2016;16:78.
65. *Nat Protoc*. 2012;4:235–246.
66. Naylor E.C., Watson R.E., Sherratt M.J. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011; 69:249–56.
67. Nguyen R, Da Won Bae S, Zhou G, Read S.A., Ahlenstiel G, George J and Qiao L (2020). «Application of organoids in translational research of human disease with a particular focus on gastrointestinal cancers.» *BBA – Rev Cancer* 1873.
68. O'Hagan H.M., Wang W, Sen S, Destefano Shields C, Lee S.S., Zhang Y.W., Clements E.G., Cai Y, Van Neste L, Easwaran H, Casero R.A., Sears C.L., Baylin S.B. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG islands. *Cancer Cell*. 2011;4:606–619.
69. Ochoa-Villarreal M, et al. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports*. 2016;49(3):149–158.
70. Pasonen-Seppänen S, Suhonen TM, Kirjavainen M, Miettinen M, Urtti A, Tammi M, Tammi R. Formation of permeability barrier in epidermal organotypic culture for studies on drug transport. *J Invest Dermatol*. 2001 Nov;117(5):1322-4.
71. Poletti M, Arnauts K, Ferrante M, Korcsmaros T. Organoid-based Models to Study the Role of Host-microbiota Interactions in IBD. *J Crohns Colitis*. 2021; 15:1222–35.

72. Prüller J, Mannhardt I, Eschenhagen T, Zammit P.S., Figeac N. Satellite cells delivered in their niche efficiently generate functional myotubes in three-dimensional cell culture. *PLoS One*. 2018; 13:e0202574.
73. Ranganathan S, Smith E.M., Foulke-Abel J.D., Barry E.M. Research on enteroids and organoids: how the human gut model has transformed the study of enteric bacterial pathogens. *Gut Microbes*. 2020; 12:1795492.
74. Roach H.I.. Long-term organ culture of embryonic chick femora: a system for investigating bone and cartilage formation at an intermediate level of organization. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1990;5(1):85–100.
75. Rupniak H.T., Rowlatt C, Lane E.B., Steele J.G., Trejdosiewicz L.K., Laskiewicz B, Povey S, Hill BT. Characteristics of four new human cell lines derived from squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Natl Cancer Inst*. 1985;75(4):621–635.
76. Salas A, López J, Reyes R, Évora C, de Oca F.M., Báez D, Delgado A, Almeida T.A.. Organotypic culture as a research and preclinical model to study uterine leiomyomas. *Sci Rep*. 2020;10:5212.
77. Sanchez M.M., Bagdasarian I.A., Darch W, Morgan J.T. Organotypic cultures as aging associated disease models. *Aging (Albany NY)*. 2022 Nov 22;14(22):9338-9383
78. Sato T, et al. In Vitro Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130171.
79. Sato T, Vries R.G., Snippert H.J., van de Wetering M, Barker N, Stange D.E., van Es J.H., Abo A, Kujala P, Peters P.J., Clevers

- H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009;4:262–265.
80. Sato T., Stange D.E., Ferrante M, Vries R.G., Van Es J.H., Van den Brink S, Van Houdt W.J., Pronk A, Van Gorp J, Siersema P.D., Clevers H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011;4:1762–1772.
81. Saxena A.K., Marler J, Benvenuto M, Willital G.H., Vacanti J.P. Skeletal muscle tissue engineering using isolated myoblasts on synthetic biodegradable polymers: preliminary studies. *Tissue Eng*. 1999; 5:525–32.
82. Shamir E.R., Ewald A.J. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(10):647–664.
83. *Stem Cell Res Ther*. 2013; 4(Suppl 1): S5.
84. Stelzner M, Helmrath M, Dunn J.C., Henning S.J., Houchen C.W., Kuo C, Lynch J, Li L, Magness ST, Martin M.G., Wong M.H., Yu J. NIH Intestinal Stem Cell Consortium. A nomenclature for intestinal in vitro cultures. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;4:G1359–G1363.
85. Sung J.H., Yu J, Luo D, Shuler M.L., March J.C.. Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model. *Lab Chip*. 2011; 11:389–92.
86. Tsai S, McOlash L, Palen K, et al. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC Cancer*. 2018;18(1):335.

87. Tobin D.J. Introduction to skin aging. *J Tissue Viability*. 2017; 26:37–46.
88. Wang D.H., Clemons N.J., Miyashita T, Dupuy AJ, Zhang W, Szczepny A, Corcoran-Schwartz I.M., Wilburn D.L., Montgomery E.A., Wang J.S., Jenkins N.A., Copeland N.A., Harmon J.W., Phillips W.A., Watkins D.N.. Aberrant epithelial-mesenchymal hedgehog signaling characterizes Barrett's metaplasia. *Gastroenterology*. 2010;4:1810–1822.
89. Zhang Y., Chen J.S., He Q, He X, Basava R.R., Hodgson J, Sinha U, Sinha S. Microstructural analysis of skeletal muscle force generation during aging. *Int J Numer Method Biomed Eng*. 2020; 36:e3295.
90. Зміна біохімічних показників органотипових культур протягом періоду культивування / А. В. Шкуропат, І. В. Головченко // 100-річчя Поліського національного університету: здобутки, реалії, перспективи : збірник праць учасників Міжнародної науково-практичної конференції (1 листопада 2022 р.). Житомир : Поліський національний університет, 2022. – 652-655.